

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Canis

**Transketolase-*like* Protein 1 (TKTL1) Expression und
Funktion**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Diana Sonja Kaeß, geb. Hartmannsberger

aus
Memmingen

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires
Mitberichterstatter:	PD Dr. Sven Otto
	Prof. Dr. Hjalmar Hagedorn
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	16.05.2019

Für Simon und meine Eltern

Eidesstattliche Versicherung

Kaeß, Diana Sonja

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Transketolase-*like* Protein 1 (TKTL1) Expression und Funktion

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ditzingen, 01.07.2019

Ort, Datum

Diana Kaeß

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Publikation

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Hartmannsberger D, Mack B, Eggert C, Denzel S, Stepp H, Betz CS, Gires O (2011)
Transketolase-like protein 1 confers resistance to serum withdrawal in vitro. *Cancer
Lett* **300**: 20-29

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	4
Publikation	5
Inhaltsverzeichnis	6
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 Tumorentstehung.....	9
1.1.1 Protoonkogene.....	11
1.1.2 Tumorsuppressorgene	12
1.1.3 Tumorstammzellen.....	12
1.2 Tumormarker.....	14
1.3 Der Stoffwechsel von Tumoren	15
1.4 Der Pentosephosphatweg	16
1.4.1 Der oxidative Abschnitt des Pentosephosphatweges.....	17
1.4.2 Der nicht-oxidative Abschnitt des Pentosephosphatweges	18
1.5 Die Familie der Transketolasen und ihre Funktion.....	19
1.5.1 Die Transketolase.....	19
1.5.2 Die Transketolase-like Proteine	20
1.5.3 Das Transketolase-like Protein 1	21
1.6 Zielsetzung	28
2 MATERIAL	30
2.1 Antikörper	30
2.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits	30
2.3 Enzyme und Größenmarker	33
2.4 Geräte	33
2.5 Verbrauchsmaterialien	35
2.6 Dienstleistungen	36
2.7 Plasmide	36
2.8 Oligonukleotide.....	36
2.8.1 Primer.....	36
2.8.2 siRNA (short interfering RNA)	37
2.9 Bakterien	37
2.10 Zelllinien	37
2.11 Gewebe.....	38

3	METHODEN	40
3.1	Zellkultur	40
3.1.1	<i>Kultivierung von Zelllinien unter Standardbedingungen</i>	40
3.1.2	<i>Kultivierung von Zelllinien unter restriktiven Bedingungen</i>	41
3.1.3	<i>Kryokonservierung und Reaktivierung von Zelllinien</i>	41
3.1.4	<i>Bestimmung von Zellzahlen</i>	41
3.1.5	<i>Transfektion von Zellen</i>	41
3.1.6	<i>Herstellung von Zelllysaten</i>	42
3.2	Immunoblot	42
3.3	Molekularbiologische Methoden	44
3.3.1	<i>RNA-Isolierung und reverse Transkription</i>	44
3.3.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	44
3.3.3	<i>Agarose Gelelektrophorese</i>	45
3.4	Bakterienkultur	46
3.4.1	<i>Kultivierung und Kryokonservierung</i>	46
3.4.2	<i>Herstellung chemisch kompetenter Bakterien</i>	46
3.4.3	<i>Transformation von Escherichia coli</i>	47
3.5	Klonierung	47
3.5.1	<i>Allgemeines Klonierungsschema</i>	47
3.5.2	<i>Ligation</i>	48
3.5.3	<i>Restriktionsverdau</i>	49
3.5.4	<i>DNA-Extraktion aus Agarosegelen</i>	49
3.5.5	<i>Präparation von Plasmiden</i>	50
3.6	Propidiumiodid-(PI)-FACS-Analyse	50
3.7	Immunhistochemie	50
3.7.1	<i>Natives Gewebe</i>	50
3.7.2	<i>Paraffin-eingebettetes Gewebe</i>	51
3.8	Immunzytochemie	53
4	ERGEBNISSE.....	55
4.1	TKTL1-Expression in Zelllinien unterschiedlicher Herkunft	55
4.1.1	<i>Analyse der TKTL1-Expression mittels Reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR)</i>	55
4.1.2	<i>Analyse der TKTL1-Expression mittels Immunoblot</i>	56
4.1.3	<i>Analyse der TKTL1-Expression mittels Immunzytochemie</i>	58
4.1.4	<i>Analyse der TKTL1-Expression nach RNA-Interferenz</i>	60
4.2	TKTL1-Expression in Geweben unterschiedlicher Herkunft	61
4.2.1	<i>Detektion von TKTL1 in Abhängigkeit von Fixierung, Konservierung und Antigendemaskierung in Proben eines Larynxkarzinoms</i>	61
4.2.2	<i>TKTL1-Expression in kryokonservierten gesunden Geweben</i>	66

4.3	Einfluss der exogenen TKTL1-Expression auf die Zellproliferation	67
4.3.1	<i>Einfluss von exogenem TKTL1 auf die Proliferation unter Standardkulturbedingungen</i>	68
4.3.2	<i>Einfluss von exogenem TKTL1 auf die Proliferation unter restriktiven Kulturbedingungen</i>	71
4.4	Auswirkung der exogenen TKTL1-Expression auf die Apoptoserate	74
5	DISKUSSION	77
5.1	Die Expression und Funktion von TKTL1 in der Literatur	77
5.2	Die Detektion von TKTL1	80
5.2.1	<i>Die Detektion von TKTL1 mittels RT-PCR und Immunoblot</i>	80
5.2.2	<i>Die Detektion von TKTL1 mittels Immunhistochemie</i>	85
5.3	Die Verwendung stabiler Transfektanten zur Untersuchung der TKTL1-Funktion.....	92
5.4	Effekte der TKTL1-Expression.....	94
6	ZUSAMMENFASSUNG	100
	Abbildungsverzeichnis	102
	Tabellenverzeichnis	103
	Abkürzungsverzeichnis	104
	Literaturverzeichnis	108
	Danksagung	124

1 EINLEITUNG

In Deutschland erkranken jährlich etwa 480 000 Menschen neu an Krebs. Zwischen 2010 und 2030 wird ein Anstieg der Krebsneuerkrankungen um mindestens 20 % prognostiziert (Broschüre: Krebs in Deutschland für 2013/2014, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017, S. 6). Seit 1970 hat sich die absolute Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland fast verdoppelt, was vor allem auf die demografische Entwicklung zurückzuführen ist. 2020 werden voraussichtlich insgesamt etwa 519 000 Menschen, davon 275 000 Männer und 244 000 Frauen, neu an Krebs erkranken (Broschüre: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland, Robert Koch-Institut, 2016, S. 22f.). Krebserkrankungen waren auch 2015, wie schon die Jahre zuvor, laut Angaben des statistischen Bundesamtes hierzulande die zweithäufigste Todesursache nach Krankheiten des Kreislaufsystems (<https://www.destatis.de>). Auch weltweit ist Krebs eine der häufigsten Todesursachen und nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für 8,8 Millionen Todesfälle in 2015 verantwortlich (<http://www.who.int/en/>). Die häufigste Krebserkrankung bei Männern ist nach wie vor das Prostatakarzinom, bei Frauen das Mammakarzinom. Jeder zweite Mann und jede zweite Frau erkranken im Laufe ihres Lebens an Krebs. Die Risikofaktoren für die Entstehung von Krebs sind dabei vielfältig. Neben genetischen Ursachen spielen vor allem vermeidbare Risikofaktoren wie Tabakkonsum, Übergewicht und Bewegungsmangel, Alkoholkonsum, UV-Strahlung sowie chronische Infektionen eine bedeutende Rolle. Die WHO nimmt an, dass etwa 30 % aller Krebserkrankungen weltweit durch Prävention vermeidbar wären (Broschüre: Krebs in Deutschland für 2013/2014, S. 19f.). Diese Zahlen und Fakten machen die Bedeutung von Krebserkrankungen in unserer Gesellschaft und den Bedarf an wirksamen Therapien deutlich. Um zielgerichtete Therapieformen entwickeln zu können, ist die Kenntnis der pathogenetischen Vorgänge bei der Tumorentstehung entscheidend.

1.1 Tumorentstehung

Das Wort Tumor hat seinen Ursprung im Lateinischen und bedeutet so viel wie Geschwulst oder Schwellung. Damit kann also im weiteren Sinn jegliche Art von Raumforderung gemeint sein, beispielsweise im Rahmen einer Entzündung. Im engeren Sinn

wird darunter aber eine Wucherung von Zellen verstanden, die sich der normalen Wachstumskontrolle entzogen haben (Rassow *et al.*, 2012, S. 511). Dabei können benigne und maligne Tumoren unterschieden werden. Benigne Tumoren sind vom umliegenden Gewebe gut abgegrenzt und bilden keine Metastasen, während maligne Tumoren („Krebs“) in das umgebende Gewebe infiltrieren und Metastasen bilden (Rassow *et al.*, 2012, S. 511). Folgende Eigenschaften unterscheiden maligne Tumorzellen aufgrund wesentlicher Veränderungen ihrer Zellphysiologie von normalen Zellen (Hanahan & Weinberg, 2000; Rassow *et al.*, 2012, S. 511):

- Unkontrollierte Proliferation auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren
- Unbegrenzt replikatives Potenzial
- Resistenz gegenüber antiproliferativen Signalen
- Unempfindlichkeit gegenüber Apoptose
- Invasives Wachstum und Bildung von Metastasen
- Expression von Faktoren zur Stimulation der Angiogenese im Tumor.

Die Kanzerogenese (Tumorentstehung) erfordert eine Abfolge vieler Schritte, die in der Regel (i. d. R.) einen Zeitraum von mehreren Jahren in Anspruch nimmt und durch somatische Mutationen, genetische Prädisposition oder Tumoviren induziert werden kann (Rassow *et al.*, 2012, S. 512). Die Transformation einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle erfolgt aber in den meisten Fällen nicht aufgrund einer einzelnen somatischen Mutation, sondern infolge einer Reihe genetischer Alterationen, von denen jede der betroffenen Zelle einen weiteren Selektionsvorteil verleihen kann (Foulds, 1954; Hanahan & Weinberg, 2000; Vogelstein & Kinzler, 1993). Diese Mutationen akkumulieren über Jahre hinweg und tragen so zum malignen Phänotyp von Zellen bei (Vogelstein & Kinzler, 2004). Je nach Art des Tumors ist eine unterschiedliche Anzahl von somatischen Mutationen zur Transformation notwendig (Renan, 1993), im Allgemeinen sind es vier bis sieben (Rassow *et al.*, 2012, S. 512). Besteht allerdings bereits eine genetische Prädisposition gegenüber Krebs aufgrund von Mutationen in der Keimbahn, ist die Zahl der erforderlichen somatischen Mutationen geringer (Rassow *et al.*, 2012, S. 512; Vogelstein & Kinzler, 2004). Von solchen Keimbahn- oder somatischen Mutationen während der Krebsentstehung betroffen sind vor allem Gene, welche für die Regulation der Zellproliferation und -homöostase verantwortlich sind (Hanahan & Weinberg, 2000). Dies sind insbesondere Protoonkogene, Tumorsuppressorgene und DNA-

Reparaturgene (Vogelstein & Kinzler, 2004). Auf Protoonkogene und Tumorsuppressorgene wird im Folgenden näher eingegangen.

1.1.1 Protoonkogene

Protoonkogene sind Gene, welche die Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zelle stimulieren (Rassow *et al.*, 2012, S. 512). Zu den Genprodukten von Protoonkogenen zählen beispielsweise Wachstumsfaktoren wie der FGF (*fibroblast growth factor*), transmembranäre Wachstumsfaktorrezeptoren wie der EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*), membranassoziierte Tyrosinkinase wie die Abl-Tyrosinkinase, membranassoziierte Guaninnucleotid-bindende Proteine (G-Proteine) wie das Ras-Protein, zytosolische Hormonrezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Apoptosefaktoren (Löffler *et al.*, 2007, S. 1143; Rassow *et al.*, 2012, S. 513). Somatische Mutationen in diesen Genen können zu einer Aktivitätssteigerung oder erhöhten Expression ihrer Genprodukte führen (*gain of function*) und die Protoonkogene damit zu Onkogenen umwandeln (Rassow *et al.*, 2012, S. 513; Yamamoto, 1993). Beispielhaft sei hier das Protoonkogen Ras genannt. Nachdem ein Wachstumsfaktor an seinen spezifischen Membranrezeptor gebunden hat, kommt es zur Aktivierung des G-Proteins Ras. Das aktivierte Ras-Protein kann nun die Signaltransduktionskaskade weiterleiten, wodurch schließlich die Transkription von Genen aktiviert wird, die für die Zellteilung zuständig sind. Die Inaktivierung von Ras und damit das Stoppen der Kaskade erfolgt durch die Bindung des Proteins GAP (*GTPase activating protein*) an Ras. Eine somatische Mutation im Protoonkogen Ras kann dazu führen, dass GAP nicht mehr binden kann und somit eine Inaktivierung von Ras unmöglich ist (Löffler *et al.*, 2007, S. 1144). Die Signalkaskade bleibt also unabhängig vom Vorhandensein eines Wachstumssignals aktiv, sodass die Zellteilung permanent stimuliert wird (Rassow *et al.*, 2012, S. 513f.). Mutationen, die die Umwandlung eines Protoonkogens in ein Onkogen generieren, können in Form von Punktmutationen, chromosomalen Translokationen oder in Form einer Genamplifikation in Erscheinung treten (Vogelstein & Kinzler, 2004; Yamamoto, 1993). Hierbei ist bereits die Mutation eines Allels ausreichend, um der Zelle entsprechende Selektionsvorteile zu verschaffen. Das heißt (d. h.) es handelt sich um eine dominante *gain-of-function*-Mutation (Hanahan & Weinberg, 2000; Vogelstein & Kinzler, 2004).

1.1.2 Tumorsuppressorgene

Eine weitere Gengruppe, die im Rahmen der Kanzerogenese von somatischen Mutationen bevorzugt betroffen ist, ist die Gruppe der Tumorsuppressorgene. Diese werden auch Anti-Onkogene genannt, da sie im Gegensatz zu den Protoonkogenen die Wachstums- und Differenzierungsprozesse der Zelle hemmen. Die Entstehung von Tumorzellen kann daher durch die Inaktivierung solcher Tumorsuppressorgene (*loss of function*) gefördert werden (Rassow *et al.*, 2012, S. 512). In Tumorsuppressorgenen müssen i. d. R. beide Allele mutiert sein, um der Zelle einen Selektionsvorteil zu gewähren. Es handelt sich somit um eine rezessive *loss-of-function*-Mutation (Hanahan & Weinberg, 2000; Vogelstein & Kinzler, 2004). Das Protein p53, das in der Literatur auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird (Lane, 1992; Stiewe, 2007), ist ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe, da es in der Mehrheit der menschlichen Karzinome funktionell inaktiviert ist (Harris, 1996; Hollstein *et al.*, 1991; Vogelstein *et al.*, 2000). Die Funktion von p53 besteht darin, die Intaktheit der DNA zu überwachen und im Fall von schwerwiegenden DNA-Schäden den Zellzyklus zu arretieren, um eine DNA-Reparatur zu gewährleisten oder, im Fall von irreparablen Schäden, die Apoptose einzuleiten (Lane, 1992; Rassow *et al.*, 2012, S. 516). Damit soll eine Vermehrung von geschädigten Zellen und das damit einhergehende Risiko der erhöhten Mutationsfrequenz verhindert werden (Löffler *et al.*, 2007, S. 1148; Rassow *et al.*, 2012, S. 516). Zellen mit einem Defekt in beiden Allelen des p53-Gens sind nicht in der Lage den Zellzyklusarrest oder die Apoptose einzuleiten, wodurch sie genetisch instabil werden und die für die Kanzerogenese notwendigen Mutationen akkumulieren können (Lane, 1992; Rassow *et al.*, 2012, S. 516).

Zusammengefasst trägt also die Aktivitätssteigerung von Protoonkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen aufgrund von somatischen Mutationen zur Tumorentstehung bei.

1.1.3 Tumorstammzellen

Ein gemeinsames Charakteristikum aller Tumorarten ist die große inter- und intratumorale Heterogenität von Tumorzellen (Campbell & Polyak, 2007; Ichim & Wells, 2006). Tumorzellen unterscheiden sich dabei nicht nur zum Beispiel (z. B.) in Größe, Morphologie und Antigenexpression, sondern auch in ihrer Proliferationsrate, der Zell-Zell-Interaktion und ihrer Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika (Campbell & Polyak, 2007; Heppner, 1984). Zwei gängige Konzepte der Tumorentstehung sind das

klonale Evolutionsmodell und die Krebsstammzelltheorie (Campbell & Polyak, 2007; Visvader & Lindeman, 2008). Beide Theorien stimmen darin überein, dass die Karzinogenese, also die Bildung von Tumoren aus Zellen epithelialen Ursprungs, auf multiplen Mutationen in einer einzelnen Zelle beruht, die in der Folge ein unlimitiertes Proliferationspotenzial erhält (Campbell & Polyak, 2007). Während das klonale Evolutionsmodell (Nowell, 1976) davon ausgeht, dass alle dabei entstandenen Tumorzellen gleiche tumorigene Eigenschaften besitzen, wird in der Krebsstammzelltheorie angenommen, dass allein eine kleine, spezielle Untergruppe der Tumorzellen, die Tumorstammzellen, dazu in der Lage ist, die Tumorentstehung, das Tumorwachstum sowie Rezidive zu initiieren (Campbell & Polyak, 2007; Nassar & Blanpain, 2016; Visvader & Lindeman, 2008). Aus der Krebsstammzelltheorie resultiert ein hierarchischer Aufbau des Tumors mit den Krebsstammzellen an der Spitze (Bonnet & Dick, 1997; Nassar & Blanpain, 2016; Visvader & Lindeman, 2008). Tumorstammzellen teilen wichtige Eigenschaften wie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung mit normalen Stammzellen (Campbell & Polyak, 2007; Reya *et al.*, 2001; Visvader & Lindeman, 2008). Krebsstammzellen entstehen jedoch nicht notwendigerweise durch Transformation aus normalen Stammzellen, es ist ebenso möglich, dass sie sich aus Progenitorzellen oder noch weiter differenzierten Zellen, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung erworben haben, entwickeln (Visvader & Lindeman, 2008; Visvader & Lindeman, 2012). Eine bemerkenswerte Eigenschaft der Tumorstammzellen liegt in ihrer erhöhten Resistenz gegenüber der Chemo- und Radiotherapie (Campbell & Polyak, 2007; Visvader & Lindeman, 2008), was eine effektive Tumorthherapie bei Vorhandensein dieser Zellen erschwert. Für die Isolierung von Tumorstammzellen wurden verschiedene Oberflächenmarker wie z. B. CD24, CD44, CD133 und EpCAM verwendet (Al-Hajj *et al.*, 2003; Dalerba *et al.*, 2007; Gires *et al.*, 2009; Ricci-Vitiani *et al.*, 2007; Visvader & Lindeman, 2008). Von diesen wird allerdings keiner ausschließlich von Krebsstammzellen exprimiert (Visvader & Lindeman, 2008; Visvader & Lindeman, 2012). Zudem ist unklar, inwieweit die bisherigen Untersuchungsmethoden mittels Xenotransplantation die Häufigkeit von Krebsstammzellen unter- oder auch überschätzen, da diese Methoden noch nicht hinreichend optimiert sind und zu viele Störfaktoren die Fähigkeit beeinträchtigen, Tumorstammzellen zu detektieren (Magee *et al.*, 2012; Nassar & Blanpain, 2016; Visvader & Lindeman, 2008). Obwohl es also in den letzten Jahren zunehmend Belege für die Existenz von Tumorstammzellen in soliden Tumoren gibt (Chen *et al.*, 2012; Nassar & Blanpain, 2016; Visvader & Lindeman, 2008), ist es noch unklar, ob

die Krebsstammzelltheorie auf viele oder nur wenige Karzinome zutrifft (Magee *et al.*, 2012; Nassar & Blanpain, 2016). Daher ist es notwendig, spezifische Oberflächenmarker abzugrenzen, mit denen Krebsstammzellen zuverlässig identifiziert werden können und die Methoden zu deren Detektion weiter zu verbessern (Magee *et al.*, 2012; Nassar & Blanpain, 2016; Visvader & Lindeman, 2008). Die ersten erfolgreichen Versuche, Tumorstammzellen in ihrer natürlichen Mikroumgebung in Mausmodellen *in vivo* mittels klonaler Analyse und Verfolgung der genetischen Abstammung von Tumorzellen zu detektieren, wurden bereits von Driessens *et al.* (2012) und Schepers *et al.* (2012) publiziert.

1.2 Tumormarker

Für die kurative Behandlung einer Krebserkrankung ist deren Früherkennung von essenzieller Bedeutung. Optimal hierfür wäre eine Substanz, die exklusiv von Tumorzellen exprimiert wird und in Körperflüssigkeiten wie z. B. Serum oder Urin nachweisbar ist (Löffler *et al.*, 2007, S. 1159). Tumor-assoziierte Biomarker, auch Tumormarker genannt, sind solche Substanzen, die im Blut, Urin oder in Geweben nachweisbar sind und von Tumorzellen synthetisiert werden. Ein Anstieg ihrer Konzentration kann ein Hinweis auf eine maligne Erkrankung sein (Wang *et al.*, 2012). Allerdings werden die derzeit bekannten und in der klinischen Praxis angewandten Tumormarker nicht ausschließlich von Tumorzellen exprimiert, sondern auch von gesundem Gewebe (Löffler *et al.*, 2007, S. 1159). Zu diesen Substanzen zählen beispielsweise onkofetale Antigene wie das α_1 -Fetoprotein, Enzyme wie das Prostata-spezifische Antigen (PSA) und Hormone wie das Calcitonin (Löffler *et al.*, 2007, S. 1159). Eine Erhöhung ihrer Konzentration kann auch bei nicht-malignen Veränderungen des entsprechenden Organs wie z. B. bei einer Entzündung oder auch infolge von starkem Rauchen auftreten (Kilpatrick & Lind, 2009; Wang *et al.*, 2012). Tumormarker eignen sich daher i. d. R. weniger zur Früherkennung, sondern zur Verlaufskontrolle einer Tumorthherapie (Löffler *et al.*, 2007, S. 1159). Viele weitere Substanzen werden derzeit auf ihr Potenzial als Tumormarker hin untersucht. Ziel ist es, Krebserkrankungen möglichst frühzeitig diagnostizieren zu können, um eine Metastasierung zu verhindern und eine effektive Tumorthherapie zu ermöglichen (Negm *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2012).

1.3 Der Stoffwechsel von Tumoren

Bereits 1924 postulierte Otto Warburg, dass Tumoren auch in Anwesenheit von Sauerstoff Glukose vorwiegend zu Laktat abbauen, um Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) zu gewinnen, anstatt die wesentlich effizientere oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien hierfür zu nutzen (Warburg *et al.*, 1924). Der Abbau von Glukose zu Laktat in Anwesenheit von Sauerstoff ist auch bekannt als aerobe Glykolyse oder der „Warburg-Effekt“. Warburg führte dieses Phänomen auf eine irreversible Schädigung der Atmungskette der Zellen zurück und stellte zudem die Hypothese auf, dass Krebs entsteht, wenn die Zellen auf die defekte Atmung in den Mitochondrien mit einem Ersatz durch die aerobe Glykolyse reagieren (Warburg, 1956). Im Gegensatz zu dieser Hypothese ist nach neueren Erkenntnissen jedoch die Fähigkeit der Mitochondrien zur oxidativen Phosphorylierung in den meisten Tumorzellen erhalten (Gatenby & Gillies, 2004; Pedersen, 2007; Ward & Thompson, 2012), sodass die Grundlage für die Unterdrückung des mitochondrialen Metabolismus nach wie vor ungeklärt ist (Maldonado & Lemasters, 2012). Verschiedene Ansätze wie eine Beteiligung von spannungsabhängigen Anionenkanälen an der Limitierung des mitochondrialen Stoffwechsels (Maldonado & Lemasters, 2012), ein reduzierter Gehalt an Mitochondrien in Tumoren (Pedersen, 2007) oder eine Onkogen-induzierte Reprogrammierung des Zellmetabolismus (Hsu & Sabatini, 2008; Ward & Thompson, 2012) werden dazu diskutiert. Der „Warburg-Effekt“, also die aerobe Glykolyse, ist jedoch ein häufiges Phänomen in Karzinomen (Gatenby & Gillies, 2004; Hsu & Sabatini, 2008; Maldonado & Lemasters, 2012; Ward & Thompson, 2012) und die damit einhergehende Steigerung des Glukoseverbrauchs der Tumorzellen kann klinisch zur Detektion von Tumoren mittels Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) genutzt werden (Gambhir, 2002; Gatenby & Gillies, 2004; Hsu & Sabatini, 2008; Ward & Thompson, 2012). Der „Warburg-Effekt“ erscheint zunächst paradox, da der Abbau von Glukose zu Laktat im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung wesentlich ineffizienter in der Produktion von ATP ist (2 Mol ATP pro Mol Glukose gegenüber 38 Mol ATP pro Mol Glukose). Es wird deshalb davon ausgegangen, dass diese Art des Tumorstoffwechsels das Ergebnis eines aktiven Selektionsprozesses ist, der Tumorzellen einen signifikanten Wachstums- und Überlebensvorteil gewährt (Gatenby & Gillies, 2004; Hsu & Sabatini, 2008). Das zunehmende Wachstum von prämaligen Läsionen und Tumoren in frühen Stadien führt dazu, dass die Diffusionsstrecke zwischen versorgenden Blutgefäßen und Tumorgewebe zu groß wird, um eine suffiziente Sauerstoffversor-

gung zu gewährleisten (Gatenby & Gillies, 2004; Hsu & Sabatini, 2008). Aufgrund der resultierenden Hypoxie im Tumorgewebe wird der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1) stabilisiert. Dieser induziert als Transkriptionsfaktor die Expression einer Reihe von Genen, welche unter anderem (u. a.) an der Glykolyse (z. B. Glukosetransporter und einige glykolytische Enzyme), der Angiogenese oder der Erythropoese beteiligt sind (Gatenby & Gillies, 2004; Hsu & Sabatini, 2008; Lu *et al.*, 2002). Durch die Steigerung der Expression glykolytischer Enzyme erfolgt initial eine Adaption des Tumorstoffwechsels an die hypoxischen Verhältnisse, womit das Überleben der Tumorzellen gesichert wird. Die Stimulation der Angiogenese durch HIF-1 führt über eine Hochregulation des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zur Rekrutierung neuer Blutgefäße. Da diese jedoch oft desorganisiert wachsen und auch der Tumor weiter proliferiert, werden Teile des Tumorgewebes wiederum nur unzureichend mit Sauerstoff versorgt. Dieser variierende oxisch-hypoxische Sauerstoffgehalt im Tumorgewebe führt zur Selektion von Tumoren, welche die Glykolyse permanent hochregulieren (Gatenby & Gillies, 2004; Hsu & Sabatini, 2008). Die molekularen Mechanismen, die zu einer konstitutiven Steigerung der Glykolyse auch unter Anwesenheit von Sauerstoff führen, sind allerdings noch nicht vollständig geklärt (Gatenby & Gillies, 2004). Es wird davon ausgegangen, dass HIF-1 nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch diverse andere Faktoren wie z. B. den variierenden Sauerstoffgehalt im Tumorgewebe und die dadurch induzierten Schäden (Gatenby & Gillies, 2004) sowie durch Pyruvat und Laktat, die Endprodukte der Glykolyse (Lu *et al.*, 2002), konstitutiv stabilisiert wird und somit die aerobe Glykolyse unterhält. Ein wichtiger Stoffwechselweg, der in Zusammenhang mit der Pyruvat- und Laktatproduktion und somit auch mit der aeroben Glykolyse in Tumoren gebracht wird, ist der Pentosephosphatweg, auf den im Folgenden näher eingegangen wird.

1.4 Der Pentosephosphatweg

In der Glykolyse wird Glukose zunächst zu Pyruvat und bei Sauerstoffmangel weiter zu Laktat abgebaut mit dem Ziel Energie in Form von ATP zu gewinnen. Der Pentosephosphatweg ist ein von der Glykolyse abzweigender, alternativer Abbauweg der Glukose, dessen Hauptfunktion nicht die Energiegewinnung ist, sondern

1. die Bereitstellung von NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) für Reduktionsschritte bei der Fettsäurebiosynthese (v. a. in der laktierenden Brust-

drüse, der Leber und im Fettgewebe), bei der Cholesterin- und Steroidhormonbiosynthese (v. a. in der Nebennierenrinde, den Ovarien und den Testes), im Rahmen der Entgiftung mittels Cytochrom P-450 und bei der Regeneration von Glutathion, sowie

2. die Bereitstellung von Ribosephosphaten für Nukleotidsynthesen (Löffler *et al.*, 2007, S. 368; Rassow *et al.*, 2012, S. 235).

Der Pentosephosphatweg spielt sich, wie auch die Glykolyse, im Zytosol ab und kann in zwei Abschnitte eingeteilt werden: einen oxidativen und einen nicht-oxidativen Abschnitt.

1.4.1 Der oxidative Abschnitt des Pentosephosphatweges

Im oxidativen Abschnitt des Pentosephosphatweges (Abbildung 1.1) wird die Hexose Glucose-6-Phosphat durch zweimalige Oxidation, Hydrolyse, spontane Decarboxylierung sowie Isomerisierung zur Pentose Ribose-5-Phosphat abgebaut. Diese kann als essenzieller Baustein für Nukleotidbiosynthesen verwendet werden (Löffler *et al.*, 2007, S. 365). Das dabei freiwerdende Kohlenstoffatom wird als Kohlendioxid (CO_2) abgeschieden. Die Aufnahme der Wasserstoffatome aus den beiden Oxidationsschritten erfolgt durch NADP^+ , sodass letztlich zwei NADPH entstehen, welche wiederum für reduktive, hydrierende Biosynthesen (siehe 1. unter 1.4) zur Verfügung stehen. Der oxidative Abschnitt des Pentosephosphatweges ist irreversibel, die Reaktionen können nicht in umgekehrter Richtung ablaufen (Löffler *et al.*, 2007, S. 365; Rassow *et al.*, 2012, S. 235).

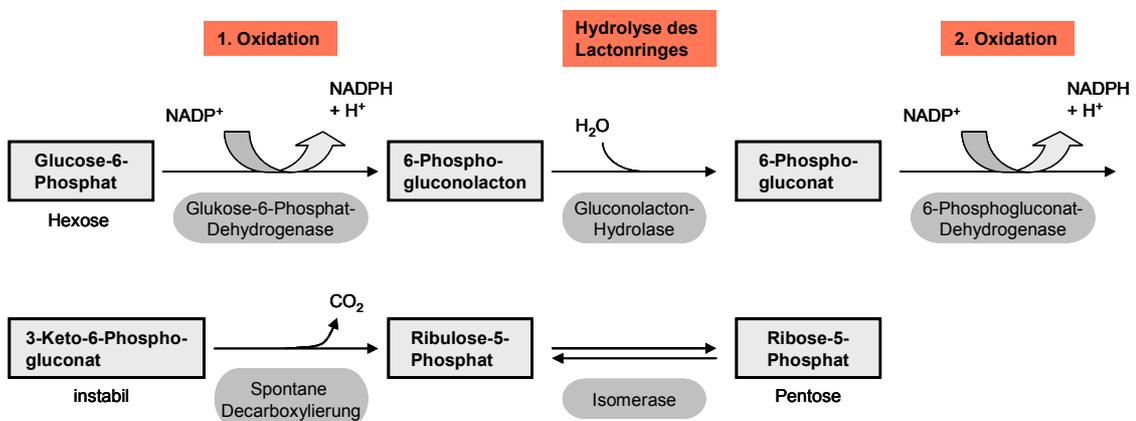


Abbildung 1.1: Der oxidative Abschnitt des Pentosephosphatweges. Abbau der Hexose Glucose-6-Phosphat zur Pentose Ribose-5-Phosphat unter Bildung von CO_2 und zwei NADPH. Streng genommen

endet der oxidative Abschnitt bereits mit Ribulose-5-Phosphat, es wird jedoch oft Ribose-5-Phosphat als Endprodukt angegeben (Abbildung modifiziert nach Rassow *et al.* (2012), S. 237, A-13.15).

1.4.2 Der nicht-oxidative Abschnitt des Pentosephosphatweges

Der nicht-oxidative Abschnitt des Pentosephosphatweges (Abbildung 1.2) schließt sich an den oxidativen Abschnitt an und dient dem Abbau von überschüssigem Ribose-5-Phosphat zu Metaboliten, die in die Glykolyse eingeschleust werden können. Die wesentlichen Schritte bestehen ausgehend von Ribose-5-Phosphat in einer Übertragung von C2- oder C3-Einheiten (Einheiten bestehend aus zwei oder drei Kohlenstoffatomen), sodass schließlich Fructose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat entstehen, die als Metabolite der Glykolyse in diese eingebracht werden können (Rassow *et al.*, 2012, S. 236 ff.). Der nicht-oxidative Abschnitt des Pentosephosphatweges ist vollständig reversibel und kann in umgekehrter Richtung ablaufen, wenn in einer Zelle in großem Umfang Ribose-5-Phosphat für Nukleotidsynthesen, jedoch kein NADPH benötigt wird (Rassow *et al.*, 2012, S. 236). Der Pentosephosphatweg liefert also mit Ribose-5-Phosphat einen essenziellen Baustein für die Synthese von Nukleotiden, und damit für die Synthese der Nukleinsäuren, sowie NADPH als Reduktionsagens. Nukleinsäuren sind nicht nur für die Proliferation normaler Zellen unentbehrlich, sondern auch für die von Tumorzellen (Boros *et al.*, 1998). Boros *et al.* (1997) stellten fest, dass über 85 % der neu synthetisierten Ribosen der Nukleinsäuren in Tumorzellen aus dem Pentosephosphatweg stammen und der weitaus größere Teil davon (85 %) wiederum aus dem nicht-oxidativen Abschnitt. Der nicht-oxidative Teil des Pentosephosphatweges scheint somit eine zentrale Rolle in der Bereitstellung von Ribosen für die Nukleinsäuresynthese und damit für die Zellproliferation zu spielen (Boros *et al.*, 1997). Ein wichtiges Enzym in diesem Abschnitt des Pentosephosphatweges, welches für die Übertragung von C2-Einheiten zuständig ist, ist die Transketolase. Die Familie der Transketolasen wird im Folgenden näher beleuchtet.

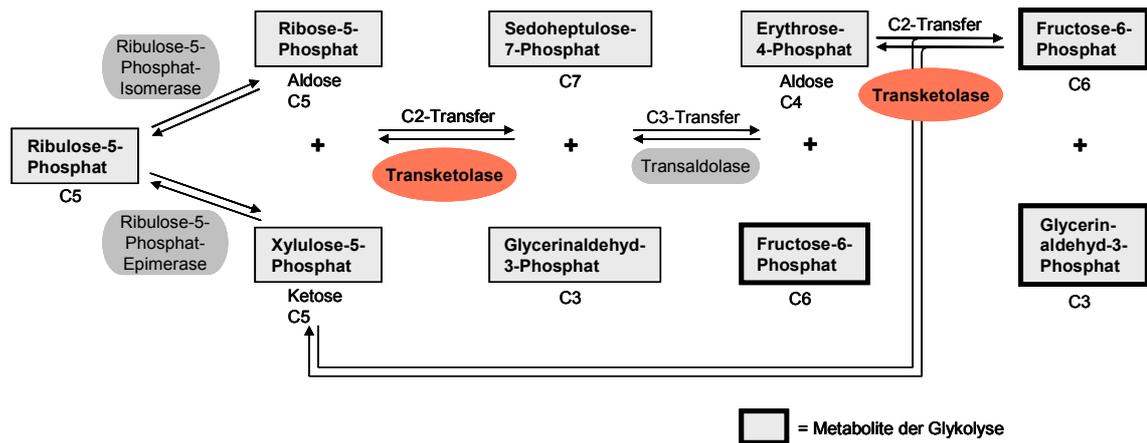


Abbildung 1.2: Der nicht-oxidative Abschnitt des Pentosephosphatweges. Abbau von Ribose-5-Phosphat durch Transketolase- und Transaldolasereaktionen mittels C2- und C3-Übertragungen zu Fructose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Diese Metabolite können in die Glykolyse eingespeist werden. Die Reaktionen des nicht-oxidativen Abschnittes sind vollständig reversibel (Abbildung modifiziert nach Rassow *et al.* (2012), S. 239, A-13.17).

1.5 Die Familie der Transketolasen und ihre Funktion

1.5.1 Die Transketolase

Die Transketolase ist ein Enzym, das essenzielle Schritte im nicht-oxidativen Abschnitt des Pentosephosphatweges katalysiert, nämlich den Transfer von C2-Einheiten von einer Ketose auf eine Aldose (Abbildung 1.2). Die Transketolase katalysiert zum einen die Bildung von Sedoheptulose-7-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) durch Übertragung einer C2-Einheit von Xylulose-5-Phosphat (X5P) auf Ribose-5-Phosphat. Zum anderen katalysiert das Enzym die Bildung von Fructose-6-Phosphat und GAP durch Transfer einer C2-Einheit von X5P auf Erythrose-4-Phosphat (Schenk *et al.*, 1998). Zwingend erforderliche Kofaktoren für die Aktivität der Transketolase sind Thiaminpyrophosphat (Vitamin B1) sowie zweiwertige Kationen wie Magnesium- (Mg^{2+}), Calcium- (Ca^{2+}), Mangan- (Mn^{2+}) oder Cobalt-Ionen (Co^{2+}) (Lindqvist *et al.*, 1992). Die Transketolase existiert in allen bisher untersuchten Organismen (Schenk *et al.*, 1998; Zhao & Zhong, 2009). Sie ist ein Homodimer mit zwei aktiven Zentren am Übergang der miteinander verbundenen identischen Monomere (Lindqvist *et al.*, 1992; Zhao & Zhong, 2009). Die Transketolase stellt zusammen mit der Transaldolase eine

reversible Verbindung zwischen zwei wichtigen Stoffwechselwegen, der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg, her. Dies erlaubt einer Zelle, sich an verschiedene Bedürfnisse anzupassen, wie etwa die Produktion von NADPH als Reduktionsäquivalent, von Ribose-5-Phosphat für die DNA-Synthese oder die Bereitstellung von Zwischenprodukten für die Glykolyse (Lindqvist *et al.*, 1992). Als essenzielles Enzym des nicht-oxidativen Abschnittes des Pentosephosphatweges nimmt die Transketolase eine zentrale Rolle in der Bereitstellung von Ribosen für die Nukleinsäuresynthese und damit für die Proliferation von (Tumor-)Zellen ein (Boros *et al.*, 1997; Rais *et al.*, 1999; Zhao & Zhong, 2009). Shimizu *et al.* (2013) konnten in hepatozellulären Karzinomen eine erhöhte Expression der beiden Enzyme Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Transketolase feststellen und damit die Bedeutung des Pentosephosphatweges in diesen Malignomen unterstreichen. Comin-Anduix *et al.* (2001) stellten fest, dass bei fortgeschrittenen Ehrlich-Aszites-Tumoren in Mäusen die Ergänzung von Thiamin das Tumorstadium über die Aktivierung der Transketolase signifikant förderte. Die Behandlung mit dem Transketolase-Inhibitor Oxythiamin führte dagegen zu einer Wachstumshemmung von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* (Boros *et al.*, 1997; Rais *et al.*, 1999). Daher sahen die Autoren in der Hemmung des Pentosephosphatweges, und speziell in der Hemmung der Transketolase, einen neuen Ansatz für zukünftige Antikrebstherapien (Boros *et al.*, 1997; Rais *et al.*, 1999). Die genuine Transketolase ist nur eines von drei Proteinen aus der Familie der Transketolasen, für die das menschliche Genom kodiert. Die weiteren Mitglieder der Enzymfamilie, die sogenannten (sog.) Transketolase-ähnlichen Proteine (Transketolase-*like* Proteine), werden nachfolgend besprochen.

1.5.2 Die Transketolase-*like* Proteine

Neben der genuine Transketolase (TKT) kodiert das menschliche Genom noch für zwei Transketolase-*like* Proteine, das Transketolase-*like* Protein 1 und 2 (TKTL1 und 2), die eine große Sequenzübereinstimmung mit der TKT aufweisen (Coy *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2012). Trotz der engen Verwandtschaft der drei Gene sind auch einige Unterschiede auszumachen. Das TKTL1-Gen befindet sich in der chromosomalen Region Xq28 (Coy *et al.*, 2005; Coy *et al.*, 1996) und damit in einer der Regionen, deren Gene verstärkt in Malignomen sowie im Rahmen des Zellzyklus transkribiert werden (Glinsky *et al.*, 2003a; Glinsky *et al.*, 2003b). Das TKT- und das TKTL2-Gen befinden sich dagegen nicht in einer derartigen chromosomalen Region (Coy *et al.*, 2005). Während sich das TKT-Gen am Genlocus 3p21.1 befindet (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE100000>).

nih.gov/gene/7086), ist das TKTL2-Gen am Genort 4q32.2 lokalisiert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84076>). Das TKT- und das TKTL1-Gen haben eine ähnliche Genstruktur, während das TKTL2-Gen ein intronloses Gen darstellt (Coy *et al.*, 2005). Die reifen mRNA-Transkripte sowohl des TKT- als auch des TKTL2-Gens besitzen Exon 3 Sequenzen oder Sequenzen, die homolog zu Exon 3 sind, wohingegen das TKTL1-mRNA-Transkript aufgrund einer Deletion das Exon 3 nicht beinhaltet (Coy *et al.*, 2005; Coy *et al.*, 1996). Somit fehlen dem TKTL1-Protein im Vergleich 38 Aminosäurereste (Schneider *et al.*, 2012). Stromabwärts dieser Deletion beträgt die Sequenzübereinstimmung zwischen TKTL1 und TKT 66 % auf DNA-Ebene und 63 % auf Proteinebene (Coy *et al.*, 2005). Die Übereinstimmung der Sequenzen zwischen TKTL1 und TKTL2 ist, mit 80 % auf DNA-Ebene und 77 % auf Proteinebene (Coy *et al.*, 2005), noch größer. Aufgrund dieser großen Ähnlichkeit zwischen TKTL1 und TKTL2 stellten Coy *et al.* (2005) die Theorie auf, dass vor der Deletion von Exon 3 möglicherweise eine intakte Kopie von TKTL1 über ein reverse Transkriptase vermitteltes Ereignis, welches nicht genauer spezifiziert wird, in das Genom integriert wurde und so TKTL2 entstand.

Während die enzymatische Funktion der genuinen TKT klar definiert ist (siehe 1.5.1 und Abbildung 1.2), wurde die biochemische und enzymatische Funktion von TKTL2 bisher nicht ausreichend untersucht und ist daher noch weitgehend unklar (Mitschke *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2012). Mitschke *et al.* (2010) stellten jedoch mittels Vergleich der Sequenzen von TKT und TKTL2 auf Proteinebene fest, dass TKTL2 zahlreiche Aminosäurereste fehlen, die für die Substratbindung und Katalyse erforderlich sind. Die Autoren gehen daher von einer, wenn überhaupt vorhandenen, lediglich geringen enzymatischen Transketolaseaktivität von TKTL2 aus (Mitschke *et al.*, 2010). Auch die Eigenschaften von TKTL1, insbesondere die Expression des Proteins in soliden Tumoren, seine Rolle bei der Proliferation und dem Metabolismus von Tumorzellen sowie seine mögliche enzymatische Aktivität sind nicht vollständig geklärt und werden in der verfügbaren Literatur sehr kontrovers diskutiert.

1.5.3 Das Transketolase-like Protein 1

1.5.3.1 TKTL1-Expression in Malignomen

Nach seiner Erstbeschreibung durch Coy *et al.* (1996) rückte das Transketolase-like Protein 1 (TKTL1) in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt vieler Tumorstudien. Den Grundstein dafür legten wiederum Coy *et al.* (2005), die in ihrer Publikati-

on TKTL1 als das einzige Mitglied der Enzymfamilie beschrieben, das in Karzinomen überexprimiert ist. TKT- und TKTL2-Transkripte hingegen zeigten in den von den Autoren untersuchten Karzinomgeweben keine Überexpression im Vergleich zu den entsprechenden gesunden Geweben (Coy *et al.*, 2005; Langbein *et al.*, 2006). Es folgten zahlreiche Publikationen, in denen eine Überexpression von TKTL1 in den verschiedensten soliden Tumoren wie Mamma- (Foldi *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2010), Zervix- (Kohrenhagen *et al.*, 2008), Ovarial- (Krockenberger *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2008), Magen- (Song *et al.*, 2015), Kolorektal- (Ahopelto *et al.*, 2016; Bentz *et al.*, 2013; Diaz-Moralli *et al.*, 2011; Schwaab *et al.*, 2011), Ösophagus- (Li *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015), Urothel- (Langbein *et al.*, 2006), Nierenzell- (Langbein *et al.*, 2008), nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Kayser *et al.*, 2011; Schultz *et al.*, 2008), malignen Melanomen (Jayachandran *et al.*, 2016) und Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Grimm *et al.*, 2014; Grimm *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2010; Volker *et al.*, 2007) beschrieben wurde. Die TKTL1-Überexpression wurde dabei in vielen Fällen als Vorhersage einer schlechten Überlebensprognose der Patienten gesehen (Ahopelto *et al.*, 2016; Grimm *et al.*, 2013; Jayachandran *et al.*, 2016; Kayser *et al.*, 2011; Krockenberger *et al.*, 2007; Langbein *et al.*, 2008; Langbein *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2012; Schwaab *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015; Volker *et al.*, 2007). Im Fall von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs und malignen Melanomen wurde die Überexpression von TKTL1 in Verbindung mit einer Hypomethylierung des TKTL1-Promotors gebracht (Jayachandran *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2010).

Darüber hinaus wurde TKTL1 eine bedeutende Rolle bei der Proliferation verschiedener Tumorzelllinien zugeschrieben. So konnte nach einer Suppression von TKTL1 mittels RNA-Interferenz eine Hemmung der Proliferation der Kolonkarzinomzelllinien LoVo (Hu *et al.*, 2007) und HCT-116 (Diaz-Moralli *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2009), der Magenkarzinomzelllinie AGS (Yuan *et al.*, 2010), der Pharynxkarzinomzelllinie FaDu (Smith *et al.*, 2009), der Zervixkarzinomzelllinie HeLa (Chen *et al.*, 2009), der Leukämiezelllinie THP-1 und der Prostatakarzinomzelllinie PC-3M (Diaz-Moralli *et al.*, 2016), den Ösophaguskarzinomzelllinien TE-1, KYSE150 (Li *et al.*, 2015) und EC1 (Shi *et al.*, 2015) sowie der Melanomzelllinie LM-MEL-59 (Jayachandran *et al.*, 2016) beobachtet werden. Im Fall der Ösophaguskarzinomzelllinien TE-1 und KYSE150 resultierte die Herabregulation von TKTL1 außerdem in einem Anstieg der Apoptoserate (Li *et al.*, 2015). Auch in den Nasopharynxkarzinomzelllinien CNE2 und HONE1 führte die TKTL1-Suppression zu einer signifikanten Reduktion des Zellüberlebens und zu

einem Anstieg der Apoptoserate (Dong & Wang, 2017). Darüber hinaus stellten Smith *et al.* (2009) und Sun *et al.* (2010) mittels ektopter TKTL1-Expression in den Karzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereiches JHU-O11 und JHU-O28 eine gesteigerte Proliferation der TKTL1-überexprimierenden Zellen fest. Diese *in vitro* Experimente konnten von Sun *et al.* (2010) und Yuan *et al.* (2010) mittels Xenotransplantation auch *in vivo* bestätigt werden. Chen *et al.* (2009) und Hu *et al.* (2007) konnten in den jeweils untersuchten Karzinomzelllinien ein höheres Expressionsniveau des TKTL1-Gens im Vergleich zu dem des TKT- und TKTL2-Gens feststellen.

Die potenzielle Beteiligung von TKTL1 bei der Karzinogenese, der Proliferation von Tumorzellen und die Überexpression in soliden Tumoren gaben Anlass dazu, TKTL1 als neuen Bio- beziehungsweise (bzw.) Tumormarker (Feyen *et al.*, 2012; Foldi *et al.*, 2007; Grimm *et al.*, 2013; Kayser *et al.*, 2011; Langbein *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2016; Staiger *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009), als potenzielles neues Onkogen (Smith *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010) oder auch als Tumorsuppressorgen (Li *et al.*, 2016), als neues *Cancer-Testis-Antigen* (Djureinovic *et al.*, 2016) sowie als mögliches Ziel für die Antitumorthherapie in Betracht zu ziehen (Chen *et al.*, 2009; Diaz-Moralli *et al.*, 2016; Diaz-Moralli *et al.*, 2011; Dong & Wang, 2017; Foldi *et al.*, 2007; Fritz *et al.*, 2012; Frohlich *et al.*, 2009; Grimm *et al.*, 2014; Jayachandran *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2015; Kayser *et al.*, 2011; Krockenberger *et al.*, 2010; Krockenberger *et al.*, 2007; Langbein *et al.*, 2008; Langbein *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015; Staiger *et al.*, 2006; Volker *et al.*, 2008; Volker *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010). Wie unter 1.5.1 bereits beschrieben, konnte durch Inhibition von Transketolase-katalysierten Reaktionen mittels Oxythiamin eine Wachstumshemmung von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden (Boros *et al.*, 1997; Rais *et al.*, 1999). Da TKTL1 das Mitglied der Enzymfamilie zu sein scheint, welches in der Hauptsache in Malignomen überexprimiert ist, gehen einige Autoren davon aus, dass TKTL1 das relevante Ziel für Anti-Transketolasetherapien in Karzinomen ist (Coy *et al.*, 2005; Kayser *et al.*, 2011; Langbein *et al.*, 2006; Staiger *et al.*, 2006). Bezüglich der Verwendung von TKTL1 als Tumormarker wurden bereits Untersuchungen zur Anwendung des sog. Epitop-Detektion-in-Monozyten(EDIM)-TKTL1-Bluttests veröffentlicht. Dieser Test beruht auf einem Nachweis von TKTL1 in zirkulierenden Makrophagen, welche zuvor Tumorzellen aufgenommen haben, und soll der frühen Detektion von soliden Tumoren, Rezidiven und Metastasen sowie der Beurteilung des Erfolges einer operativen Tumoresektion dienen (Coy, 2017; Feyen *et al.*, 2012; Grimm *et al.*, 2016a; Grimm *et al.*, 2016b;

Grimm *et al.*, 2016c; Grimm *et al.*, 2013; Jansen & Coy, 2013; Jansen & Walach, 2016; Todenhofer *et al.*, 2017).

Bezüglich der pathophysiologischen Relevanz von TKTL1 in Malignomen existieren in der verfügbaren Literatur jedoch auch gegenteilige Beobachtungen. So konnten Jayachandran *et al.* (2016) in Melanomzelllinien mit hoher TKTL1-Expression nach einer Behandlung mit Oxythiamin keine Hemmung der Proliferation der Zellen feststellen. Auch in der Mehrzahl der von Frohlich *et al.* (2009) untersuchten Schilddrüsenkarzinomzelllinien mit hoher TKTL1-Expression wies Oxythiamin eine unzureichende Wirksamkeit auf. Mayer *et al.* (2010) konnten in ihrer Publikation eine Expression von TKTL1 in benignen Leiomyomen nachweisen, welche in ihrer Ausprägung ähnlich zu der von Coy *et al.* (2005), Langbein *et al.* (2006) und Langbein *et al.* (2008) beschriebenen Expression in Malignomen ist. Zudem konnten Mayer *et al.* (2010) in sechs verschiedenen Karzinomzelllinien (HeLa, MCF-7, A549, HT1080, M21, TF-1) eine klare Expression von TKT-Transkripten nachweisen, wohingegen TKTL1- und TKTL2-Transkripte nicht oder lediglich schwach detektiert werden konnten. Die Autoren vertreten daher die Ansicht, dass der Metabolismus maligner Zellen nicht von TKTL1 reguliert wird und sehen aufgrund ihrer Untersuchungen keinen Anhalt dafür, dass die Expression des Proteins mit Malignomen assoziiert ist (Mayer *et al.*, 2010). Auch Kämmerer *et al.* (2015) konnten eine TKTL1-Expression auf Transkriptebene nur in zwei (JAR und U251) der siebzehn untersuchten Karzinomzelllinien nachweisen und beschrieben die TKTL1-Expression als eher seltenes Ereignis in einer breiten Auswahl von Zelllinien.

1.5.3.2 Die enzymatische Aktivität von TKTL1

Voraussetzung für eine Beteiligung von TKTL1 am Stoffwechsel und an der Proliferation von Tumorzellen ist, dass es sich bei dem Protein um eine enzymatisch aktive Transketolase handelt. Der Hauptunterschied zwischen dem TKTL1- und dem TKT-Protein liegt in der bereits erwähnten Deletion (siehe 1.5.2) von 38 Aminosäureresten am N-Terminus des TKTL1-Proteins (Coy *et al.*, 2005; Maslova *et al.*, 2012; Meshalkina *et al.*, 2013; Mitschke *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2012). Diese fehlenden Aminosäurereste sind Teil des aktiven Zentrums der TKT, also der Substratbindungsstelle. Sie beinhalten u. a. die Reste Histidin an Position 77 (His77) und Histidin an Position 110 (His110), die in den TKT-Sequenzen verschiedener Organismen zu 100 % konserviert sind (Schenk *et al.*, 1997) und eine kritische Rolle bei der Bindung des Ko-

faktors sowie bei der Substratbindung und Katalyse spielen (Maslova *et al.*, 2012; Mitschke *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2012). Coy *et al.* (2005) gingen davon aus, dass das Fehlen des His110-Restes, welcher homolog zu His103 der TKT aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) ist, dem Protein TKTL1 ein verändertes Substratspektrum, einen veränderten Reaktionsmodus sowie eine veränderte Thiaminaffinität verleiht. Bezüglich der Funktion von His103 in der TKT der Hefe konnte nachgewiesen werden, dass eine Mutation in diesem Aminosäurerest der TKT eine Ein-Substrat-Reaktion mit X5P als alleiniges Substrat ermöglicht (Selivanov *et al.*, 2004; Wikner *et al.*, 1995). Coy *et al.* (2005) schrieben dem TKTL1-Protein daher ebenso diese Fähigkeit zu und beschrieben die enzymatische Umsetzung von X5P als alleiniges Substrat zu GAP und einer C2-Einheit (wahrscheinlich Acetyl-CoA) durch TKTL1 in ihren Experimenten. Daneben konnten die Autoren jedoch auch die für die TKT typische enzymatische Reaktion (siehe 1.5.1) beobachten, wobei TKTL1 die zwei Substrate X5P und Ribose-5-Phosphat umsetzte (Coy *et al.*, 2005). Die Annahme von Coy *et al.* (2005), dass das Fehlen des His110-Restes im TKTL1-Protein zur beschriebenen Ein-Substrat-Reaktion führt, wurde von Diaz-Moralli *et al.* (2016) in ihren Experimenten unterstützt, indem die Autoren TKTL1 in THP-1 Zellen supprimierten und anschließend die Umsetzung von isotope-markierter Glukose zu isotope-markiertem Laktat im Pentosephosphatweg untersuchten. Auch Ahn *et al.* (2016), die ebenfalls Versuche mit isotope-markierter Glukose und deren Flussanalyse in CHO Zellen durchführten, gehen in ihrer Publikation von dieser Ein-Substrat-Reaktion aus, bei der Acetyl-CoA entsteht.

Hu *et al.* (2007), Chen *et al.* (2009), Yuan *et al.* (2010), Shi *et al.* (2015) und Diaz-Moralli *et al.* (2016) stellten nach Repression des TKTL1-Gens in verschiedenen Karzinomzelllinien eine Reduktion der Gesamt-TKT-Aktivität fest und schlussfolgerten daraus, dass TKTL1 eine wesentliche Rolle in der Gesamtaktivität der TKT spielt.

Es bestehen jedoch auch gegensätzliche Ansichten in der Literatur bezüglich der potenziellen enzymatischen Funktion von TKTL1. Während Coy *et al.* (2005) den Schluss zogen, dass das TKTL1-Gen für eine enzymatisch aktive Transketolase mit ungewöhnlichen enzymatischen Fähigkeiten kodiert, demonstrierten Schneider *et al.* (2012) und auch Meshalkina *et al.* (2013) mit einer gentechnisch erzeugten Deletionsvariante der TKT als Modell für TKTL1, dass das Fehlen der besagten 38 Aminosäurereste die völlige Inaktivität der TKT bewirkt. Nach Ansicht der Autoren wird dadurch die Bedeutung dieser Sequenz für die enzymatische Aktivität unterstrichen (Schneider *et al.*, 2012). Maslova *et al.* (2012) und Mitschke *et al.* (2010) stellten nach einem Abgleich

der Aminosäuresequenzen zwischen der humanen TKT und TKTL1 fest, dass dem TKTL1-Protein nicht nur einige für die Substratbindung erforderlichen Aminosäurereste, sondern auch einige für die Katalyse und Bindung des Kofaktors essenzielle Aminosäurereste fehlen und daher auch keine TKT-Aktivität erwartet werden kann. Bezüglich des Fehlens von His110 in der Aminosäuresequenz von TKTL1 wurde in früheren Studien bereits beobachtet, dass jeglicher Ersatz von His110 die humane TKT inaktiviert (Mitschke *et al.*, 2010; Singleton *et al.*, 1996).

1.5.3.3 TKTL1 und der Stoffwechsel von Tumoren

Coy *et al.* (2005) postulierten in ihrer Publikation, basierend auf den von ihnen angenommenen veränderten enzymatischen Eigenschaften von TKTL1, einen neuen Stoffwechselweg, der die aerobe Glykolyse von Tumorzellen („Warburg-Effekt“), Komplikationen des chronischen Diabetes, vaskuläre Schädigungen, den Alterungsprozess und neurodegenerative Krankheiten miteinander verbindet. Bezüglich des Tumorstoffwechsels ermöglicht laut Coy *et al.* (2005) eine erhöhte TKTL1-Aktivität im nicht-oxidativen Abschnitt des Pentosephosphatweges einen vermehrten anaeroben Glukoseabbau (zu Pyruvat und Laktat). Anaerobe Bedingungen kommen innerhalb von Tumoren häufig vor (siehe auch 1.3), sodass den Tumorzellen damit die Möglichkeit gegeben wird, sich an ein Wachstum ohne Sauerstoff zu adaptieren (Coy *et al.*, 2005). Eine mögliche Erklärung für den „Warburg-Effekt“, also dafür, dass Tumorzellen auch dann noch Glukose zu Laktat abbauen, wenn Sauerstoff vorhanden ist, sehen Coy *et al.* (2005) in der von ihnen detektierten Ein-Substrat-Reaktion von TKTL1. Das im Rahmen dieser Reaktion entstandene Acetyl-CoA soll dabei über eine negative Rückkopplung den Abbau von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ in den Mitochondrien (was in Anwesenheit von Sauerstoff geschieht) hemmen, woraufhin Pyruvat und schließlich Laktat akkumulieren. Insbesondere invasive Tumoren erhalten hierdurch einen selektiven Wachstumsvorteil, da die Matrixdegradation und Tumordinvasion in benachbarte Gewebe erleichtert wird (Coy *et al.*, 2005). Passend hierzu konnten Langbein *et al.* (2006), Li *et al.* (2015), Song *et al.* (2015) und Jayachandran *et al.* (2016) eine positive Korrelation zwischen der TKTL1-Expression und der Invasion von soliden Tumoren oder Karzinomzelllinien herstellen. Zudem sind Coy *et al.* (2005) der Ansicht, dass das durch die Ein-Substrat-Reaktion entstandene Acetyl-CoA bei Anwesenheit von Sauerstoff über den Citratzyklus und die Atmungskette oxidiert wird und so eine effiziente Energieversorgung der Tumorzellen mit ATP gewährleistet werden kann (Coy *et al.*, 2005). Laut Coy *et al.* (2005) wäre also

aufgrund der Möglichkeit, dass TKTL1 zusätzlich zur herkömmlichen Zwei-Substrate-Reaktion auch die beschriebene Ein-Substrat-Reaktion umsetzen kann, ein anaerober Glukoseabbau (auch bei Anwesenheit von Sauerstoff) möglich, der gleichzeitig mehr Energie zur Verfügung stellt als die Glykolyse. Karzinomen mit einer Überexpression von TKTL1 wäre es nach Angabe der Autoren somit möglich, große Mengen an Glukose zu verbrauchen und entsprechend große Mengen an Laktat zu generieren. Diese Tumoren würden damit von erhöhten Blutzuckerspiegeln profitieren (Coy *et al.*, 2005). Basierend auf dieser Annahme wird seit einigen Jahren eine „ketogene Diät“ für Krebspatienten beworben, die eine strenge Kohlenhydratrestriction in Verbindung mit einer fett- und eiweißreichen Ernährung vorsieht, mit dem Ziel, dem Tumor die für ihn essenzielle Glukose vorzuenthalten und so das Tumorwachstum zu begrenzen (Chung & Park, 2017; Coy & Franz, 2009; Coy *et al.*, 2005; Jansen & Walach, 2016; Kämmerer *et al.*, 2016; Kämmerer *et al.*, 2010). Diese Diäten werden jedoch sehr kontrovers diskutiert (Jacob & Weis, 2012) und von Fachgesellschaften wie der Deutschen Krebsgesellschaft oder der Deutschen Gesellschaft für Ernährung derzeit nicht empfohlen (siehe Stellungnahme zur ketogenen und kohlenhydratarmen Diät der Deutschen Krebsgesellschaft unter www.krebsgesellschaft.de und Presseinformation der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. unter www.dge.de).

Passend zu den Annahmen von Coy *et al.* (2005) resultierte eine Suppression von TKTL1 in der Melanomzelllinie LM-MEL-59 (Jayachandran *et al.*, 2016) und in der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 (Xu *et al.*, 2009) in einer Reduktion des Glukoseverbrauchs sowie der Laktatproduktion und umgekehrt bewirkte die ektope Expression von TKTL1 in der Melanomzelllinie LM-MEL-44 einen vermehrten Glukoseverbrauch und eine erhöhte Laktatproduktion (Jayachandran *et al.*, 2016). Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass TKTL1 die aerobe Glykolyse in Melanomen fördert (Jayachandran *et al.*, 2016). Kämmerer *et al.* (2015) hingegen konnten in den von ihnen untersuchten Karzinomzelllinien keinen Zusammenhang zwischen einer TKTL1-Expression und dem Glukoseverbrauch sowie der Laktatproduktion feststellen.

Wie bereits zuvor beschrieben (siehe 1.3) ist der „Warburg-Effekt“, also die aerobe Glykolyse, ein häufiges Phänomen in Karzinomen. Sun *et al.* (2010) postulieren in ihrer Publikation ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der TKTL1-Überexpression in Malignomen und der aeroben Glykolyse. Den zugrunde liegenden Mechanismus beschreiben sie dabei wie folgt: Die Überexpression von TKTL1 im Pentosephosphatweg führt zu einer erhöhten Produktion von Fruktose-6-Phosphat und GAP, welche in die

Glykolyse eingespeist werden. Die damit einhergehende gesteigerte Bildung von Pyruvat und Laktat resultiert letztlich in der konstitutiven normoxischen Stabilisierung von HIF-1, wodurch die aerobe Glykolyse auch unter Anwesenheit von Sauerstoff unterhalten wird (Sun *et al.*, 2010) (siehe auch 1.3). Die Autoren gehen dabei allerdings nur von der klassischen Zwei-Substrate-Transketolasereaktion aus (Sun *et al.*, 2010). Setzt man diese enzymatische Reaktion im nicht-oxidativen Teil des Pentosephosphatweges voraus, kann eine Überexpression von TKTL1 über eine erhöhte Produktion von Ribose-5-Phosphat und die damit einhergehende Möglichkeit zur Nukleinsäuresynthese auch die Tumorzellproliferation unterstützen.

1.6 Zielsetzung

Seit seiner Erstbeschreibung wurde TKTL1 eine große Bedeutung im Stoffwechsel von Tumoren und damit auch eine potenzielle klinische Relevanz zugesprochen. In zahlreichen Publikationen wurde die Überexpression des Proteins in soliden Tumoren und eine damit verbundene schlechte Prognose der Patienten beschrieben und TKTL1 daher als prognostischer Marker und potenzielles therapeutisches Ziel bei der Krebstherapie angesehen. Eine erhöhte Proliferation von Tumorzellen sowie die aerobe Glykolyse („Warburg-Effekt“) in Tumoren wurden in Zusammenhang mit TKTL1 gebracht. Der Nachweis von TKTL1 erfolgte dabei sowohl auf Proteinebene mittels Immunhistochemie, Immunzytochemie und Immunoblot als auch auf Transkriptebene. Bei Durchsicht der vorhandenen Literatur fiel auf, dass die Expressionsmuster von TKTL1 nicht einheitlich waren, insbesondere was die biochemische Detektion in Immunoblots betrifft. Hier konnten in den einzelnen Publikationen Proteinbanden verschiedener Größen festgestellt werden. Zudem war interessant, dass die absolute Mehrzahl der immunhistochemischen Experimente, mit denen eine Überexpression von TKTL1 in zahlreichen Karzinomen nachgewiesen wurde, an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten und mit Citrat behandelten Geweben durchgeführt wurde. Ein formaler Nachweis der TKTL1-Überexpression an nativem Gewebe fehlte. Auch bezüglich des Nachweises von TKTL1 auf Transkriptebene in verschiedenen malignen Zelllinien und hinsichtlich der Beteiligung von TKTL1 am Stoffwechsel maligner Zellen fanden sich auffallend diskrepante Ergebnisse in der Literatur.

Dies gab Anlass eigene Untersuchungen zur TKTL1-Expression und -Funktion durchzuführen. Zunächst sollte die Expression von TKTL1 in verschiedenen Karzinomzelllinien mit unterschiedlichen Methoden untersucht werden. Dafür war sowohl die Analyse

der Expression auf Proteinebene mittels Immunoblot und Immunzytochemie als auch auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR vorgesehen. Um ein eindeutiges Expressionsmuster des interessierenden Proteins TKTL1 mit genuin negativen und positiven Zellen als Kontrollen für diese Experimente zu erhalten, sollte zuvor ein stabiles Expressionssystem für TKTL1 etabliert werden. Zudem sollte die Expression von TKTL1 mittels Immunhistochemie in nativem, kryokonserviertem Karzinomgewebe im Vergleich zu Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem und HOPE-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe untersucht werden, um mögliche Unterschiede in den Expressionsmustern zu eruieren. Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der TKTL1-Funktion. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob die TKTL1-Expression Zellen einen Proliferationsvorteil verschafft. Hierfür sollte zunächst das generierte Überexpressionssystem in Form stabiler Transfektanten verwendet werden. Weitere Experimente sollten sich aus den gewonnenen Resultaten ergeben.

2 MATERIAL

2.1 Antikörper

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Antikörper (Katalognummer)	Herkunft/Isotyp	Bezugsquelle
Anti-Aktin (sc-1616)	Ziege/IgG	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
Anti-Maus biotinyliert (BA-2000)	Pferd/IgG	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Anti-TKTL1, Klon JFC12T10 (T001)	Maus/IgG _{2b}	Freundlicherweise von Dr. M. Böhl (R-Biopharm) zur Verfügung gestellt.
HRP Anti-Maus (R 0480)	Ziege/IgG	Dako, Glostrup (Dänemark)
HRP Anti-Ziege (P0449)	Kaninchen/IgG	Dako, Glostrup (Dänemark)
Isotyp Kontrolle (M5534)	Maus/IgG _{2b}	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Alle nicht aufgeführten und in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von Amersham Biosciences, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Artikel	Bezugsquelle
Acrylamid, Protogel ultra pure	Schröder Diagnostics, Stuttgart
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), Tabletten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammonium Persulfat	Bio-Rad, Kalifornien (USA)
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck KGaA, Darmstadt
Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Aquatex	Merck KGaA, Darmstadt

Azeton	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Citratpuffer pH 6,0 (Target Retrieval Solution)	Dako, Glostrup (Dänemark)
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylformamid	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
ECL Blotting Substrate	Pierce, Rockford (USA)
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Formaldehydlösung 37 %	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Serva GmbH, Heidelberg
Glyzerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HOPE® II Lösung	DCS GMBH & CO. KG, Hamburg
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore GmbH, Schwalbach
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Luria Broth (Miller's Modification)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Normalserum vom Pferd 2,5 %	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Nukleotide (dNTPs, dATPs)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Organische Lösungsmittel, Alkohole	Merck KGaA, Darmstadt
Paraffin, Roti®-Plast	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
PBS-Tabletten (Phosphate Buffered Saline)	Invitrogen, Karlsruhe
PCR Reagenzien	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Plasmocin	InvivoGen, San Diego (USA)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Puromycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amersham Biosciences, Freiburg
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Transfektionsreagenz „MATra-A“	IBA GmbH, Göttingen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck KGaA, Darmstadt
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Trypsin / EDTA Lösung	Biochrom AG, Berlin
Tween®	Serva GmbH, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck KGaA, Darmstadt
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid)	Biomol GmbH, Hamburg
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 3: Verwendete Kits

Kit	Bezugsquelle
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford (USA)
HOPE® I Kit	DCS GMBH & CO. KG, Hamburg
Jetstar Plasmid Purification Maxi Kit	Genomed GmbH, Löhne
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
PCR Cloning Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Reverse Transcription System	Promega, Madison (USA)

RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Vectastain® Elite ABC Kit (Standard)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

2.3 Enzyme und Größenmarker

Tabelle 4: Eingesetzte Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Restriktionsenzyme, Puffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot New England BioLabs, Schwalbach
Proteinase Typ XXIV	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RNase A	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase, Puffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Tabelle 5: Eingesetzte Größenmarker

Standard	Bezugsquelle
Gene Ruler™ DNA-Ladder (50 bp, 1 kb)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Proteingrößenstandard „BenchMark™“	Invitrogen, Karlsruhe

2.4 Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegel-Elektrophorese-Dokumentation	Cybertech CS1, Berlin
Agarosegel-Elektrophoresekammern	Amersham Biosciences, Freiburg
Blotting Kammer	Bio-Rad, Kalifornien (USA)
CO ₂ -Inkubator Edelstahl CB 150	Binder, Tuttlingen
Durchflusszytometer „FACSCalibur™“	Becton Dickinson, Heidelberg

Elektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad, Kalifornien (USA)
ELISA-Reader EI _x 800	Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)
Filmentwicklungskassette	Amersham Biosciences, Freiburg
Filmentwicklungsmaschine	Optimax Laborgeräte, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Gefriermikrotom CM 1900	Leica, Bensheim
Gefrierschrank (-20°C, -80°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Gewebeeinbettautomat „Shandon Hypercenter XP“	Shandon GmbH, Frankfurt am Main
Glaswaren Schott	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Heraeus, Hanau
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer mit Heizblock	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroliter-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Mikrowelle	AEG, Berlin
Phasenkontrastmikroskop „Standard 25“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
pH-Meter	WTW, Weilheim
RoboCycler® Gradient 96	Stratagene, La Jolla (USA)
Rotationsmikrotom RM 2135	Leica, Bensheim
Schüttelinkubatoren Certomat®	Braun Biotech, Melsungen
Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus, Hanau
Stickstoff-Kühlagereinrichtung	Messer Cryotherm, Kirchen/Sieg
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Mikrophotometer „GeneQuant Pro“	Pharmacia, Erlangen
Vortex Mixer	IKA Works, Inc., Wirmington (USA)
Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf AG, Hamburg Sorvall, Bad Homburg Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zyto-System	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
3 MM Whatman-Papier	Bender & Hobein GmbH, München
Einmalpipetten	Costar, New York (USA)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Kryogefäße	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Objektträger SuperFrost® Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Menasha (USA)
PCR Softstrips	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen	Gilson International, Bad Camberg
Pipettenspitzen (gestopft)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
QiaShredder™	Qiagen GmbH, Hilden
Röhrchen, steril, Zellkultur	Becton Dickinson, Heidelberg Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Skalpelle	pfm medical AG, Köln
Sterilfilter	Millipore GmbH, Schwalbach
Tissue-Kassetten	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tissue-Tek® Cryomold® Einbettgefäße	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Transfermembran Immobilon-P (0,45 µm)	Zefa-Laborservice GmbH, Harthausen
Zählkammern Fast Read 102	Biosigma, Cona (Italien)
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Zellkultur-Multiloch-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugengefäße 1,5 / 2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifugengefäße 1,5 ml (Nucleasefrei)	Costar, New York (USA)

2.6 Dienstleistungen

Tabelle 8: In Anspruch genommene Dienstleistungen

Dienstleistung	Firma
DNA-Sequenzierung	Sequiserve, Vaterstetten
Oligonukleotidsynthese	Metabion international AG, Martinsried

2.7 Plasmide

Tabelle 9: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle
141pCAG-Δ (141 pCAG-3SIP)	Kontrollvektor, ohne Insertionen, Puromycinresistenz, CMV, SV40, IRES	Prof. Bornkamm (Helmholtz Zentrum München)
141pCAG-TKTL1	TKTL1 in 141pCAG-Δ	Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kloniert
pBluescriptR-TKTL1	TKTL1 in pBluescriptR, Ampicillinresistenz, T3/T7, pUC	ImaGenes, Berlin
pDrive	Klonierungsvektor, Ampicillin-/Kanamycinresistenz, T7/Sp6	Qiagen GmbH, Hilden

2.8 Oligonukleotide

2.8.1 Primer

Tabelle 10: Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Bezugsquelle
RT-PCR:		
GAPDH-FW	TGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGA	Metabion international AG, Martinsried
GAPDH-BW	AGAACATCATCCCTGCCTCTACTG	Metabion international AG, Martinsried
TKTL1-FW	GGACAATCTTGTGGCAACCT	Metabion international AG, Martinsried
TKTL1-BW	GTGTCACCATCCAGCACAAC	Metabion international AG, Martinsried

Klonierung:		
FW-TKTL1-NheI	GTTGCTAGCGCCGCCACCATGGCG-GATGCTGAGGCGAGG	Metabion international AG, Martinsried
BW-TKTL1-NheI	GGTCTCGCTAGCTTACTATTAGTT-CAGCAACATGCATT	Metabion international AG, Martinsried

2.8.2 siRNA (*short interfering RNA*)

Tabelle 11: Verwendete siRNAs

SiRNA	Sequenz (5'-3')	Bezugsquelle
TKTL1-siRNA	GUCGUUUGUGGAUGUGGCA dTdT	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
TKTL1-siRNA	UGCCACAUCCACAAACGAC dTdT	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Kontroll-siRNA	UCGUCCGUAUCAUUUCAAU dTdT	Eurogentec, Seraing (Belgien)
Kontroll-siRNA	AUUGAAAUGAUACGGACGA dTdT	Eurogentec, Seraing (Belgien)

2.9 Bakterien

Tabelle 12: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Bezugsquelle
E. coli DH10B	F-, endA1, recA1, galE15, galK16, nupG, rpsL, Δ lacX74, Φ 80lacZ Δ M15, araD139, Δ (ara, leu) 7697, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), λ -	Invitrogen, Karlsruhe
E. coli DH5 α	F-, F80dlacZDM15, D(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, l-, thi-1, gyrA96, relA1	Invitrogen, Karlsruhe

2.10 Zelllinien

Tabelle 13: Verwendete Zelllinien

Zelllinie*	Ursprung	Bezugsquelle/Bemerkung
Ant-1	Hypopharynxkarzinom	In unserem Labor generiert

FaDu	Pharynx-Plattenepithelkarzinom	ATCC, Nr. HTB-43
HCT-8	Kolon-Adenokarzinom	ATCC, Nr. CCL-244
HEK293	Humane embryonale Niere	(Graham <i>et al.</i> , 1977)
293pCAG-Δ**	Humane embryonale Niere	HEK293 stabil transfiziert mit dem Vektor 141pCAG-Δ
293pCAG-TKTL1**	Humane embryonale Niere	HEK293 stabil transfiziert mit dem Vektor 141pCAG-TKTL1
HeLa	Zervix-Adenokarzinom	ATCC, Nr. CCL-2
MCF-7	Mamma-Adenokarzinom	ATCC, Nr. HTB-22
PCI-1	Hypopharynxkarzinom	Pittsburgh Cancer Institute
PCI-13	Hypopharynxkarzinom	Pittsburgh Cancer Institute
SK-BR-3	Mamma-Adenokarzinom	ATCC, Nr. HTB-30
THP-1	Akute monozytäre Leukämie	Suspensionszelllinie; Freundlicherweise von Dr. M. Böhl (R-Biopharm) zur Verfügung gestellt.

* Mit Ausnahme der THP-1 Zelllinie handelt es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien um adhärenz Zellen.

** In dieser Arbeit etablierte Zelllinien.

2.11 Gewebe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbemethoden an makroskopisch gesunden Geweben sowie Tumorgeweben angewandt. Die Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München liegt unter dem Titel „Identifikation und Validierung neuer Tumor-Marker bei Plattenepithelkarzinomen“ (087/03) vor. Die Patienten wurden über die Verwendung der Gewebeproben für wissenschaftliche Zwecke aufgeklärt und willigten in diese ein. Die Bezugsquellen der verwendeten Gewebe sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Bezugsquellen der verwendeten Gewebearten

Gewebeart	Bezugsquelle
Larynxkarzinom, Larynxschleimhaut, Gaumenbogenschleimhaut	Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München, Großhadern

Kolonmukosa	Freundlicherweise von PD Dr. Philip Went (Pathologie des Universitätsspitals Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.
-------------	--

3 METHODEN

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von Zelllinien unter Standardbedingungen

Alle Arbeiten wurden steril unter einer Sicherheitswerkbank (Heraeus) durchgeführt. Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen konstant bei 37 °C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂, 95 % Raumluft sowie 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Heraeus) kultiviert. Als Medium für alle adhärenen Zellen diente dabei *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), ergänzt um 10 % fetales Kälberserum (FKS) und 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin). Als weiteres Antibiotikum wurde Plasmocin in einer Konzentration von 0,02 % beigefügt, um einer eventuellen Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen vorzubeugen. Zur Kultivierung und Selektion stabiler Transfektanten (293pCAG-Δ und 293pCAG-TKTL1) wurde dem Medium außerdem Puro-mycin (1 µg/ml) hinzugegeben.

Die Subkultivierung adhärenter Zellen erfolgte alle 2 – 3 Tage. Dabei wurde das alte Medium aus den Kulturflaschen entfernt und die anhaftenden Zellen mit Phosphat-gepufferter Lösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen, um Reste des fetalen Kälberserums zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit einer 0,05 % Trypsin-/0,02 % EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst und die Zellsuspension mit frischem Medium verdünnt. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen in gewünschter Dichte in einer Kulturflasche belassen. Die überschüssigen Zellen wurden entweder zur Herstellung von Zellpellets genutzt, für weitere Versuche ausplattiert oder verworfen. Als Standardmedium für die Suspensionszelllinie THP-1 wurde das *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 Medium verwendet, dem 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 1 % Glutamin zugefügt wurde. Alle 2 – 3 Tage wurden ca. 2/3 der Zellen abgesaugt und der Rest zur weiteren Kultivierung mit frischem Medium verdünnt.

Alle nötigen Zentrifugationsschritte wurden jeweils bei 280 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur ausgeführt.

3.1.2 Kultivierung von Zelllinien unter restriktiven Bedingungen

Neben der Kultivierung unter Standardbedingungen (siehe 3.1.1) wurden die stabilen Transfektanten 293pCAG- Δ und 293pCAG-TKTL1 für weitere Versuche unter restriktiven Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden hierfür unter hypoxischen Bedingungen (0,1 % O₂, 5 % CO₂, Rest Stickstoff) in einem CO₂-Inkubator (Binder) oder unter Entzug von Wachstumsfaktoren (1 % FKS) bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen gehalten.

3.1.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zelllinien

Zur dauerhaften Aufbewahrung der Zelllinien wurden die Zellen, wie in 3.1.1 beschrieben, mit einer Trypsin/EDTA-Lösung geerntet, in PBS gewaschen und abzentrifugiert. Alle nötigen Zentrifugationsschritte erfolgten bei 280 g für 5 Minuten. Anschließend wurden die Zellpellets (ca. 10⁶ Zellen) mit je 1 ml Einfriermedium (10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), 40 % FKS, 50 % DMEM) resuspendiert und in 1,8 ml Kryogefäßen (Nunc) bei -80 °C einen Tag lang eingefroren. Um ein schonendes Einfrieren der Zellen zu gewährleisten, erfolgte die Lagerung in mit Isopropanol gefüllten Behältnissen oder geschlossenen Styroporboxen. Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte schließlich in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Zur erneuten Inkulturnahme wurden die tiefgefrorenen Zellen zügig in frischem Kulturmedium aufgetaut, zur Entfernung des DMSO einmal abzentrifugiert, mit frischem Medium resuspendiert und sodann zur weiteren Kultivierung in eine Kulturflasche gegeben.

3.1.4 Bestimmung von Zellzahlen

Die zu vergleichenden Zelllinien wurden in der jeweils gleichen Ausgangszellzahl ausplattiert und zu definierten Zeitpunkten geerntet. Das Auszählen der Zellen erfolgte unter dem Mikroskop in Fuchs-Rosenthal-Kammern (Biosigma), in die ein Gemisch aus 10 μ l Zellsuspension und 10 μ l 0,2%iger Trypanblaulösung eingebracht wurde. Die Trypanblaulösung diente hierbei der Differenzierung von lebenden und toten Zellen. Tote Zellen nehmen den blauen Farbstoff auf, während lebende ungefärbt bleiben.

3.1.5 Transfektion von Zellen

Das Einbringen von spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA oder von Plasmiden in Zellen erfolgte mittels Magnet-assistierter Transfektion (MATra-A Reagenz, IBA) in

Verbindung mit Magnetplatten. Die Zellen wurden vor der Behandlung in gewünschter Dichte ausplattiert und 24 Stunden lang unter Standardbedingungen kultiviert. Nachdem das Medium der Zellen durch frisches ersetzt wurde, um potenziell störende Stoffwechselprodukte zu beseitigen, erfolgte die Transfektion gemäß Protokoll des Herstellers. Zur Selektion stabiler Transfektanten wurden die Zellen nach der Transfektion mit dem entsprechenden Plasmid in einem Medium kultiviert, dem der passende Selektionsmarker zugesetzt wurde.

3.1.6 Herstellung von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Zelllysaten für die Bestimmung der Proteinexpression mittels Immunoblot wurden die Zellen, wie unter 3.1.1 beschrieben, geerntet und abzentrifugiert. Die resultierenden Zellpellets wurden nach einmaligem Waschen mit PBS in Lysispuffer aufgenommen und 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 16 000 g für 10 Minuten, um unlösliche Zellbestandteile vom Gesamtzelllysat zu trennen. Dieses konnte schließlich als Überstand abgenommen und die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA™ Protein Assay Kits (Pierce) sowie eines ELISA-Readers (Bio-Tek Instruments) durchgeführt werden.

Lysispuffer: 49,5 ml PBS

0,5 ml 1 % Triton X-100

Complete Protease Inhibitor Cocktail (2 Tabletten/50 ml)

3.2 Immunoblot

Zur Analyse der Proteinexpression in Zellen wurden Immunoblots (Western Blots) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Transfer von zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran, von der aus sie mittels Immundetektion und über lichtempfindliche Filme sichtbar gemacht werden (Rassow *et al.*, 2012, S. 486).

Den Gesamtzelllysaten (siehe 3.1.6) wurden zunächst jeweils 5 µl Lämmli-Puffer zugegeben und das Gemisch anschließend 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht, um eine Denaturierung der Proteine zu erzielen. Die aufzutrennende Gesamtproteinmenge betrug je nach Versuch zwischen 20 – 50 µg je Probe. Die Auftrennung der Proteine nach Ladung und Größe erfolgte in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel mittels Elektrophorese in

Laufpuffer unter standardisierten Laufbedingungen (Fokussierung: 15 Min., 15 mA/Gel, 180 V; Auftrennung: 30 mA/Gel, 180 V). Zur Proteingrößenbestimmung wurde ein Protein-Standard (BenchMark, Invitrogen) mit auf das Gel aufgetragen.

Das sog. *Blotting*, also die Übertragung der Proteine auf eine Immobilon-P Transfermembran (Zefa Laborservice), erfolgte in Blottingpuffer mittels Anlegen eines elektrischen Feldes (100 V, 500 mA, 45 Min.). Die Proteine wandern dabei unter Beibehaltung des ausgebildeten Bandenmusters aus dem Gel auf die Membran. Diese wurde vor dem *Blotting* in Methanol aktiviert und nach erfolgter Übertragung zur Fixierung der Proteine nochmals kurz in Methanol eingelegt. Anschließend wurde die Membran für 30 – 60 Minuten in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen bei der folgenden Immundetektion der Proteine zu vermeiden. Die Immundetektion erfolgte zunächst mittels Inkubation der Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht mit einem spezifischen Primärantikörper (TKTL1: JFC12T10; Aktin: sc-1616; 1:1000 in Primärantikörperpuffer). Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer folgte die Behandlung der Membran mit dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper für 30 – 90 Minuten bei Raumtemperatur (1:5000 in Blockpuffer). Die Peroxidase-Reaktion zur Visualisierung der Proteine wurde entweder mit Hilfe des Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrats (Millipore) oder des ECL Blotting Substrats (Pierce) angeregt. Die dabei frei werdende Chemilumineszenz führte zu einer Schwärzung lichtempfindlicher Filme und somit zur Abbildung des Proteinbandenmusters auf einem Röntgenfilm.

Um gebundene Antikörper wieder von der Membran zu entfernen, erfolgte eine 25-minütige Inkubation mit *Stripping*-Puffer, auf die ein Waschschriff mit destilliertem Wasser sowie drei Waschschriffe mit Waschpuffer folgten.

• Lämmli-Puffer:	140 mM Tris-HCl pH 7,0; 30 % Glycerin; 4 % SDS; 16 % Mercaptoethanol; 0,1 % Bromphenolblau
• Sammelgel (4 %):	30 % Acrylamid; 2 M Tris pH 6,8; 0,5 M EDTA
• Trenngel (12 %):	30 % Acrylamid; 2 M Tris pH 8,9; 0,5 M EDTA
• 10x Laufpuffer:	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1 % SDS
• 10x Blottingpuffer:	250 mM Tris, 1,26 M Glycin
• Waschpuffer:	PBS mit 0,2 % Tween
• Blockpuffer:	5 % Milchpulver in Waschpuffer
• Primärantikörperpuffer:	3 % BSA und 0,1 % Natriumazid in Waschpuffer
• Strippingpuffer:	0,2 M Tris, 1 % SDS, pH 2.5

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolierung und reverse Transkription

Zur Analyse der mRNA-Expression (*messenger RNA*, Boten-RNA) von Zielgenen in den verwendeten Zelllinien wurde zunächst die gesamtzelluläre RNA mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA vorzubeugen, erfolgte die Behandlung der Proben mit RNase-freier DNase. Darüber hinaus wurde die RNA vor der weiteren Verwendung stets mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ohne vorherige reverse Transkription auf Kontaminationen mit genomischer DNA hin untersucht. Zur Messung des RNA-Gehaltes der Proben diente das UV-Mikrophotometer „GeneQuant Pro“ (Pharmacia). Von jeder Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Um die extrahierte RNA mittels PCR amplifizieren und via Gelelektrophorese visualisieren zu können, musste diese zuerst mit Hilfe der reversen Transkription (Reverse Transcription System, Promega) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dafür wurde 1 µg RNA eingesetzt und gemäß Herstellerangaben verfahren. Die so gewonnene cDNA stand nun für die Amplifikation mit Hilfe spezifischer Primer in der PCR zur Verfügung. Damit konnte das Expressionsniveau der Ziel-mRNA in den Zellen evaluiert werden.

3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (englisch *Polymerase Chain Reaction*, PCR) erfolgt die Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen *in vitro* mit Hilfe komplementärer Primer (Rassow *et al.*, 2012, S. 482f.; Saiki *et al.*, 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR eingesetzt, um DNA-Fragmente für Klonierungsschritte zu amplifizieren und um das Expressionsniveau von Ziel-mRNA in Zellen zu untersuchen (siehe 3.3.1).

Die PCR erfolgte in einem Reaktionsvolumen von insgesamt 20 µl, welches sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte:

Tabelle 15: Zusammensetzung des PCR Reaktionsansatzes

Volumen	Reagenz
2 µl	10x Taq Buffer mit KCl

2 µl	dNTPs (2mM)
2 µl	MgCl ₂ (25mM)
1 µl	<i>Forward-Primer</i>
1 µl	<i>Backward-Primer</i>
1 µl	Taq DNA Polymerase (1U/µl)
1 µl	DNA/RNA
10 µl	H ₂ O

Um eine Verunreinigung der verwendeten Reagenzien auszuschließen, wurde dem Reaktionsansatz als Kontrolle Wasser anstelle von DNA hinzugefügt. Die PCR-Gefäße (Biozym) mit dem Reaktionsansatz wurden in einen RoboCycler® (Stratagene) gegeben, in welchem schließlich die Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz erfolgte. Die Anzahl der Zyklen richtete sich dabei nach der Art der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz (TKTL1: 25 – 40 Zyklen, GAPDH: 22 Zyklen). Jeder Zyklus der PCR lief dabei nach einem definierten Schema ab:

Tabelle 16: Phasen eines PCR-Zyklus

Zeit	Phase	Temperatur
30s	Denaturierungsphase	95 °C
30s	Annealingphase	60 – 64 °C*
30s	Elongationsphase	72 °C

* Je nach Schmelzeigenschaften der verwendeten Primer

Der Nachweis der amplifizierten DNA erfolgte mit Hilfe einer Agarose Gelelektrophorese und einer Anfärbung der PCR-Amplifikate mittels Ethidiumbromid.

3.3.3 Agarose Gelelektrophorese

Die Größenauftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in Agarosegelen unterschiedlicher Konzentration (1 % oder 1,5 % je nach Größe des aufzutrennenden Fragmentes) in Laufpuffer. Das Anlegen eines elektrischen Feldes ermöglichte die Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren durch die Gelmatrix. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit Ladepuffer versetzt. Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA-

Fragmente unter UV-Licht wurde dem Agarosegel Ethidiumbromid (0,75 µg/ml) hinzugegeben. Als Größenstandard mit definierten Fragmentgrößen diente die 50 bp bzw. 1 kb Gene Ruler™ DNA-Ladder (Fermentas), welche ebenfalls mit auf das Gel aufgetragen wurde.

• Laufpuffer (1x TBE):	45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA (pH 8,0)
• Agarosegel:	Agarose (je nach gewünschter Konzentration des Gels) in 1x TBE
• 6x Ladepuffer:	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol EF, 30 % Glycerin in Wasser

3.4 Bakterienkultur

3.4.1 Kultivierung und Kryokonservierung

Zur Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) zu einzelnen Kolonien wurden die transformierten Bakterien (siehe 3.4.3) auf *Luria-Broth*-Agar-Platten (LB-Agar-Platten) mit dem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die weitere Expansion der Bakterien erfolgte in flüssigem LB-Medium, supplementiert mit dem jeweiligen Selektionsmarker (Ampicillin 100 µg/ml; Kanamycin 30 µg/ml), in einem Schüttelinkubator (Braun Biotech) ebenfalls bei 37 °C über Nacht.

Zur dauerhaften Aufbewahrung transformierter Bakterien wurde eine 1:1-Suspension aus flüssiger Bakterienkultur (über Nacht gewachsen) und 20%igem Glycerin hergestellt und in einem Kryogefäß (Nunc) bei –80 °C eingefroren.

• LB-Medium:	1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl; pH 7,2
• LB-Agar-Platten:	1,5 % Agar in 1 l LB-Medium

3.4.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie über Nacht gewachsener *E. coli* angeimpft und erneut über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator expandiert (Vorkultur). Am nächsten Tag wurden 200 ml LB-Medium mit der Vorkultur angeimpft, ca. 2 ½ – 3 Stunden bei 37 °C inkubiert und nach Erreichen einer optischen Dichte von ca. 0,5 rasch in Eiswasser heruntergekühlt. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und nur mit vorgekühlten Arbeitsgeräten. Nach dem Abzentrifugieren (10 Min., 3 000 rpm) wurden die Bakterienpellets nahebei-

inander in TfbI- und TfbII-Puffer auf Eis inkubiert (Hanahan, 1983) und anschließend in 100 µl Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

• TfbI-Puffer:	100 mM KCl; 50 mM MnCl ₂ ; 30 mM KAc; 10 mM CaCl ₂ ; 15 % Glycerin; pH 5,8 (Puffer wurde stets frisch angesetzt)
• TfbII-Puffer:	10 mM MOPS; 10 mM KCl; 75 mM CaCl ₂ ; 15 % Glycerin; pH 7,0 (Aufbewahrung bei 4 °C)

3.4.3 Transformation von *Escherichia coli*

Unter Transformation versteht man die Übertragung von DNA (hier in Form von Plasmiden) in chemisch kompetente Bakterien (Rassow *et al.*, 2012, S. 480). Zunächst erfolgte die Vorbehandlung von LB-Agar-Platten mit Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid (X_{Gal}). Zur Transformation der Bakterien wurden 100 µl kompetenter *E. coli* langsam auf Eis aufgetaut und mit 1 – 20 µl eines Ligationsansatzes (je nach Art der Ligation, s. a. 3.5.2) vermischt. Der Ligationsansatz enthielt das Plasmid sowie das interessierende DNA-Fragment. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, woraufhin die Bakterien einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden ausgesetzt wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert und sodann in 1 ml LB-Medium bei Raumtemperatur resuspendiert. Nach dem Schütteln des Ansatzes für 30 – 45 Minuten bei 37 °C wurden die Zellen auf den vorbehandelten LB-Agar-Platten, die außerdem den entsprechenden Selektionsmarker enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Vorbehandlung der Agarplatten mit IPTG und X_{Gal} ermöglichte am folgenden Tag eine Differenzierung von blauen und weißen Kolonien, wobei die blauen nur das jeweilige Plasmid ohne Insertion der gewünschten DNA enthielten. Daher wurden nur einzelne weiße Kolonien von der Platte entnommen, in flüssiges LB-Medium mit Selektionsmarker gegeben und zur Expansion über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag stand der angewachsene Ansatz für die weitere Bearbeitung, z. B. zur Plasmidpräparation (siehe 3.5.5), zur Verfügung.

3.5 Klonierung

3.5.1 Allgemeines Klonierungsschema

Ziel einer Klonierung ist es, eine rekombinante DNA zu generieren und in Wirtszellen beliebig oft zu vermehren. Hierfür benötigte Werkzeuge sind eine Spender-DNA, Klonierungsvektoren als Transportvehikel für die Spender-DNA, Restriktionsendonuklea-

sen und DNA-Ligasen für den Einbau der Spender-DNA in den Vektor sowie Empfängerzellen (Rassow *et al.*, 2012, S. 478f.).

Ziel der Klonierung in dieser Arbeit war es, ein Expressionsplasmid für TKTL1 zu generieren, um eine Überexpression des Proteins in Zielzellen zu erreichen. Hierfür waren mehrere Klonierungsschritte nötig, die nach gängigen Klonierungstechniken (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt wurden. Die Insertion TKTL1 wurde zunächst aus dem kommerziell erworbenen Vektor pBluescriptR-TKTL1 (ImaGenes) mittels PCR mit spezifischen Primern amplifiziert. Der Vektor pBluescriptR eignet sich aufgrund seiner Promotorausstattung (T3, T7) nicht für die Transfektion und Expression von TKTL1 in eukaryontischen Zellen, sondern nur für eine Transformation in kompetente *E. coli*. Das PCR-Amplikon wurde mit einem Adenosin-Überhang (A-Überhang) unter Verwendung der Taq Polymerase versehen und anschließend in den Klonierungsvektor pDrive ligiert. Dieser besitzt einen Uridin-Überhang (U-Überhang), mit dem der A-Überhang des PCR-Produkts Basenpaarungen eingehen kann. Mit Hilfe des Restriktionsenzym EcoR1 (Fermentas) wurde die TKTL1-Insertion dann wieder aus pDrive isoliert und in den finalen Zielvektor 141pCAG, der aufgrund seines CMV-Promotors für die Transfektion in eukaryontische Zellen geeignet ist, eingefügt. Dieser wurde zuvor ebenfalls mit EcoR1 linearisiert. Dem linearisierten Plasmid wurde 1 μ l *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Fermentas) zugegeben, um freie Phosphatreste zu entfernen und eine Rezirkulation des Vektors ohne Ligation der Insertion zu verhindern. Die richtige Orientierung der Insertion TKTL1 im pCAG-Vektor wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme SacI sowie einer Kombination aus XhoI und KpnI verifiziert. Alle klonierten Plasmide wurden zur Kontrolle sequenziert (Sequiserie, Vaterstetten). Das so erzeugte Expressionsplasmid wurde als 141pCAG-TKTL1 bezeichnet und zur Herstellung von stabilen HEK293-Transfektanten verwendet (siehe 3.1.5).

Reaktionsansatz für den A-Überhang:	3,75 μ l dATPs (100 mM)
	3,5 μ l 10x Taq Buffer mit KCl
	1,5 μ l MgCl ₂ (25 mM)
	0,5 μ l Taq DNA Polymerase (1 U/ μ l)
	20 μ l aufgereinigtes PCR-Produkt
	Inkubation: 15 Minuten bei 72 °C

3.5.2 Ligation

Für die kovalente Verknüpfung eines DNA-Fragments mit dem entsprechenden Vektor wurden je nach Art des Vektors verschiedene Reaktionsansätze hergestellt:

Tabelle 17: Reaktionsansatz für die Ligation in den pDrive-Vektor

Volumen	Reagenz
5 µl	Ligation Master Mix, 2x
4 µl	PCR-Produkt + A-Überhang (siehe 3.5.1)
1 µl	pDrive Klonierungsvektor
Inkubation: über Nacht bei 4 °C im Wasserbad.	

Tabelle 18: Reaktionsansatz für die Ligation in den pCAG-Vektor

Volumen	Reagenz
2 µl	10x T4 DNA Ligase Puffer
1,5 - 2 U	T4 DNA Ligase
0,5 - 1 µl	pCAG linearisiert
2,5 – 10 µl	Insertion (TKTL1)
Mit H ₂ O auf 20 µl auffüllen.	
Inkubation: über Nacht bei Raumtemperatur.	

3.5.3 Restriktionsverdau

In der vorliegenden Arbeit wurden Restriktionsverdaue zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden, zur Linearisierung von Plasmiden und zur vorläufigen Erfolgskontrolle eines Klonierungsschrittes durchgeführt. Hierbei kamen verschiedene Restriktionsendonukleasen mit den zugehörigen spezifischen Puffern nach Angaben des Herstellers (Fermentas bzw. New England Biolabs) zum Einsatz. Zur Visualisierung und weiteren Analyse der verdauten DNA wurde eine Agarose Gelelektrophorese (siehe 3.3.3) durchgeführt.

3.5.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Mittels Gelelektrophorese aufgetrennte PCR-Produkte und DNA-Fragmente, die im Rahmen eines Restriktionsverdaus entstanden sind, wurden zunächst mit einem Skalpell aus dem Agarosegel isoliert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte schließlich mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits (Macherey-Nagel) gemäß Protokoll des Herstellers. Die so extrahierte DNA stand nun für weitere Klonierungsschritte bereit.

3.5.5 Präparation von Plasmiden

Transformierte *E. coli* (siehe 3.4.3) wurden über Nacht in flüssigem LB-Medium bei 37°C in einem Schüttelinkubator angereichert. Die Plasmidaufreinigung erfolgte am nächsten Tag wahlweise mit dem Jetstar Plasmid Purification Maxi Kit (Genomed) oder dem NucleoSpin® Plasmid QuickPure Mini Kit (Macherey-Nagel) nach Anleitung des Herstellers. Der DNA-Gehalt der aufgereinigten Probe wurde mit Hilfe des UV-Mikrophotometers GeneQuant Pro (Pharmacia) bestimmt.

3.6 Propidiumiodid-(PI)-FACS-Analyse

Diese durchflusszytometrische Methode wurde zur Identifizierung von apoptotischen Zellen angewendet. Es wurden alle Zellen einer Kulturflasche, sowohl anhaftende als auch schwimmende, geerntet. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 280 g für 5 Minuten) und bei 4 °C für 90 Minuten in einer Lösung aus 30 % PBS und 70 % Ethanol fixiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift in PBS, woraufhin die Zellen in PI-Färbelösung im Dunkeln bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert wurden. Propidiumiodid ist ein fluoreszierender Farbstoff und lagert sich in die DNA der Zellen ein (Krishan, 1975). Die Analyse der behandelten Zellen (20 000 Zellen/Ansatz) erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur™ (Becton Dickinson), die Auswertung und graphische Darstellung mit Hilfe der Software CellQuest. Die Quantifizierung der Apoptose in der untersuchten Zellpopulation wurde schließlich anhand des subgenomischen DNA-Gehaltes der Zellen vorgenommen. Dieser erscheint vor dem G1-Peak (G1-Phase im Zellzyklus) und repräsentiert den Gehalt an fragmentierter DNA, die typischerweise in sterbenden Zellen auftritt (Nicoletti *et al.*, 1991; Riccardi & Nicoletti, 2006).

PI-Färbelösung:	10 µg/ml RNase A, 1 µg/ml Propidiumiodid
------------------------	--

3.7 Immunhistochemie

3.7.1 Natives Gewebe

Gewebeproben von Karzinomen und gesundem Gewebe wurden mit dem Einbettmedium Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura) in Cryomold-Plastikgefäßen (Sakura) eingebettet, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –20 °C aufbewahrt. Aus den tiefgekühlten Blöcken wurden am Gefriermikrotom (Leica) ca. 4 µm dicke Gewe-

beschnitte hergestellt, auf SuperFrost® Plus Glasobjektträger (Menzel) aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag erfolgte die Fixierung der Schnitte für 10 Minuten in Azeton und ihre Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C . Nach dem Auftauen wurden die Gefrierschnitte noch einmal 10 Minuten lang mit Azeton fixiert und anschließend 5 Minuten in PBS rehydriert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase des Gewebes durch eine 10-minütige Inkubation der Gefrierschnitte in einer 0,03%igen Wasserstoffperoxidlösung (in PBS). Endogene Peroxidase kommt natürlicherweise in vielen Gewebearten vor und würde ohne Deaktivierung zu einer unspezifischen Färbung führen. Nach weiteren Waschschritten in PBS wurden die Schnitte 30 Minuten lang mit Normalserum vom Pferd beschichtet, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-TKTL1, Klon JFC12T10, monoklonal, IgG_{2b}, Herkunft: Maus) erfolgte in einer 1:200-Verdünnung (in PBS) für 120 Minuten bei 37°C oder über Nacht bei 4°C . Als Isotypkontrolle wurde ein Antikörper aus dem Tier verwendet, aus dem auch der Primärantikörper stammt (IgG_{2b}, Herkunft: Maus). Nach zweimaligem Waschen der Objektträger mit PBS wurden diese mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Anti-Maus biotinyliert, IgG, Herkunft: Pferd) und nach zwei weiteren Waschschritten in PBS mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (*avidin/biotinylated enzyme complex*, sog. ABC-Methode, Vector Laboratories) jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Die Visualisierung des Zielantigens erfolgte mittels Zugabe des AEC-Substrates (3-Amino-9-Ethylcarbazol), welches bei der Umsetzung durch die Peroxidase eine rote Farbreaktion hervorruft. Hierfür wurde das Substrat AEC in Tablettenform (Sigma-Aldrich) in einem Gemisch aus 10 ml Dimethylformamid (Merck), 190 ml 0,1 M Natriumazetatlösung (Merck; pH 5,5) und 100 μl 30%igem Wasserstoffperoxid (Merck) gelöst und die Gewebeschnitte darin bis zu 10 Minuten inkubiert. Die Farbentwicklung wurde dabei mikroskopisch kontrolliert. Im letzten Schritt der Färbeprozedur wurden die Zellkerne mit Mayers Hämalaunlösung blau gegengefärbt und die Objektträger für die Mikroskopie mit Aquatex (Merck) eingedeckelt. Die Beurteilung der Färbintensität der Proben erfolgte unabhängig voneinander durch zwei Experimentatoren.

3.7.2 Paraffin-eingebettetes Gewebe

Neben der immunhistochemischen Untersuchung von nativem Gewebe erfolgte auch die immunhistochemische Analyse von Proben eines Larynxkarzinoms, die in Paraffin

eingebettet wurden. Vor der Einbettung erfolgte die Fixierung des Gewebes mit HOPE (*Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect*) oder alternativ mit einer gepufferten 3,7%igen Formaldehydlösung (siehe 3.7.2.2).

3.7.2.1 HOPE-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Gewebe

Bei der HOPE-Fixierung (Olert *et al.*, 2001) erfolgte die Inkubation des Gewebes zunächst für mindestens 48 Stunden bei 4 °C in HOPE-I-Lösung (DCS GmbH & Co. KG) und anschließend für 2 Stunden in einer kalten Azeton-/HOPE-II-Lösung (100 ml reines Azeton gemischt mit 100 µl der HOPE-II-Lösung) ebenfalls bei 4 °C. Zur weiteren Dehydratisierung des Gewebes folgte anschließend eine 2-stündige Inkubation in eiskaltem Azeton. Dieser Vorgang wurde zweimal mit einer Inkubationsdauer von jeweils 2 Stunden wiederholt. Um eine dauerhafte Kühlung des Azetons zu gewährleisten, wurden sämtliche Inkubationsschritte auf Eis durchgeführt. Anschließend erfolgte die Paraffin-einbettung des Gewebes mit warmem, verflüssigtem Paraffin über Nacht bei 55 – 60 °C und am nächsten Tag die Einbettung in frisches Paraffin. Die abgekühlten Paraffinblöcke wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

Nach der Vorkühlung der Blöcke für 30 Minuten bei –20 °C erfolgte die Anfertigung von ca. 4 µm dicken Gewebeschnitten mit einem Rotationsmikrotom (Leica). Zur Streckung der Schnitte wurden diese in ein Wasserbad bei 35 – 39 °C gegeben, auf SuperFrost® Plus Glasobjektträger (Menzel) aufgetragen und bei 37 °C über Nacht getrocknet. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C.

Zur Entparaffinierung erfolgte eine Inkubation der Schnitte in Isopropanol bei 60 °C zunächst für 20 Minuten und anschließend noch einmal für 10 Minuten. Die Schnitte wurden rehydriert, indem sie je 10 Minuten lang nacheinander mit 70%igem eiskaltem Azeton und anschließend mit destilliertem Wasser behandelt wurden. Anschließend konnten die Gewebeschnitte für die immunhistochemische Färbeprozedur verwendet werden. Die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte dabei in 3 % Wasserstoffperoxid (in PBS) für 10 Minuten. Die weitere Behandlung der Schnitte mit Normalserum, Primär- und Sekundärantikörper, dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und dem AEC-Substrat erfolgte wie bereits unter 3.7.1 beschrieben.

3.7.2.2 Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Gewebe

Im Fall der Fixierung mit 3,7%iger Formaldehydlösung (in 0,1 M PBS, pH 7.2) wurde das Gewebe über Nacht bei Raumtemperatur in der Lösung inkubiert. Am nächsten Tag folgte die automatische Entwässerung (in einer aufsteigenden Alkoholreihe) und Paraf-

feinbettung des Gewebes mit Hilfe eines Gewebeeinbettautomaten (Shandon Hypercenter XP). Anschließend standen die Paraffinblöcke zur Anfertigung von Gewebeschnitten mit dem Rotationsmikrotom zur Verfügung. Diese wurden in einer Dicke von ca. 4 μm auf SuperFrost® Plus Glasobjektträger aufgezogen und über Nacht bei 50 °C getrocknet. Die Entparaffinierung und Rehydratisierung der Paraffinschnitte für die weitere Verwendung erfolgte mittels Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe: Zunächst 5 Minuten in Xylol (2x), 5 Minuten in 100 % Ethanol (2x), 5 Minuten in 96 % Ethanol, 5 Minuten in 80 % Ethanol, 5 Minuten in 70 % Ethanol und schließlich 5 Minuten in destilliertem Wasser. Bei der Fixierung des Gewebes mit Formalin kommt es zur Bildung von Methylenbrücken, welche die Proteine des Gewebes miteinander verbinden und damit eine Maskierung von Antigenen bewirken (Cattoretti *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1991). Um eine mangelhafte Antikörperbindung an das Zielantigen zu verhindern, erfolgte daher zunächst eine hitzeinduzierte oder enzymatische Demaskierung der Antigene (Cattoretti *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1991). Für die hitzeinduzierte Demaskierung wurden die Gewebeschnitte in einer Mikrowelle (AEG) bei 700 Watt bis zu 40 Minuten in Citratpuffer (Dako, Dänemark; pH 6,0) gekocht. Für die enzymatische Demaskierung erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 0,1 % Proteinase Typ XXIV (Sigma-Aldrich) in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Gewebeschnitte mit 3%iger Wasserstoffperoxidlösung (in PBS) behandelt. Die immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte erfolgte anschließend wie unter 3.7.1 beschrieben.

3.8 Immunzytochemie

Immunzytochemische Färbungen wurden an Zytospins durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür wie unter 3.1.1 beschrieben mit Trypsin/EDTA geerntet und zur Herstellung von Zellpellets verwendet (siehe 3.1.6). Diese wurden anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur in 3,7%igem, frisch angesetztem Paraformaldehyd (Merck) inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe in PBS, woraufhin die Zellen vorsichtig in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Methanol resuspendiert und wiederum gewaschen wurden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-TKTL1, Klon JFC12T10, IgG_{2b}, Herkunft: Maus; Isotypkontrolle: IgG_{2b}, Herkunft: Maus) in einer Verdünnung von 1:50 (in PBS) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschriff in PBS wurden die Zellen schließlich mit Hilfe einer Hettich Zentrifuge (5 Min., 1000 U/Min.) auf SuperFrost® Plus Glasobjektträger zentrifugiert (ca. 10^4 Zellen/Objektträger). Die Proben

wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, am nächsten Tag 10 Minuten in Azeton fixiert und bis zur Färbung bei -20°C gelagert. Die weitere immunzytochemische Färbebehandlung der Proben mit biotinyliertem Zweitantikörper, Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und Färbelösung erfolgte wie unter 3.7.1 beschrieben.

4 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Versuche zur Expression von TKTL1 in verschiedenen Zelllinien und Geweben durchgeführt. Des Weiteren wurden mittels stabiler HEK293-Transfektanten Untersuchungen zur TKTL1-Funktion vorgenommen, um eine mögliche Rolle von TKTL1 in der Regulation der Proliferation von Zellen näher zu analysieren. Hierbei kamen unterschiedliche Methoden zur Anwendung, deren Ergebnisse im Folgenden beschrieben werden.

4.1 TKTL1-Expression in Zelllinien unterschiedlicher Herkunft

Die Expression von TKTL1 wurde in Karzinomzelllinien verschiedenen Ursprungs sowie in einer Leukämiezelllinie analysiert. Die untersuchten Zelllinien stammten aus Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (PCI-1, PCI-13, FaDu, Ant-1), einem Zervixkarzinom (HeLa), einem Kolonkarzinom (HCT-8), Mammakarzinomen (MCF-7, SkBr-3) und der akuten monozytären Leukämie (THP-1). Außerdem wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen, Graham *et al.* (1977)) mit einem Expressionsvektor für TKTL1 oder alternativ mit einem Vektor ohne Insertion stabil transfiziert und die resultierenden Zelllinien 293pCAG-TKTL1 und 293pCAG- Δ als Kontrollen in die Untersuchungen zur TKTL1-Expression eingeschlossen. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Analysen mittels Reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR), Immunoblot, Immunzytochemie und nach RNA-Interferenz beschrieben.

4.1.1 Analyse der TKTL1-Expression mittels Reverser Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Um festzustellen, ob TKTL1 in den oben genannten (o. g.) Zelllinien exprimiert wird, wurde zunächst die Expression der spezifischen TKTL1-mRNA in diesen Zelllinien untersucht. Auch die stabilen Transfektanten 293pCAG-TKTL1 und 293pCAG- Δ wurden mittels RT-PCR analysiert. Während sich die 293pCAG-TKTL1 Zellen durch eine starke exogene TKTL1-mRNA-Expression auszeichneten und daher als Positivkontrolle dienten, war in den 293pCAG- Δ Zellen keine TKTL1-mRNA nachzuweisen, weshalb sie als Negativkontrolle dienten (Abbildung 4.1, Spuren 2 und 3). Der Nachweis von endogener TKTL1-mRNA mittels RT-PCR gelang innerhalb der untersuchten malignen

Zelllinien nur in THP-1 Zellen wie in Abbildung 4.1, Spur 4 zu sehen ist. In den restlichen untersuchten Karzinomzelllinien blieb das Expressionsniveau der TKTL1-mRNA, auch bei höheren PCR-Zykluszahlen (bis zu 40 Zyklen; Daten hier nicht gezeigt), unterhalb der Nachweisgrenze (Abbildung 4.1, Spuren 5 – 12). Um die vorliegenden Resultate aus den Versuchen mittels RT-PCR (Abbildung 4.1) zu verifizieren, wurden die Zelllinien außerdem mit drei weiteren Methoden, dem Immunoblot, der Immunzytochemie und der RNA-Interferenz, analysiert.



Abbildung 4.1: TKTL1-mRNA-Expression in Zelllinien. Die TKTL1-mRNA wurde aus der Gesamt-RNA der jeweiligen Zelllinien mittels RT-PCR und TKTL1-spezifischen Primern amplifiziert. Aufgrund der Primerwahl erfolgte der Nachweis des Amplikons bei 510 Basenpaaren (bp). Als Kontrolle wurde Wasser (H₂O) anstelle von cDNA bei der RT-PCR verwendet (Spur 1). Als Ladekontrolle diente die mRNA des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welche aus denselben Proben amplifiziert wurde (Amplikongröße: 257 bp). Alle dargestellten Zelllinien wurden in der RT-PCR unter denselben Bedingungen analysiert (TKTL1: 35 Zyklen, GAPDH: 22 Zyklen). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.2 Analyse der TKTL1-Expression mittels Immunoblot

Um die TKTL1-Expression nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden maligne Zelllinien und stabile Transfektanten zusätzlich mittels Immunoblot analysiert. Der monoklonale Maus-Antikörper JFC12T10 diente dabei zur Detektion des Proteins TKTL1. Coy *et al.* (2005), die den Antikörper JFC12T10 generierten und in ihrer Arbeit verwendeten, beschrieben im Western Blot verschiedene Isoformen von TKTL1, deren Molekulargewicht sich zwischen 40 kDa und 75 kDa bewegte. In der Immunoblotanalyse der vorliegenden Arbeit ließ sich in THP-1 Zellen eine Hauptproteinbande bei 65 kDa nachweisen (Abbildung 4.2, Spur 8). Dies entspricht dem berechneten Molekulargewicht des TKTL1-Vollängenproteins mit 596 Aminosäu-

ren (<http://www.uniprot.org/uniprot/P51854>). Es konnten darüber hinaus weitere Proteinbanden mit einem geringeren Molekulargewicht von ungefähr 40 kDa und 54 kDa in THP-1 Zellen detektiert werden (Abbildung 4.2, Spur 8). Das Bandenmuster der Proteinauftrennung in der stabilen Transfektante 293pCAG-TKTL1 zeigte ebenfalls eine Hauptproteinbande bei 65 kDa sowie schwächere Proteinbanden bei ungefähr 58 kDa und 54 kDa (Abbildung 4.2, Spur 6). In keiner der weiteren untersuchten Karzinomzelllinien konnte die Hauptproteinbande bei 65 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 4.2, Spuren 1 – 5 und Spur 9). Dies lässt nun entweder darauf schließen, dass diese Zellen kein endogenes TKTL1 exprimierten oder das Niveau der TKTL1-Expression in diesen Zellen unterhalb der Nachweisgrenze des Immunoblots lag. Die hier gewonnenen Resultate bestätigten somit die zuvor beschriebenen Ergebnisse aus der Analyse mittels RT-PCR. Auch auf Proteinebene konnte endogenes TKTL1 nur in THP-1 Zellen (Abbildung 4.2, Spur 8) und exogenes TKTL1 in der stabilen Transfektante 293pCAG-TKTL1 (Abbildung 4.2, Spur 6) nachgewiesen werden. Auffallend war allerdings, dass in allen untersuchten Zelllinien zwei Proteinbanden mit einem ungefähren Molekulargewicht von 78 kDa und 42 kDa nachweisbar waren (Abbildung 4.2, mit Sternchen markiert). Auch Coy *et al.* (2005) beschrieben ähnliche Proteinbanden in den von ihnen untersuchten Karzinomzelllinien (75 kDa, 58 kDa, 48 kDa, 44 kDa, 40 kDa). Die Autoren sind dabei der Auffassung, dass es sich bei den kleineren Proteinen (40 – 58 kDa) um TKTL1-Isoformen handelt (Coy *et al.*, 2005). Die Hintergründe des Auftretens der größeren Proteinbande (75 kDa), die das Molekulargewicht des Volllängenproteins von 65 kDa deutlich übersteigt, wurden allerdings nicht näher beleuchtet (Coy *et al.*, 2005). Eine Hauptproteinbande bei 65 kDa trat in keiner der von Coy *et al.* (2005) untersuchten Zelllinien auf. Um das Ergebnis der vorliegenden Immunoblotanalyse (Abbildung 4.2) zu prüfen und den Ursprung der beiden Proteinbanden (42 kDa und 78 kDa), die in allen analysierten Zelllinien zusätzlich detektiert werden konnten, zu klären, erfolgte die Untersuchung der TKTL1-Protein-Expression zusätzlich mit Hilfe der Immunzytochemie sowie eine Analyse von 293pCAG-TKTL1 Zellen mittels RNA-Interferenz.

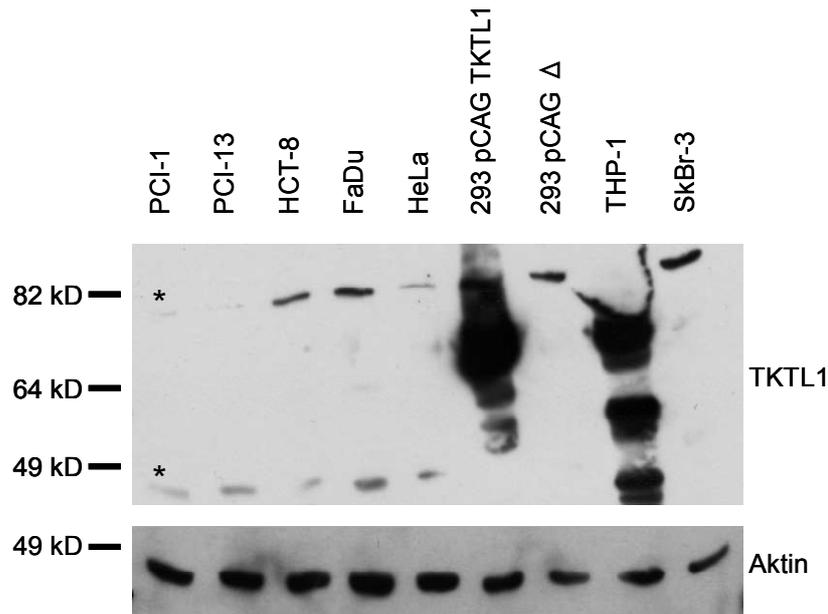


Abbildung 4.2: TKTL1-Proteinexpression in Zelllinien. Die angegebenen Zellen wurden lysiert und die enthaltenen Proteine in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die Gesamtproteinmenge je Probe betrug dabei 20 µg. Die Detektion des Proteins TKTL1 erfolgte mit dem Primärantikörper JFC12T10 in Kombination mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper und dem ECL Substrat. Als Ladekontrolle diente die Proteinexpression des Haushaltsgens Aktin, welche aus denselben Proben analysiert wurde (Aktin: 42 kDa, unterer Abschnitt der Abbildung). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

4.1.3 Analyse der TKTL1-Expression mittels Immunzytochemie

Neben der Analyse mittels Immunoblot wurde die TKTL1-Expression auf Proteinebene in den Zelllinien 293pCAG-TKTL1, 293pCAG-Δ, THP-1, PCI-1, PCI-13 und HeLa zusätzlich mittels Immunzytochemie untersucht. Wie auch in der Immunoblotanalyse erfolgte die Detektion von TKTL1 mit dem monoklonalen Antikörper JFC12T10. Abbildung 4.3 zeigt, dass die stabile Transfektante 293pCAG-TKTL1 bei Inkubation mit dem TKTL1-Antikörper (TKTL1 in Abbildung 4.3) eine deutliche Rotfärbung aufwies, jedoch nicht bei einer Inkubation mit dem passenden Isotypantikörper (Isotypkontrolle in Abbildung 4.3). Sie zeichnete sich damit auch in dieser Analyse durch eine starke TKTL1-Expression aus. Innerhalb der weiteren untersuchten Zelllinien war THP-1 wiederum die einzige, in der endogenes TKTL1 nachgewiesen werden konnte. Eine Rotfärbung trat auch hier nur nach Inkubation mit dem TKTL1-Antikörper auf, nicht jedoch nach Inkubation mit dem Isotypantikörper (Abbildung 4.3). 293pCAG-Δ, PCI-1, PCI-13 und HeLa Zellen hingegen zeigten unter denselben Bedingungen weder nach

Inkubation mit dem TKTL1-Antikörper noch mit dem Isotypantikörper eine Färbung. Es konnte somit auch mit dieser Methode kein endogenes TKTL1 (und damit auch keine TKTL1-Isoformen (siehe 4.1.2)) in diesen Zellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aus den RT-PCR-Experimenten und der Immunoblotanalyse der vorliegenden Arbeit wurden somit auch mittels Immunzytochemie bestätigt.

Um nun den Ursprung der 42 kDa und 78 kDa Proteinbande des Immunoblots (siehe 4.1.2 und Abbildung 4.2) zu klären, wurde mittels RNA-Interferenz in 293pCAG-TKTL1 Zellen das TKTL1-Gen herabreguliert und der Einfluss auf die detektierten Proteine beobachtet (siehe 4.1.4).

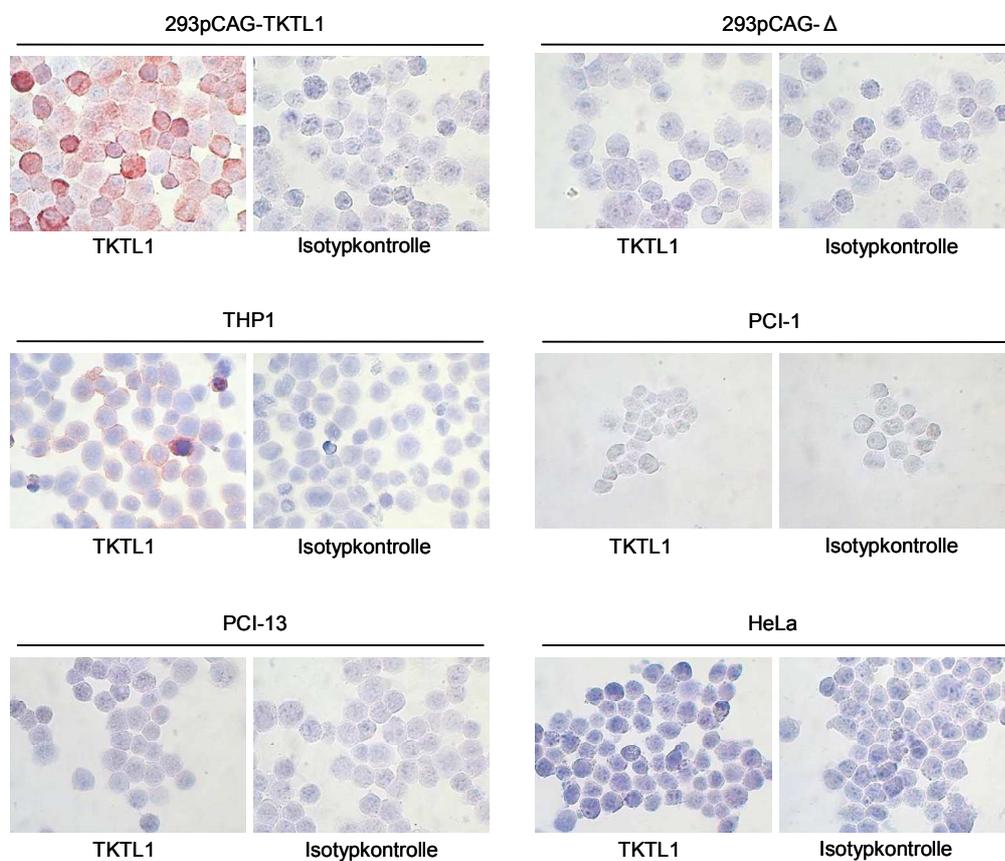


Abbildung 4.3: Immunzytochemische Färbung von TKTL1 in Zelllinien. Die angegebenen Zellen wurden geerntet und nach einer Behandlung mit Paraformaldehyd und Methanol mit dem Primärantikörper JFC12T10 inkubiert (TKTL1). Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation auf beschichtete Glasobjektträger aufgebracht und mit Hilfe eines biotinylierten Sekundärantikörpers, des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (sog. ABC-Methode) und schließlich durch Zugabe des AEC-Substrats gefärbt. TKTL1 ließ sich dabei über eine rote Färbung detektieren. Die Zellkerne wurden mit Mayers Hämalaunlösung blau gefärbt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen anstelle des TKTL1-Antikörpers JFC12T10 mit einem unspezifischen Isotypantikörper (Isotypkontrolle) inkubiert. Vergrößerung: 400x. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten abgebildet.

4.1.4 Analyse der TKTL1-Expression nach RNA-Interferenz

293pCAG-TKTL1 Zellen wurden mit einer spezifischen *short interfering* RNA (siRNA) transient transfiziert, um eine Herabregulation der transkribierten TKTL1-mRNA zu bewirken. SiRNAs sind kleine RNA-Moleküle, die durch enzymatische Spaltung aus größeren RNA-Vorläufermolekülen entstehen (Rassow *et al.*, 2012, S. 436). Sie können an eine spezifische mRNA binden und damit zu deren Abbau und/oder zur Unterdrückung der Genexpression durch eine Hemmung der Translation gebundener Ziel-mRNAs beitragen (Rassow *et al.*, 2012, S. 436). Als Kontrolle erfolgte zudem die transiente Transfektion der 293pCAG-TKTL1 Zellen mit einer Kontroll-siRNA anstelle der spezifischen siRNA. Die Kontroll-siRNA bindet keine Sequenz im humanen Genom und bewirkt damit auch keine Veränderung der Proteinexpression. Die anschließende Analyse der so behandelten Zellen mittels Immunoblot sollte Auskunft darüber geben, ob sich eine Repression der TKTL1-mRNA auch auf die detektierten 78 kDa und 42 kDa Proteinbanden (siehe 4.1.2 und Abbildung 4.2) auswirkt, um eine Aussage über deren Spezifität treffen zu können. Abbildung 4.4 zeigt, dass das Volllängenprotein bei 65 kDa durch eine spezifische Herabregulation der TKTL1-mRNA mittels siRNA reprimiert wurde (Abbildung 4.4, Pfeil), nicht jedoch bei Transfektion der Zellen mit der Kontroll-siRNA. Die zwei zusätzlichen Proteinbanden (78 und 42 kDa) blieben von einer siRNA-Behandlung jedoch unbeeinflusst (Abbildung 4.4, Sternchen). Der Nachweis der Effizienz der TKTL1-spezifischen siRNA mittels RT-PCR ist in Abbildung 4.11 (A) zu sehen. Die oben beschriebenen 54 kDa und 58 kDa Proteinbanden traten in der 293pCAG-TKTL1 Zelllinie (siehe Abbildung 4.2, Spur 6) hier weder in den mit spezifischer siRNA noch in den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen auf, weshalb die Spezifität dieser Banden eher als fraglich zu bewerten ist. TKTL1 konnte in der vorliegenden Arbeit folglich als Protein mit einem Molekulargewicht von 65 kDa identifiziert werden. Die zusätzlichen Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 78 und 42 kDa waren gegenüber einer Regulation der TKTL1-mRNA nicht sensitiv und repräsentierten somit aller Wahrscheinlichkeit nach kein TKTL1-Protein.

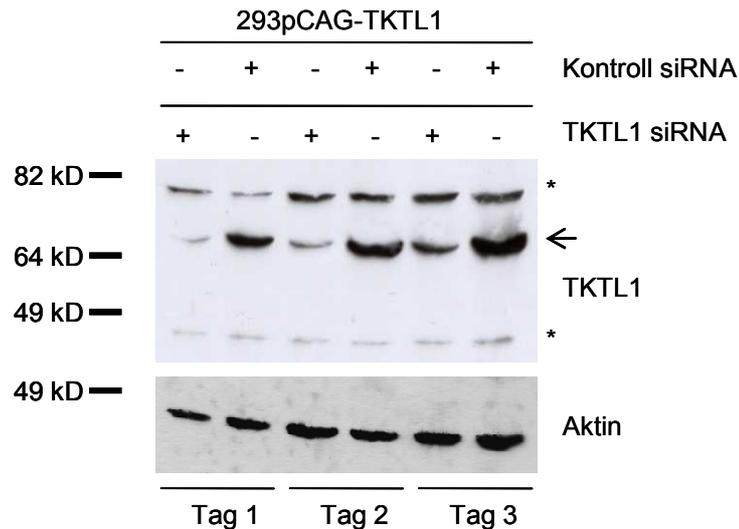


Abbildung 4.4: TKTL1-Proteinrepression in der stabilen Transfektante 293pCAG-TKTL1. Die Zellen wurden mit einer spezifischen TKTL1-siRNA oder alternativ mit einer Kontroll-siRNA transient transfiziert, über insgesamt 3 Tage hinweg kultiviert und täglich geerntet. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine aus dem Gesamtzelllysats mittels Elektrophorese in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für die Immundetektion von TKTL1 wurde der Antikörper JFC12T10 in Kombination mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundäntikörper und dem ECL-Substrat verwendet. Das TKTL1-Volllängenprotein mit einem Molekulargewicht von 65 kDa ist mit einem Pfeil markiert. Die zwei zusätzlich detektierten Proteinbanden bei 78 kDa und 42 kDa, die von der siRNA Behandlung unbeeinflusst blieben, sind jeweils mit Sternchen markiert. Als Ladekontrolle wurde Aktin (42 kDa) herangezogen, dessen Proteinexpression aus denselben Proben analysiert wurde (unterer Abschnitt). Es wird ein repräsentatives Resultat aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

4.2 TKTL1-Expression in Geweben unterschiedlicher Herkunft

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Proteins TKTL1 nicht nur mittels Immunoblot und Immunzytochemie in verschiedenen Zelllinien, sondern auch mittels Immunhistochemie in verschiedenen Geweben evaluiert. Im Einzelnen handelte es sich dabei um ein Larynxkarzinom sowie um gesundes Gewebe aus Larynx, Gaumenbogen und Kolon.

4.2.1 Detektion von TKTL1 in Abhängigkeit von Fixierung, Konservierung und Antigendemaskierung in Proben eines Larynxkarzinoms

Die Detektion des interessierenden Antigens (hier: TKTL1) hängt bei der immunhistochemischen Behandlung der Gewebeproben u. a. deutlich von der Art der Fixierung und der Methode der Antigendemaskierung ab (Leong, 2004). Aus diesem Grund wurde die

Probe eines Larynxkarzinoms mittels verschiedener Methoden, die sich in der Art der Fixierung, Konservierung und Antigendemaskierung unterschieden, analysiert. Das Larynxkarzinom wurde hierzu in drei gleichwertige Proben geteilt. Ein Teil davon wurde kryokonserviert (natives Gewebe), d. h. es wurde ohne vorherige Fixierung, welche einer späteren Antigendemaskierung bedarf, in Einbettmedium schockgefroren. Ein weiterer Teil wurde HOPE-fixiert (Goldmann *et al.*, 2002; Umland *et al.*, 2003) und in Paraffin eingebettet und ein Teil Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Antigendemaskierung im Fall des Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebes erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden, hitzeinduziert und enzymatisch. Alle drei Proben wurden zu ca. 4 μm dicken Gewebeschnitten verarbeitet, auf Glasobjektträger aufgezogen und anschließend immunhistochemisch analysiert. Die Detektion von TKTL1 erfolgte wiederum mit dem Antikörper JFC12T10.

Im Fall der kryokonservierten Gewebeprobe konnte eine fokale und starke TKTL1-Expression in vereinzelt Zellen innerhalb des Tumorgewebes nachgewiesen werden (Abbildung 4.5, mit Pfeilspitzen markiert). In der Isotypkontrolle blieben die Zellen innerhalb des Tumorgewebes ungefärbt, was für die Spezifität der TKTL1-Detektion spricht. Es trat keine gleichmäßig über das Tumorgewebe verteilte Färbung auf (Abbildung 4.5). Bei der starken Färbung im Lumen der Drüsenstruktur ist zu beachten, dass auch bei einer Inkubation des Gewebes mit dem Isotypantikörper, unter ansonsten gleichbleibenden Bedingungen, eine Färbung auftrat und diese Färbung daher als unspezifisch zu werten ist (Abbildung 4.5, unterer Abschnitt).

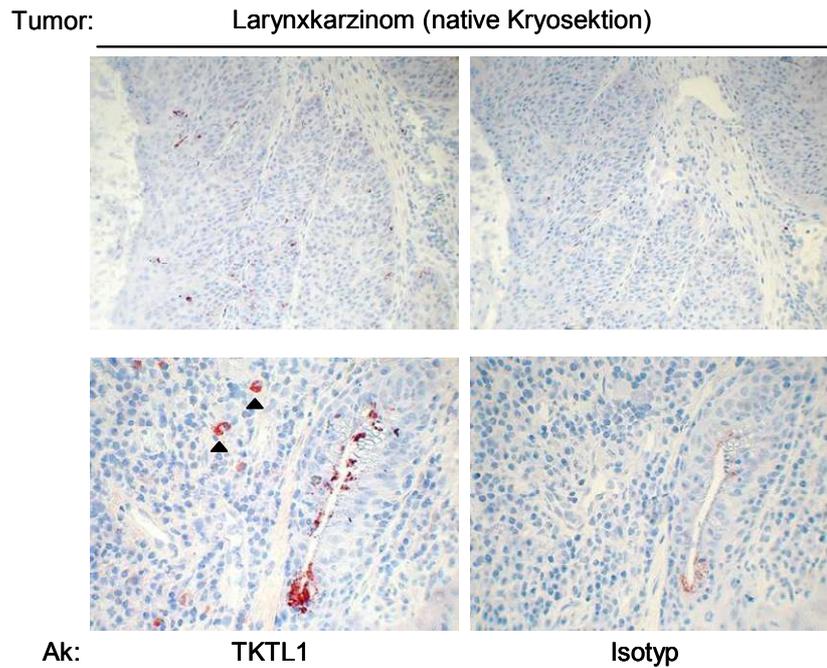


Abbildung 4.5: Immunhistochemische Färbung von TKTL1 in einem kryokonservierten Larynxkarzinom. Ein Teil der Biopsie des Larynxkarzinoms wurde ohne vorherige Fixierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in ca. 4 µm dicke Gewebeschnitte verarbeitet. Eine Antigendemaskierung war nicht erforderlich. Die Visualisierung von TKTL1 erfolgte mit Hilfe des Antikörpers JFC12T10 in Verbindung mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, der ABC-Methode und dem AEC-Substrat (TKTL1: rote Farbe). Einzelne stark TKTL1-exprimierende Zellen im Tumorgewebe sind mit Pfeilspitzen markiert. Die Zellkerne wurden mit Mayers Hämalaunlösung blau gegengefärbt. Als Kontrolle wurden unmittelbar nachfolgende Gewebeschnitte mit einem Isotypantikörper anstelle des JFC12T10-Antikörpers inkubiert. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Färbungen zu sehen. (Ak: Antikörper).

Die immunhistochemische Färbung der Paraffin-eingebetteten Gewebeproben des Larynxkarzinoms ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Während im Fall des HOPE-fixierten Gewebes, wie auch bei kryokonserviertem Gewebe, keine Antigendemaskierung erforderlich war, musste Formalin-fixiertes Gewebe vor der immunhistochemischen Färbung entweder in Citratpuffer gekocht oder mit Proteinase behandelt werden. Dies war erforderlich, da Formalin eine Vernetzung von Peptiden und damit eine Maskierung von Zielantigenen bewirkt (Leong, 2004). Sowohl in HOPE-fixiertem als auch in Formalin-fixiertem und mit Citrat behandeltem Gewebe konnte eine gleichmäßige, moderate TKTL1-Expression über die gesamte Tumormasse hinweg detektiert werden, während das umliegende Bindegewebe (Stroma) ungefärbt blieb (Abbildung 4.6). Im Fall des HOPE-fixierten Gewebes wurde diese gleichmäßige Färbung durch fokale Anreicherungen in der Tumormasse, wie auch bei kryokonserviertem Gewebe beobachtet, er-

gänzt (Abbildung 4.6, Pfeilspitze). In Formalin-fixiertem und in Citratpuffer gekochtem Gewebe fehlten solche fokale Anreicherungen dagegen. Dabei muss beachtet werden, dass bei beiden Fixierungstechniken auch in den Isotypkontrollen jeweils schwache homogene Färbungen im Gewebe auftraten. Die enzymatische Antigendemaskierung mittels Proteinase in Formalin-fixiertem Gewebe war nicht ausreichend, um in der vorliegenden Arbeit TKTL1 zu detektieren (Abbildung 4.6, rechtes unterstes Bild).

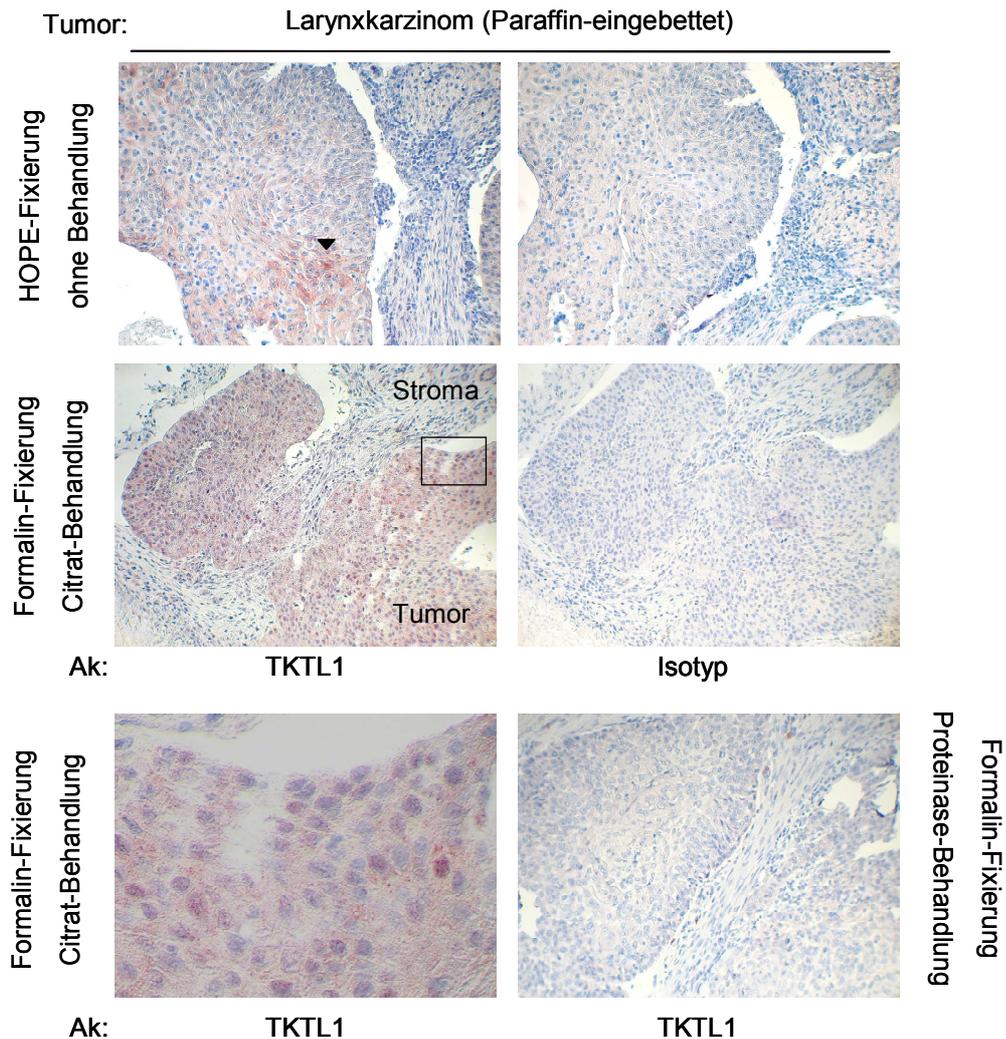


Abbildung 4.6: Immunhistochemische Färbung von TKTL1 in einem Paraffin-eingebetteten Larynxkarzinom. Ein Teil des Larynxkarzinoms wurde mit HOPE fixiert und in Paraffin eingebettet, während ein weiterer Teil mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurde. Aus den Paraffinblöcken wurden ca. 4 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt und diese wiederum mit dem TKTL1-Antikörper JFC12T10 in Verbindung mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, der ABC-Methode und dem AEC-Substrat gefärbt (rot). Im Fall der Fixierung mit Formalin erfolgte vor der immunhistochemischen Färbung eine Antigendemaskierung entweder mittels Kochen der Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0) für 30 Minuten oder mittels enzymatischer Behandlung mit 0,1 % Proteinase (in PBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die blaue Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit Mayers Hämalaunlösung. Negativkontrollen

wurden mittels Inkubation mit einem Isotypantikörper in konsekutiven Gewebeschnitten hergestellt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen immunhistochemischen Färbungen.

Auffallend war, dass bei der hitzeinduzierten Antigendemaskierung des Formalin-fixierten Gewebes aus einer Verlängerung der Kochzeit in Citratpuffer eine Steigerung der Färbeintensität über das ganze Tumorgewebe hinweg resultierte (Abbildung 4.7). Zusätzlich konnte eine TKTL1-Anfärbung sogar in den Zellkernen festgestellt werden (Abbildung 4.6, linkes unterstes Bild und Abbildung 4.7, mit Pfeilen markiert), was überraschend war, da TKTL1 seine Funktion im Pentosephosphatweg ausübt und dieser im Zytosol stattfindet.

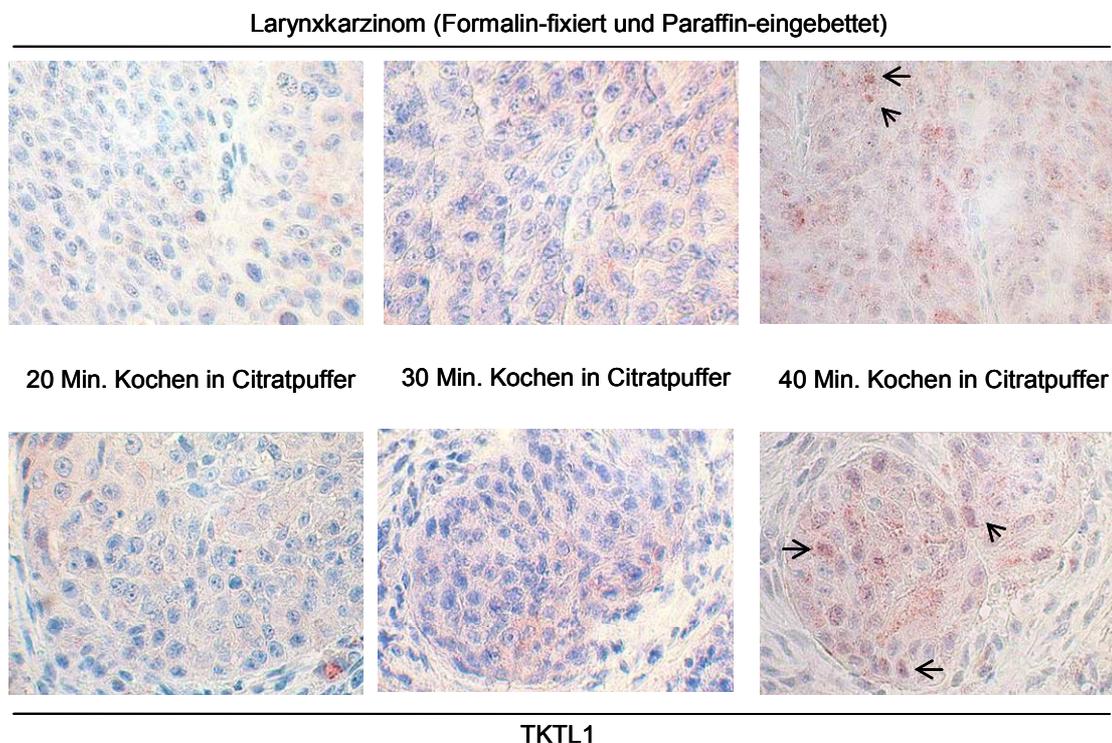


Abbildung 4.7: Immunhistochemische Färbung von TKTL1 in Abhängigkeit von der Dauer der Citratbehandlung. Die Schnitte eines Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Larynxkarzinoms wurden zur Antigendemaskierung für 20, 30 und 40 Minuten in Citratpuffer (pH 6,0) bei 700 Watt in der Mikrowelle gekocht. Anschließend folgte die immunhistochemische Färbung von TKTL1 mit dem JFC12T10-Antikörper in Kombination mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, der ABC-Methode und dem AEC-Substrat (rot). Zellkerne wurden mit Mayers Hämalaunlösung blau gefärbt. Eine Färbung von TKTL1 im Zellkern ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Gezeigt sind jeweils Serien von zwei aufeinanderfolgenden Schnitten (oberes und unteres Bild) mit ansteigender Kochzeit.

4.2.2 TKTL1-Expression in kryokonservierten gesunden Geweben

Neben der immunhistochemischen Detektion von TKTL1 in Abhängigkeit von der Fixierung, Konservierung und Antigendemaskierung am Beispiel eines Larynxkarzinoms wurden außerdem immunhistochemische Färbungen des Proteins in gesunden Geweben aus Larynx, Gaumenbogen und Kolon durchgeführt. Aufgrund der fehlenden Modifizierung von Epitopen bei der Kryokonservierung und wegen der schwachen Färbungen, die die Isotypkontrollen von HOPE- und Formalin-fixierten Geweben zeigten (Abbildung 4.6), wurden die weiteren immunhistochemischen Färbungen im Rahmen dieser Arbeit an kryokonservierten Geweben durchgeführt. In gesunder Larynxschleimhaut ließen sich bei Inkubation mit dem TKTL1-Antikörper JFC12T10 einzelne stark positive Zellen nachweisen (Abbildung 4.8, oberstes linkes Bild, mit Pfeilspitzen markiert), wie auch im kryokonservierten Larynxkarzinom (siehe Abbildung 4.5). Die Isotypkontrolle der Larynxschleimhaut blieb dagegen ungefärbt, was für die Spezifität der Färbung mit dem TKTL1-Antikörper spricht. In gesunder Kolonschleimhaut konnten stark rot gefärbte Krypten mit zahlreichen gefärbten Becherzellen (Abbildung 4.8, unterstes linkes Bild) detektiert werden. Auch hier blieb die Isotypkontrolle ungefärbt. In gesunder Gaumenbogenschleimhaut konnte TKTL1 nicht detektiert werden. Hier war sowohl mit dem spezifischen TKTL1-Antikörper als auch mit dem Isotypantikörper keine Anfärbung des Gewebes nachzuweisen (Abbildung 4.8, mittlere Bilder).

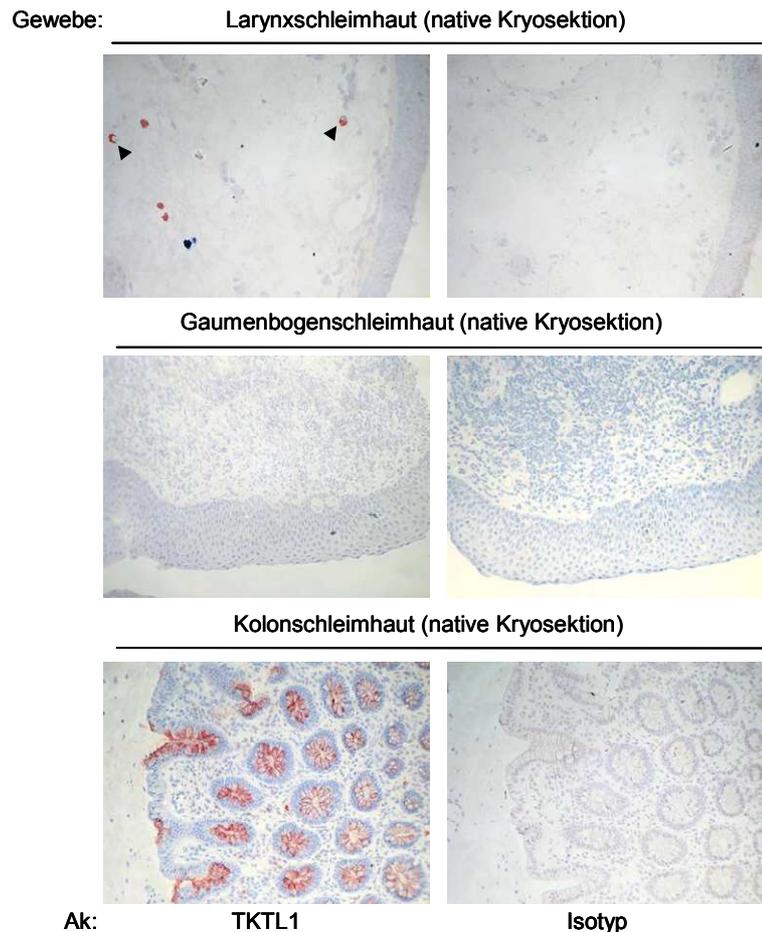


Abbildung 4.8: Immunhistochemische Färbung von TKTL1 in gesunden kryokonservierten Geweben. Die Färbung der 4 µm dicken Gewebeschnitte erfolgte mit dem TKTL1-spezifischen Antikörper JFC12T10 in Verbindung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, der ABC-Methode und dem AEC-Substrat (rote Farbe). Konsekutive Gewebeschnitte wurden als Kontrolle mit einem Isotypantikörper inkubiert. Die Zellkerne wurden blau gegengefärbt. Einzelne stark TKTL1-exprimierende Zellen in gesunder Larynxschleimhaut sind mit Pfeilspitzen markiert.

4.3 Einfluss der exogenen TKTL1-Expression auf die Zellproliferation

Nachdem die Expression von TKTL1 in Zelllinien und Geweben mittels verschiedener Methoden untersucht wurde und dabei eine Expression auf mRNA- und Proteinebene in THP-1 Zellen sowie eine starke Expression in einzelnen Zellen innerhalb des analysierten Larynxkarzinoms festgestellt werden konnte, folgten weitere Untersuchungen zur TKTL1-Funktion. Hierfür wurden die stabilen Transfektanten 293pCAG-TKTL1 und 293pCAG-Δ verwendet. Beide Zelllinien wurden aus der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 hergestellt, indem entweder ein TKTL1-Expressionsplasmid

(141pCAG-TKTL1) oder alternativ ein analoger Leervektor (141pCAG- Δ) stabil transkribiert wurde. Die Zelllinien unterschieden sich letztlich also nur in der exogenen Expression von TKTL1 bei ansonsten gleichem genetischen Hintergrund. Zunächst wurde geprüft, ob und gegebenenfalls (ggf.) wie sich eine exogene TKTL1-Expression auf die Proliferation der Zellen unter Standard- sowie unter restriktiven Kulturbedingungen auswirkt. Es folgten daraufhin weitere Untersuchungen zum Einfluss der exogenen TKTL1-Expression auf die Apoptoserate der Zellen. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im Folgenden beschrieben.

4.3.1 Einfluss von exogenem TKTL1 auf die Proliferation unter Standardkulturbedingungen

Zunächst wurde getestet, ob die exogene Expression von TKTL1 einen Einfluss auf die Proliferation der stabilen Zellklone unter Standardkulturbedingungen hat. Hierzu wurde die Proliferation von 293pCAG-TKTL1 Zellen in unmittelbarem Vergleich zur Proliferation der TKTL1-negativen Zelllinie 293pCAG- Δ untersucht. Beide Zelllinien wurden in gleicher Zahl ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert (10 % FKS, 5 % CO₂, 95 % Raumluft). Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen jeweils täglich bestimmt. Dabei konnte reproduzierbar bei den 293pCAG-TKTL1 Zellen eine um bis zu 20 % höhere Zellzahl (signifikant mit $p < 0,05$ im zweiseitigen t-Test an Tag 4) als bei den 293pCAG- Δ Zellen festgestellt werden (Abbildung 4.9).

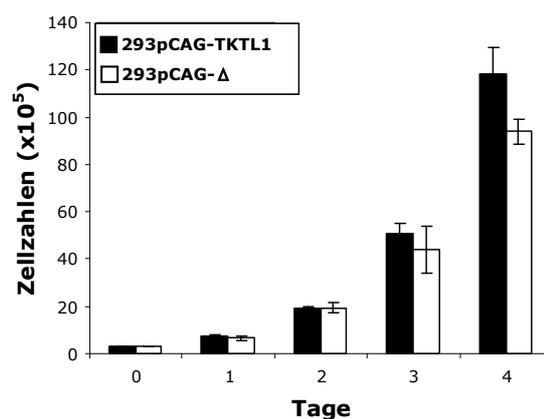


Abbildung 4.9: Vergleich der Proliferation von stabilen HEK293-Transfektanten unter Standardkulturbedingungen. 293pCAG-TKTL1 (schwarze Balken) und 293pCAG- Δ Zellen (weiße Balken) wurden mit jeweils 3×10^5 Zellen je Schale ausplattiert (Tag 0) und unter Standardbedingungen kultiviert. An vier aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Zellen jeweils geerntet und die Zellzahl in einer

Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Um diesen positiven Effekt von TKTL1 auf die Zellvermehrung zu verifizieren, erfolgte eine Repression des exogenen TKTL1 in 293pCAG-TKTL1 Zellen, indem die Transfektante mit einer TKTL1-spezifischen siRNA transient transfiziert wurde. Als Kontrolle erfolgte die Transfektion mit einer Kontroll-siRNA anstelle der spezifischen siRNA. Die Kontroll-siRNA führt nicht zur Herabregulation der TKTL1-Expression. Es schloss sich der unmittelbare Vergleich der Proliferation der so behandelten 293pCAG-TKTL1 Zellen an. Da die Wirkung der TKTL1-spezifischen siRNA in zuvor durchgeführten Versuchen nach etwa 3 Tagen nachließ (siehe Abbildung 4.4), fand eine Beobachtung der Proliferation hier nur über 3 Tage statt. Auch in diesem Versuch bestätigte sich der zuvor beschriebene Proliferationsvorteil TKTL1-exprimierender Zellen. Abbildung 4.10 zeigt, dass eine Repression von TKTL1 in 293pCAG-TKTL1 Zellen (weiße Balken) nach 3 Tagen zu deutlich niedrigeren Zellzahlen führte (34 % weniger an Tag 2, 38 % weniger an Tag 3) im Vergleich zu der Zelllinie, in der TKTL1 nicht herabreguliert wurde (schwarze Balken; Unterschied statistisch signifikant mit $p < 0,05$ im zweiseitigen t-Test an Tag 2).

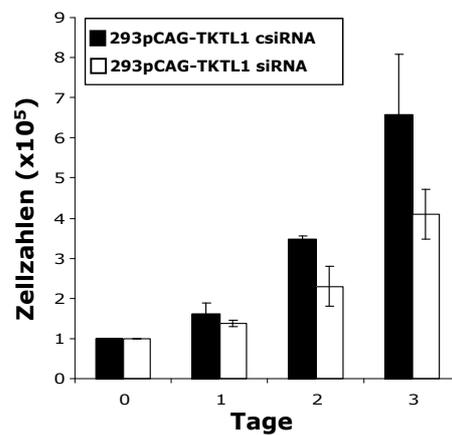


Abbildung 4.10: Vergleich der Proliferation von 293pCAG-TKTL1 Zellen mit und ohne TKTL1-Repression. 293pCAG-TKTL1 Zellen wurden mit 1×10^5 Zellen (Tag 0) je Kulturschale ausgesät und mit TKTL1-spezifischer siRNA (293pCAG-TKTL1 siRNA, weiße Balken) bzw. mit einer Kontroll-siRNA (293pCAG-TKTL1 csRNA, schwarze Balken) transient transfiziert. Die Kultivierung erfolgte über 3 Tage unter Standardkulturbedingungen, wobei eine tägliche Bestimmung der Zellzahl der jeweiligen Paare vorgenommen wurde. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen abgebildet.

Um die Effizienz der TKTL1-spezifischen siRNA zu verifizieren, wurden die mit TKTL1-spezifischer bzw. Kontroll-siRNA transient transfizierten 293pCAG-TKTL1 Zellen mittels RT-PCR und Immunoblot analysiert. In Abbildung 4.11 (A) ist die erfolgreiche Repression der TKTL1-mRNA bei einer Behandlung der Zellen mit spezifischer siRNA im Vergleich zu einer Behandlung mit der Kontroll-siRNA zu sehen. Die entsprechende Herabregulation des Proteins durch die TKTL1-siRNA ist im Immunoblot in Abbildung 4.11 (B) dargestellt.

Zusammengefasst ließ sich in den durchgeführten Versuchen ein moderater Proliferationsvorteil durch exogenes TKTL1 unter Standardkulturbedingungen beobachten.

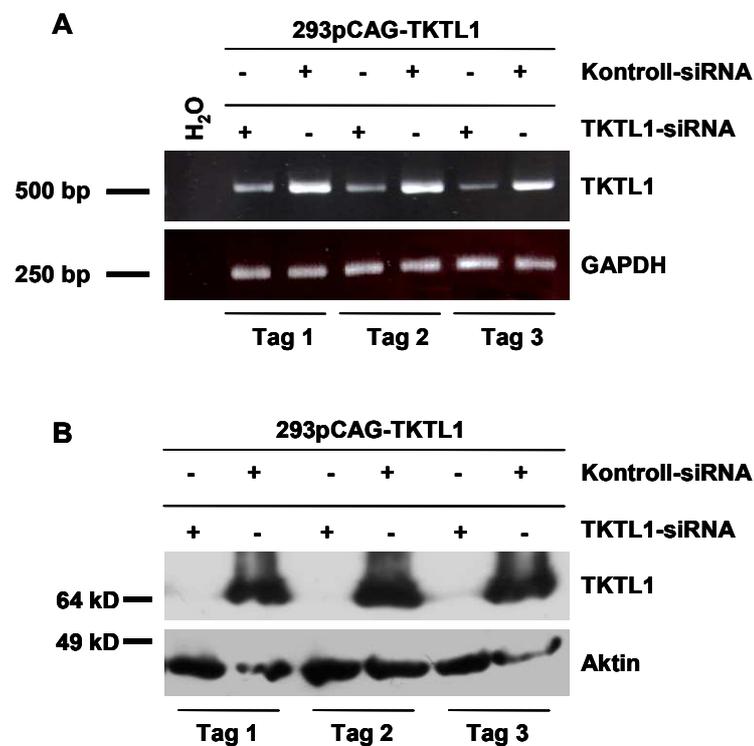


Abbildung 4.11: Nachweis der Effizienz der spezifischen TKTL1-siRNA. (A) Die mit spezifischer siRNA und Kontroll-siRNA behandelten 293pCAG-TKTL1 Zellen wurden mittels RT-PCR mit TKTL1-spezifischen Primern über 3 Tage hinweg untersucht (TKTL1: 510 bp). Als Ladekontrolle diente die mRNA-Expression des Haushaltsgens GAPDH (257 bp). Alle Proben wurden in der RT-PCR unter denselben Bedingungen analysiert (TKTL1: 25 Zyklen; GAPDH: 22 Zyklen). (B) Analyse der Zellen im Immunoblot mit Hilfe des TKTL1-Antikörpers JFC12T10 (TKTL1-Wildtypprotein: 65 kDa). Als Ladekontrolle wurde die Proteinexpression von Aktin in denselben Proben herangezogen (42 kDa). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

4.3.2 Einfluss von exogenem TKTL1 auf die Proliferation unter restriktiven Kulturbedingungen

Nachdem ein, wenn auch nur moderater, positiver Effekt des exogen exprimierten Proteins auf die Zellproliferation unter Standardkulturbedingungen (10 % FKS, 5 % CO₂, 95 % Raumluft) festgestellt werden konnte, wurden zusätzliche Proliferationsexperimente unter restriktiven Kulturbedingungen durchgeführt. 293pCAG-TKTL1 und 293pCAG-Δ Zellen wurden dabei unter hypoxischen Konditionen (0,1 % O₂, 5 % CO₂, Rest Stickstoff) oder unter Entzug von Wachstumsfaktoren (1 % FKS) kultiviert.

Hypoxie sollte über eine Bildung von Sauerstoffradikalen dazu beitragen, oxidativen Stress auf die Zellen auszuüben. Ziel dieses Versuchs war es zu testen, ob exogenes TKTL1 der 293pCAG-TKTL1 Zelllinie unter hypoxischen Bedingungen (wie sie auch innerhalb eines Tumors häufig vorkommen) einen Selektionsvorteil gegenüber TKTL1-negativen 293pCAG-Δ Zellen verschafft. Der Abbildung 4.12 ist zu entnehmen, dass beide stabile Transfektanten beim Wachstumsvergleich über 7 Tage unter hypoxischen Bedingungen ähnliche Wachstumskurven zeigten. Ein moderater TKTL1-vermittelter Proliferationsvorteil, wie er unter Standardkulturbedingungen zu beobachten war (Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10), konnte hier nicht mehr nachgewiesen werden. Die Zelllinien wuchsen bis Tag 5 auf annähernd gleiche Zellzahlen an (statistisch an allen Tagen kein signifikanter Unterschied, $p > 0,05$) und starben dann innerhalb von 2 Tagen, sodass die Zellzahlen an Tag 7 auf bis zu 31 % der ursprünglich ausgesäten Zellzahl abfielen (Abbildung 4.12). Der Großteil der Zellen haftete an Tag 7 nicht mehr am Boden der Kulturschale, sondern schwamm im Medium. Zudem wurde als typisches Zeichen der Apoptose ein Schrumpfen der Zellen unter dem Mikroskop detektiert (Daten hier nicht gezeigt). Beim Auszählen der Zellen in der Fuchs-Rosenthal-Kammer konnte darüber hinaus bei einem großen Teil der Zellen eine starke Blaufärbung festgestellt werden, die durch eine Aufnahme der zugegebenen Trypanblaulösung in tote Zellen entsteht (Daten hier nicht gezeigt). Das Absterben der Zellen nach Tag 5 ist zum einen aufgrund einer Übersäuerung des Mediums durch CO₂ sowie aufgrund der Bildung von Sauerstoffradikalen und damit einhergehender Apoptose zu erklären. Insgesamt zeigten beide stabile Transfektanten unter hypoxischen Bedingungen über den Zeitverlauf eine schlechtere Proliferationstendenz und geringere Zellzahlen als unter Standardkulturbedingungen. Während unter Standardkulturbedingungen 293pCAG-TKTL1 Zellen bis Tag 4 bereits um das 39,3fache und 293pCAG-Δ Zellen um das 31,4fache der ursprünglich ausgesäten Zellzahl gewachsen waren (Abbildung 4.9), zeig-

ten die Zellen unter hypoxischen Bedingungen noch an Tag 5 nur ein Wachstum, welches das 9,2fache (293pCAG-TKTL1 Zellen) und das 9,7fache (293pCAG- Δ Zellen) der ursprünglichen Zellzahlen betrug (Abbildung 4.12).

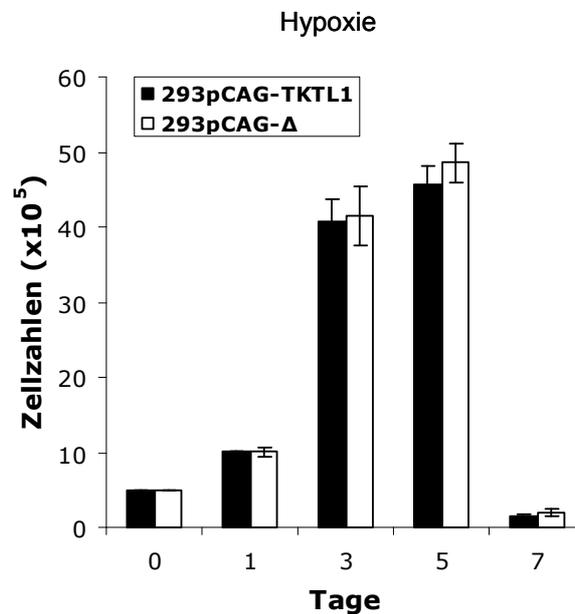


Abbildung 4.12: Vergleich der Proliferation stabiler HEK293-Transfektanten unter hypoxischen Bedingungen. 293pCAG-TKTL1 (schwarze Balken) und 293pCAG- Δ Zellen (weiße Balken) wurden in einer initialen Dichte von 5×10^5 Zellen pro Schale ausplattiert und unter Hypoxie (0,1 % O₂, 5 % CO₂, Rest Stickstoff) bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen (10 % FKS) über 7 Tage kultiviert. Alle 2 Tage erfolgte die Bestimmung der Zellzahlen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Versuchen.

Als weitere restriktive Bedingung für die Kultivierung der Zellen wurde der Entzug von Wachstumsfaktoren gewählt. 293pCAG-TKTL1 Zellen und 293pCAG- Δ Zellen wurden hierfür in einem Medium kultiviert, dem nur 1 % FKS und nicht 10 % FKS, wie unter Standardbedingungen üblich, zugegeben wurde. FKS enthält diverse Faktoren, u. a. Proteine, Wachstumsfaktoren, Aminosäuren und Hormone, die für die Proliferation und die Kultivierung von Zellen notwendig sind. Die Zellen wurden über 7 Tage bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen (5 % CO₂, 95 % Raumluft) kultiviert und alle 2 Tage ausgezählt, um einen Proliferationsvergleich der beiden stabilen Transfektanten zu erhalten. Während die 293pCAG- Δ Zellen unter den gegebenen Bedingungen nur schlecht proliferierten und die Zellzahl an Tag 7 nur knapp dem 5fachen der Ausgangszellzahl entsprach, stieg die Zellzahl der 293pCAG-TKTL1 Zellen um das 32,5fache im Vergleich zur ausgesäten Zellzahl an (Abbildung 4.13). An Tag 5 und 7 waren die Zell-

zahlen der TKTL1-positiven stabilen Transfektante (Abbildung 4.13, schwarze Balken) mit $p < 0,05$ im zweiseitigen t-Test signifikant höher (an Tag 5 7,2fach, an Tag 7 6,6fach) als die der TKTL1-negativen stabilen Transfektante (Abbildung 4.13, weiße Balken). Auch unter dem Entzug von Wachstumsfaktoren war eine insgesamt schlechtere Proliferation der Zellen als unter Standardkulturbedingungen zu beobachten. Unter Standardkulturbedingungen wuchsen 293pCAG-TKTL1 Zellen bis Tag 4 bereits um das 39,3fache und 293pCAG- Δ Zellen um das 31,4fache der ursprünglich ausgesäten Zellzahlen (Abbildung 4.9), während unter Wachstumsfaktorenentzug bis Tag 7 nur das 32,5fache der Ausgangszellzahl bei den 293pCAG-TKTL1 Zellen und das 5fache bei den 293pCAG- Δ Zellen erreicht wurde (Abbildung 4.13). Unter diesen Bedingungen fand kein massives Sterben der Zellen zwischen Tag 5 und Tag 7 statt, wie es unter Hypoxie zu beobachten war (siehe Abbildung 4.12). Bei beiden Zelllinien konnte bis Tag 7 eine Zunahme der Zellzahl verzeichnet werden. Zusammenfassend konnte also unter hypoxischen Bedingungen kein positiver Effekt von exogenem TKTL1 auf die Zellproliferation beobachtet werden (Abbildung 4.12), während unter Entzug von Wachstumsfaktoren ein deutlicher Proliferationsvorteil der TKTL1-positiven stabilen Transfektante gegenüber der TKTL1-negativen Transfektante zu sehen war (Abbildung 4.13).

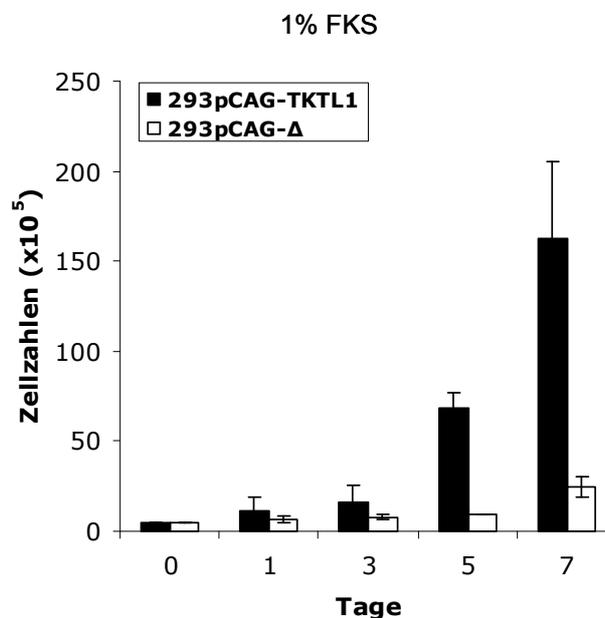


Abbildung 4.13: Vergleich der Proliferation stabiler HEK293-Transfektanten unter Entzug von Wachstumsfaktoren. 293pCAG-TKTL1 und 293pCAG- Δ Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen je Kulturschale ausgesät und in einem Medium, supplementiert mit 1 % FKS, über 7 Tage kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 Tage geerntet und gezählt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.4 Auswirkung der exogenen TKTL1-Expression auf die Apoptoserate

Nachdem ein Selektionsvorteil von TKTL1-exprimierenden Zellen im Vergleich zu TKTL1-negativen Zellen unter Entzug von Wachstumsfaktoren festgestellt werden konnte, wurde untersucht, ob die exogene Expression des Proteins auch Einfluss auf die Apoptoserate der Zellen unter restriktiven Bedingungen hat. Die stabilen Transfektanten aus den zuvor beschriebenen Proliferationsversuchen (siehe Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13) wurden hierfür nach dem Bestimmen der Zellzahlen mit Propidiumiodid gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert, um den apoptotischen Anteil der Zellen zu bestimmen. Das fluoreszierende Propidiumiodid interkaliert in die zelluläre DNA und kann im Durchflusszytometer gemessen werden. Der Anteil der apoptotischen Zellen in einer Zellpopulation wird dabei vom subgenomischen DNA-Gehalt repräsentiert. Es handelt sich hierbei um fragmentierte DNA, die typischerweise während der Apoptose von Zellen gebildet wird. Diese fragmentierte DNA erscheint in der durchflusszytometrischen Auswertung noch vor dem G1-Ausschlag, der die G1-Phase des Zellzyklus und damit einen diploiden, unfragmentierten Chromosomensatz repräsentiert (Nicoletti *et al.*, 1991; Riccardi & Nicoletti, 2006). Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der stabilen Transfektanten, die über 7 Tage unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, ließen sich über den gesamten Beobachtungszeitraum bei beiden Zelllinien ähnliche Werte für den subgenomischen DNA-Gehalt und damit die Apoptoserate ableiten (Abbildung 4.14). Dies stimmt mit den Ergebnissen aus der Zellzahlanalyse unter Hypoxie (Abbildung 4.12) überein, bei der beide Transfektanten bis Tag 5 ähnliche Zellzahlen aufwiesen. Die Rate der apoptotischen Zellen bewegte sich bei beiden Transfektanten bis Tag 5 in niedrigen Bereichen bei im Mittel unter 3,5 %, während sie an Tag 7, parallel zum starken Abfall der Zellzahlen (Abbildung 4.12), abrupt auf bis zu 20 % anstieg (Abbildung 4.14). Es konnte über den gesamten Zeitraum kein signifikanter Unterschied in der Rate der apoptotischen Zellen zwischen beiden Zelllinien ermittelt werden ($p > 0,05$).

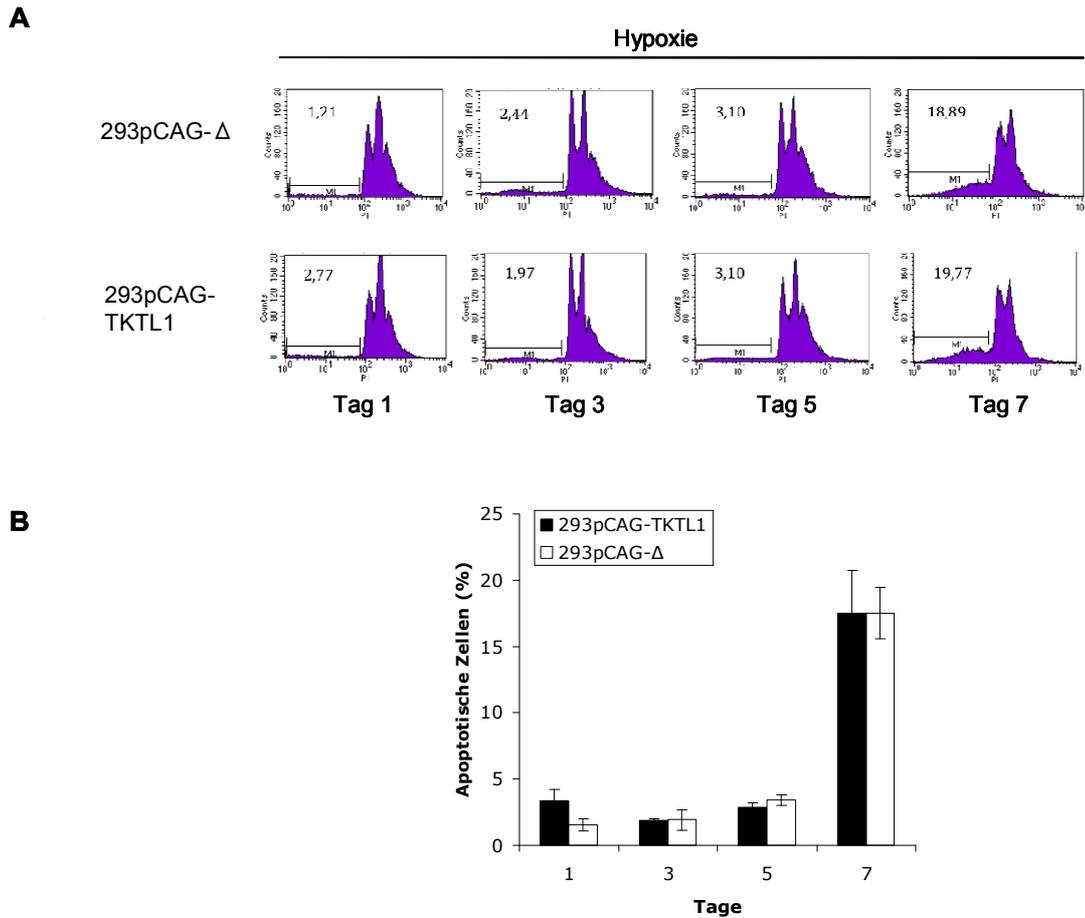


Abbildung 4.14: Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptoseraten von stabilen HEK293-Transfektanten unter Hypoxie. (A) 293pCAG-TKTL1 und 293pCAG-Δ Zellen wurden mit 5×10^5 Zellen/Schale ausplattiert und über 7 Tage unter hypoxischen Konditionen kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 Tage vollständig geerntet, d. h. anhaftende wie auch schwimmende Zellen einer Kulturschale, und mittels PI-FACS auf den subgenomischen DNA-Gehalt, der den Anteil an apoptotischen Zellen repräsentiert, hin analysiert. Dieser ist mit M1 (Marker M1) gekennzeichnet. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen von zwei unabhängigen Versuchen. (B) Gezeigt sind die prozentualen Mittelwerte der apoptotischen Zellen mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die TKTL1-negative Transfektante, die über 7 Tage lang unter Wachstumsfaktorenentzug (1 % FKS) kultiviert wurde, zeigte bei der Auswertung mittels PI-FACS kontinuierlich ansteigende Werte für den fragmentierten DNA-Gehalt auf bis zu 11 %. Bei der TKTL1-positiven Transfektante hingegen blieb unter den gleichen Bedingungen der Anteil der apoptotischen Zellen mit einem Wert von im Mittel unter 4 % auf niedrigem Niveau (Abbildung 4.15; hoch signifikanter Unterschied mit $p < 0,01$ an Tag 5 im zweiseitigen t-Test). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die exogene Expression von TKTL1 mit einer Reduktion der Apoptose nach Wachstumsfaktorenentzug einhergeht.

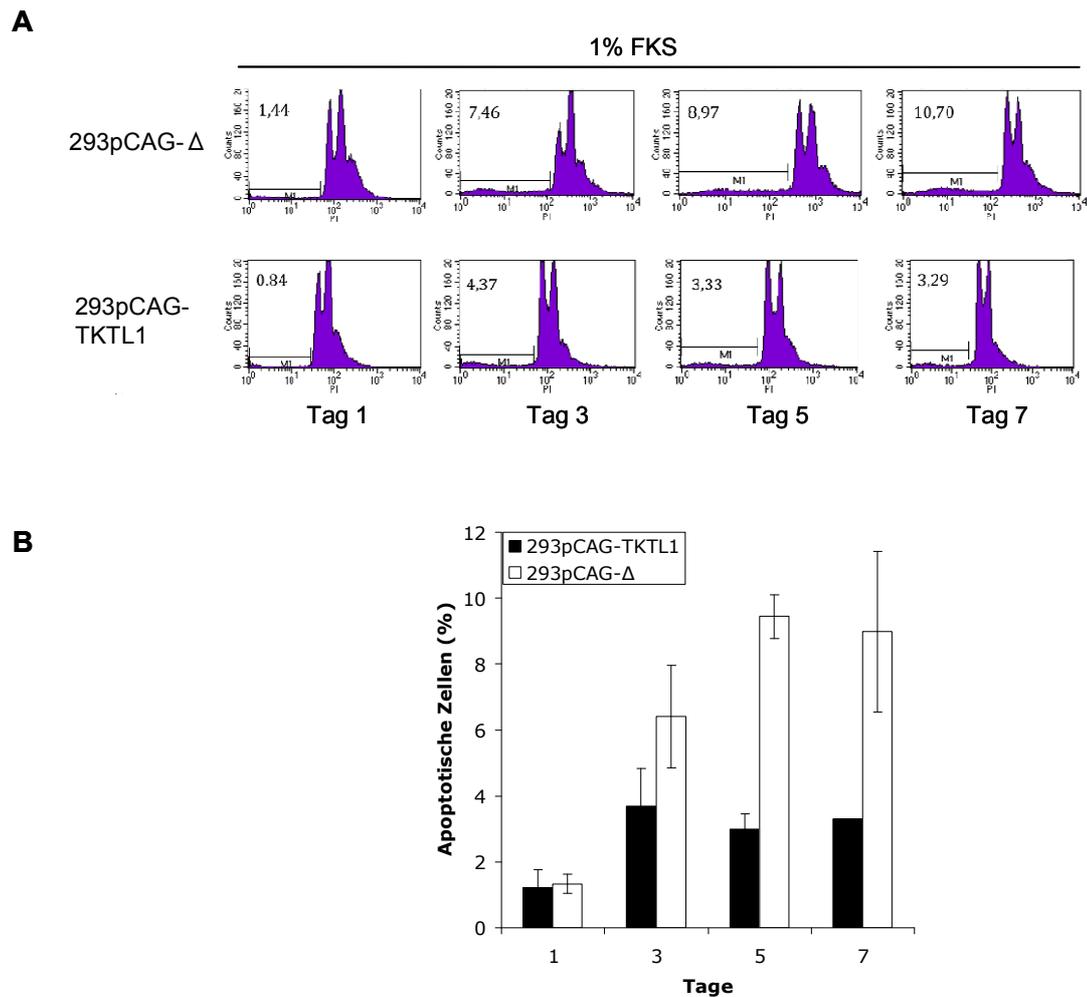


Abbildung 4.15: Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptoseraten von stabilen HEK293-Transfektanten unter Entzug von Wachstumsfaktoren. (A) Die Zelllinien 293pCAG-TKTL1 und 293pCAG- Δ wurden, ausgehend von einer initialen Zellzahl von 5×10^5 Zellen/Schale, 7 Tage lang in einem Medium kultiviert, das 1 % FKS enthielt. Alle 2 Tage wurden alle Zellen (sowohl anhaftende als auch schwimmende) einer Kulturschale geerntet und mit der PI-FACS-Methode der Anteil der apoptotischen Zellen ausgewertet (M1, Marker M1). Zu sehen sind repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Versuchen. **(B)** Dargestellt ist ein Balkendiagramm der prozentualen Mittelwerte der Zellen mit einem Gehalt an fragmentierter DNA mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

5 DISKUSSION

5.1 Die Expression und Funktion von TKTL1 in der Literatur

Wie bereits einleitend beschrieben, stellten Warburg *et al.* (1924) vor über 90 Jahren die Hypothese auf, dass Tumorzellen auch bei Anwesenheit von Sauerstoff vorwiegend die aerobe Glykolyse betreiben, statt der wesentlich effizienteren oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, um Energie in Form von ATP zu generieren. Die bevorzugte aerobe Glykolyse in Tumorzellen wird auch als „Warburg-Effekt“ bezeichnet. Um ihren gesteigerten Bedarf an Ribosen für die Synthese von Nukleinsäuren (DNA und RNA) zu decken, greifen die rasch proliferierenden Tumorzellen außerdem hauptsächlich auf den nicht-oxidativen Abschnitt des Pentosephosphatweges zurück (Boros *et al.*, 1997; Wittig & Coy, 2008). Essenzielle Reaktionen des nicht-oxidativen Abschnittes werden dabei von dem Enzym Transketolase katalysiert. Die Familie der Transketolasen besteht aus der TKT selbst sowie den Transketolase-ähnlichen Proteinen TKTL1 und TKTL2. TKTL1 stand in den letzten Jahren im Fokus vieler Tumorstudien seit von Coy *et al.* (2005) dessen Überexpression in Karzinomen und eine veränderte enzymatische Funktion des Proteins beschrieben wurde, welche die aerobe Glykolyse in Tumorzellen fördert. Seitdem wurde in zahlreichen Publikationen eine Überexpression von TKTL1 in den verschiedensten soliden Tumoren beschrieben (Ahopelto *et al.*, 2016; Bentz *et al.*, 2013; Diaz-Moralli *et al.*, 2011; Foldi *et al.*, 2007; Fritz *et al.*, 2012; Grimm *et al.*, 2014; Jayachandran *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2015; Kayser *et al.*, 2011; Kohrenhagen *et al.*, 2008; Krockenberger *et al.*, 2010; Krockenberger *et al.*, 2007; Langbein *et al.*, 2008; Langbein *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 2008; Schwaab *et al.*, 2011; Semilia *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015; Staiger *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010; Volker *et al.*, 2008; Volker *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Zerilli *et al.*, 2008). Die TKTL1-Überexpression wurde dabei von einigen Autoren in Verbindung mit einer schlechten Prognose der Patienten gebracht (Ahopelto *et al.*, 2016; Grimm *et al.*, 2013; Jayachandran *et al.*, 2016; Kayser *et al.*, 2011; Krockenberger *et al.*, 2007; Langbein *et al.*, 2008; Langbein *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2012; Schwaab *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015; Volker *et al.*, 2007), während andere wiederum keinen Zusammenhang zwischen der TKTL1-Expression und prognostischen Faktoren herstellen

konnten (Diaz-Moralli *et al.*, 2011; Fenske *et al.*, 2009; Foldi *et al.*, 2007; Fritz *et al.*, 2012; Philipp *et al.*, 2014; Semilia *et al.*, 2015). TKTL1 wurde des Weiteren in Verbindung mit der Proliferation von verschiedenen Tumorzelllinien gebracht (Chen *et al.*, 2009; Diaz-Moralli *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2007; Jayachandran *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010). Eine potenzielle Beteiligung von TKTL1 im Stoffwechsel rasch proliferierender Zellen und die Überexpression in Karzinomen führten zu der Annahme, dass TKTL1 nicht nur als Bio- bzw. Tumormarker Verwendung finden könnte (Feyen *et al.*, 2012; Foldi *et al.*, 2007; Grimm *et al.*, 2013; Jansen & Coy, 2013; Kayser *et al.*, 2011; Langbein *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2016; Staiger *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009), sondern auch ein Ziel für die Antitumorthherapie darstellt (Chen *et al.*, 2009; Diaz-Moralli *et al.*, 2016; Diaz-Moralli *et al.*, 2011; Foldi *et al.*, 2007; Fritz *et al.*, 2012; Frohlich *et al.*, 2009; Grimm *et al.*, 2014; Jayachandran *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2015; Kayser *et al.*, 2011; Krockenberger *et al.*, 2010; Krockenberger *et al.*, 2007; Langbein *et al.*, 2008; Langbein *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015; Staiger *et al.*, 2006; Volker *et al.*, 2008; Volker *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010). Bezüglich einer gezielt gegen TKTL1 gerichteten Antitumorthherapie war Oxythiamin jedoch in den Versuchen von Jayachandran *et al.* (2016) und Frohlich *et al.* (2009) nicht ausreichend wirksam, um eine Hemmung der Proliferation der untersuchten Karzinomzelllinien, die eine hohe TKTL1-Expression aufwiesen, zu bewirken. In den Experimenten von Kämmerer *et al.* (2015) konnte zudem keine erhöhte Resistenz gegen die Chemotherapeutika Paclitaxel und Cisplatin oder gegenüber ionisierender Strahlung der beiden malignen Zelllinien festgestellt werden, in welchen eine endogene TKTL1-Expression nachgewiesen werden konnte. Hinsichtlich der Verwendung von TKTL1 als Tumormarker existieren bereits einige Veröffentlichungen zur Anwendung des EDIM-TKTL1-Tests zur Bestimmung des Enzyms im Blut, wodurch die Früherkennung von Malignomen, Rezidiven, einer Metastasenbildung und die Wirksamkeit operativer Therapien möglich sein soll (Coy, 2017; Feyen *et al.*, 2012; Grimm *et al.*, 2016a; Grimm *et al.*, 2016b; Grimm *et al.*, 2016c; Grimm *et al.*, 2013; Jansen & Coy, 2013; Jansen & Walach, 2016; Todenhofer *et al.*, 2017). Laut einer wissenschaftlichen Stellungnahme der Deutschen Krebsgesellschaft (Arbeitsgemeinschaft Prävention und Integrative Onkologie) handelt es sich bei diesem Testverfahren jedoch weder um ein validiertes Verfahren der *In-vitro*-Diagnostik, noch ist es zur Diagnose von Tumorerkrankungen, deren Prognoseeinschätzung oder der Beurteilung des Therapieansprechens geeignet und wird von der Exper-

tengruppe daher nicht empfohlen (siehe Stellungnahme zur Bestimmung des Enzyms TKTL1 mit dem EDIM-Test unter <https://www.krebsgesellschaft.de>). Während der EDIM-Test auf einem Nachweis von phagozytiertem TKTL1 in Makrophagen beruht, untersuchten Tsaur *et al.* (2016) TKTL1 im Serum mittels *ELISA* (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) in Patienten mit Prostatakarzinomen. Sie stellten fest, dass das Serum-TKTL1 in Patienten mit Prostatakarzinom im Vergleich zu gesunden Patienten signifikant niedriger war, was im Gegensatz zur beschriebenen Erhöhung von EDIM-TKTL1-Messwerten in Tumorpatienten steht (Tsaur *et al.*, 2016). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte nach Ansicht der Autoren darin liegen, dass TKTL1 von den Makrophagen aufgenommen wurde und die TKTL1-Spiegel im Serum daher sinken (Tsaur *et al.*, 2016).

Von Smith *et al.* (2009) und Sun *et al.* (2010) wurde ein Zusammenhang zwischen einer TKTL1-Überexpression in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs und einer Hypomethylierung des TKTL1-Promotors festgestellt und TKTL1 als potenzielles neues Onkogen angesehen, welches durch die Hypomethylierung des Promotors aktiviert wird (Sun *et al.*, 2010). Übereinstimmend hiermit konnten auch Jayachandran *et al.* (2016) eine Hypomethylierung des TKTL1-Promotors in Melanomzelllinien mit einer hohen TKTL1-Expression und umgekehrt eine Hypermethylierung in normalen Melanozyten und Melanomzelllinien, die kein TKTL1 exprimierten, nachweisen. Zudem konnten die Autoren die Hypermethylierung in einer Melanomzelllinie ohne TKTL1-Expression durch eine Behandlung mit dem DNA-demethylierenden Agens *5-Aza-2'-deoxycytidine* (5aza) aufheben, was letztlich in einer Expression von TKTL1 resultierte (Jayachandran *et al.*, 2016). Die Autoren gehen daher ebenfalls von einer Aktivierung der TKTL1-Expression durch die Hypomethylierung des TKTL1-Promotors aus (Jayachandran *et al.*, 2016). Interessanterweise fanden Li *et al.* (2016) dementsgegen in kolorektalen Karzinomen eine signifikante Hypermethylierung des TKTL1-Promotors und sahen TKTL1 daher als potenzielles neues Tumorsuppressorgen an, welches durch die Hypermethylierung des Promotors inaktiviert wird.

Bentz *et al.* (2011) demonstrierten in ihrer Studie eine verstärkte Entzündungsreaktion in Mäusen mit Dextran-Natriumsulfat-induzierter Kolitis nach der Inaktivierung von TKTL1. Von den Autoren wird eine mögliche Rolle von TKTL1 bei der Mukosaregeneration diskutiert, indem TKTL1 indirekt NADPH über den Pentosephosphatweg nachliefert und somit zur Vermeidung von Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies beiträgt, die bei einer intestinalen Inflammation entstehen (Bentz *et al.*, 2011).

Mayer *et al.* (2010) sprachen sich in einer kritischen Auseinandersetzung mit dem Thema des TKTL1-Proteins gegen eine Expression des Proteins im Zusammenhang mit Malignomen aus und postulierten, dass der Glukosestoffwechsel von malignen Zellen nicht von TKTL1 reguliert wird. Auch in den Experimenten von Kämmerer *et al.* (2015) war die TKTL1-Expression in einer breiten Auswahl von malignen Zelllinien ein seltenes Ereignis.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das Expressionsmuster von TKTL1 in verschiedenen Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene, in einem Larynxkarzinom mittels verschiedener Fixierungs-, Konservierungs- und Antigendemaskierungsmethoden sowie in gesunden kryokonservierten Geweben analysiert. Anschließend folgten Untersuchungen hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen der exogenen TKTL1-Expression in stabilen HEK293-Transfektanten und der Proliferation sowie den Apoptoseraten dieser Zellen. Nachdem die Ergebnisse dieser Experimente zuvor bereits beschrieben wurden, sollen diese nun im Folgenden, auch im Vergleich mit den Resultaten anderer Autoren, diskutiert werden.

5.2 Die Detektion von TKTL1

Die Detektion von TKTL1 erfolgte in den bisher vorhandenen Publikationen auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und Western Blot und auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR. Immunhistochemische Untersuchungen fanden dabei fast ausschließlich an Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben statt, die zur Antigendemaskierung in Citratpuffer gekocht wurden. Bei Durchsicht der vorhandenen Literatur zu TKTL1 fiel auf, dass bei Analysen sowohl mit RT-PCR als auch in Immunoblots unterschiedliche und zum Teil sehr kontroverse Expressionsmuster von TKTL1 beschrieben wurden. Dies gab den Anlass dazu, eigene Untersuchungen zur TKTL1-Expression durchzuführen, die in der vorliegenden Arbeit bereits beschrieben wurden.

5.2.1 Die Detektion von TKTL1 mittels RT-PCR und Immunoblot

Wie im Ergebnisteil schon ausgeführt wurde, war THP-1 die einzige der in dieser Arbeit untersuchten malignen Zelllinien, in der endogene TKTL1-mRNA nachgewiesen werden konnte. In allen anderen Tumorzelllinien, einschließlich HeLa und MCF-7 Zellen, blieb das Expressionsniveau der TKTL1-mRNA unterhalb der Nachweisgrenze der RT-PCR (siehe 4.1.1). Dies steht in Widerspruch zu den Resultaten von Chen *et al.* (2009), die endogene TKTL1-mRNA in HeLa-Zellen nachweisen konnten. Eine mögli-

che Erklärung hierfür könnte die Verwendung unterschiedlicher Primer in den Experimenten von Chen *et al.* (2009) und der vorliegenden Arbeit sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation werden allerdings von Mayer *et al.* (2010) bekräftigt, die in HeLa und MCF-7 Zellen unter Verwendung der gleichen Primer wie Chen *et al.* (2009) ebenfalls keine relevante TKTL1-Expression detektieren konnten. Ein nennenswerter Nachweis der TKTL1-mRNA war dabei in insgesamt sechs malignen Zelllinien (HeLa, MCF-7, A549, HT-1080, TF-1, M21) auch unter Verwendung von zwei weiteren unterschiedlichen Primerpaaren nicht möglich (Mayer *et al.*, 2010). Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten auch Kämmerer *et al.* (2015) unter Anwendung von drei verschiedenen Primerpaaren in HeLa und MCF-7 Zellen sowie in dreizehn weiteren Karzinomzelllinien keine relevante endogene TKTL1-Expression auf Transkriptebene nachweisen. Dahingegen gelang der Nachweis der TKTL1-mRNA in den oralen Plattenepithelkarzinomzelllinien BICR3 und BICR56 (Grimm *et al.*, 2014), in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien (Bentz *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009), in der Magenkarzinomzelllinie AGS (Yuan *et al.*, 2010), den Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und HEC-1A (Krockenberger *et al.*, 2010), in elf Melanomzelllinien (Jayachandran *et al.*, 2016), in vier Ösophaguskarzinomzelllinien (Li *et al.*, 2015) sowie in den Nasopharynxkarzinomzelllinien CNE2 und HONE1 (Dong & Wang, 2017).

Bei der Literaturrecherche zur TKTL1-Expression fiel zudem auf, dass Coy *et al.* (2005) endogenes TKTL1-Protein im Immunoblot in der Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 nachweisen konnten. Dies gelang jedoch später Xu *et al.* (2009) trotz der Detektion der TKTL1-mRNA in eben dieser Zelllinie und trotz Verwendung des gleichen Antikörpers JFC12T10 nicht mehr. Auch Kämmerer *et al.* (2015) gelang ein Nachweis des endogenen TKTL1-Volllängenproteins im Immunoblot in HCT-116 Zellen mit dem Antikörper JFC12T10 und zwei weiteren Antikörpern nicht. In der Veröffentlichung von Coy *et al.* (2005) konnten in unterschiedlichen Tumorzelllinien mit dem von den Autoren selbst generierten Antikörper JFC12T10 im Immunoblot verschiedene Proteine detektiert werden, deren Molekulargewicht sich zwischen 40 und 75 kDa bewegte. Diese beschrieben die Autoren als TKTL1-Isoformen (Coy *et al.*, 2005). Kleinere Proteinisoformen, die sich im Bereich zwischen 40 und 58 kDa bewegten, wurden dabei von den Verfassern auf die Existenz von kleineren mRNA-Transkripten zurückgeführt, die sie bereits in Normalgeweben wie beispielsweise Herz, Gehirn, Plazenta oder Lunge nachweisen konnten (Coy *et al.*, 2005). Das TKTL1-Volllängenprotein mit einer be-

rechneten Größe von 65 kDa (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_036385.3) konnte allerdings in keiner der von Coy *et al.* (2005) analysierten Karzinomzelllinien nachgewiesen werden. Die Autoren gingen aber davon aus, dass es sich bei der in allen Zelllinien vorhandenen 75 kDa Proteinbande um das native TKTL1-Volllängenprotein handelte, auch wenn diese ein wesentlich größeres Molekulargewicht aufwies. Wissenschaftliche Erklärungen hierzu wurden jedoch nicht gegeben (Coy *et al.*, 2005). Volker *et al.* (2008) fanden bei der Analyse von normalem Hirngewebe, astrozytischen Gliomen sowie Glioblastomen mittels Western Blot und dem Antikörper JFC12T10 zwei Proteine mit Molekulargewichten von 60 kDa und 70 kDa, die sie als Splicevarianten von TKTL1 bezeichneten. Im Fall von Schilddrüsenkarzinomzellen wurde das Molekulargewicht von TKTL1 im Western Blot mit Hilfe des JFC12T10-Antikörpers sogar mit 92 kDa publiziert (Frohlich *et al.*, 2009). In keiner der bisher genannten Veröffentlichungen konnte das Volllängenprotein bei 65 kDa detektiert werden. Lediglich Bentz *et al.* (2013) wiesen TKTL1 in kolorektalen Tumorzelllinien als Protein mit einem Molekulargewicht von 65,4 kDa und Jayachandran *et al.* (2016) (in den ergänzenden Daten zu ihrer Publikation) in Melanomzelllinien mit 64 kDa im Immunoblot mit dem Antikörper JFC12T10 nach. Interessant ist, dass auch in den von Bentz *et al.* (2013) abgebildeten Immunoblots in der Mehrzahl der untersuchten Zelllinien zusätzliche Proteinbanden mit einem größeren Molekulargewicht zu sehen sind, zu denen keine weitere Stellungnahme erfolgte (Bentz *et al.*, 2013). Jayachandran *et al.* (2016) hingegen betonten den fehlenden Nachweis zusätzlicher Proteinbanden in ihren Western Blot Experimenten. Sun *et al.* (2010) konnten im Immunoblot unter Verwendung des JFC12T10-Antikörpers eine Überexpression von TKTL1 in der Pharynxplattenepithelkarzinomzelllinie FaDu ermitteln. Die Bewertung der TKTL1-Expression in dieser Publikation wird allerdings dadurch erschwert, dass jegliche Angaben zum Molekulargewicht der detektierten Proteinbanden fehlen (Sun *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Sun *et al.* (2010) konnte in der vorliegenden Arbeit TKTL1 weder auf mRNA- noch auf Proteinebene in der Zelllinie FaDu nachgewiesen werden (siehe 4.1.1 und 4.1.2). Li *et al.* (2014) detektierten TKTL1 mit einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen im Western Blot in HeLa und MCF-7 Zellen, wohingegen in der vorliegenden Dissertation kein endogenes TKTL1 in MCF-7 Zellen mittels RT-PCR und in HeLa Zellen mittels RT-PCR und Immunoblot unter Anwendung des JFC12T10-Antikörpers ermittelt werden konnte (siehe 4.1.1 und 4.1.2). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden wiederum von Kämmerer *et al.* (2015) bestätigt, die mit dem JFC12T10-Antikörper und

zwei weiteren Antikörpern (darunter auch ein polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen) kein endogenes TKTL1 auf Proteinebene im Western Blot in HeLa und MCF-7 Zellen nachweisen konnten. Eine mögliche Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse kann in der Verwendung unterschiedlicher Antikörper liegen. Allerdings ist zu beachten, dass auch in der Veröffentlichung von Li *et al.* (2014) zusätzliche Proteinbanden in den Immunoblots zur Darstellung kamen und erneut jegliche Angaben zum Molekulargewicht der detektierten Proteinbanden fehlten, was eine valide Bewertung der Ergebnisse beeinträchtigt (Li *et al.*, 2014). Insgesamt fiel bei Durchsicht der vorhandenen Literatur auf, dass bei der Präsentation von Immunoblots in Publikationen oftmals nur kleine Ausschnitte dargestellt wurden und die Angabe von Größenmarkern vollständig fehlte (Diaz-Moralli *et al.*, 2011; Dong & Wang, 2017; Li *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2010), sodass eine Beurteilung eventuell vorhandener zusätzlicher Proteinbanden nicht möglich und die Interpretation und Evaluation der Ergebnisse deutlich erschwert war.

Analog zu den beschriebenen Resultaten konnten auch im Rahmen dieser Dissertation verschiedene Proteinbanden im Immunoblot unter Verwendung des JFC12T10-Antikörpers detektiert werden, deren Molekulargewicht von 40 bis 78 kDa reichte (siehe 4.1.2). Analysiert wurden dabei permanente Zelllinien, welche aus Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (FaDu, PCI-1, PCI-13), Zervixkarzinomen (HeLa), Mammakarzinomen (SkBr-3) oder Kolonkarzinomen (HCT-8) generiert wurden und zudem die akute monozytäre Leukämiezelllinie THP-1 sowie stabile HEK293-Transfektanten. In THP-1 und 293pCAG-TKTL1 Zellen wies die Hauptproteinbande ein Molekulargewicht von 65 kDa auf. Die Detektion zusätzlicher Banden trat insbesondere nach verlängerter Expositionszeit des Röntgenfilms auf (siehe 3.2). In FaDu, PCI-1, PCI-13, HeLa, SkBr-3 und HCT-8 Zellen war das TKTL1-Volllängenprotein nicht nachweisbar, jedoch zwei Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von ungefähr 42 und 78 kDa, die auch in der Kontrollzelllinie 293pCAG- Δ auftraten. Eine mögliche Erklärung für die Detektion von Proteinen unterschiedlicher Größe mit dem TKTL1-Antikörper JFC12T10 könnte theoretisch in dem Vorhandensein von TKTL1-Isoformen liegen. Diese können aufgrund eines alternativen Spleißens der TKTL1-mRNA oder einer co- bzw. posttranslationalen Modifikation des Proteins entstehen. Beim alternativen Spleißens können Exons mit den kodierenden Sequenzen in der mRNA auf unterschiedliche Weise zusammengefügt oder Exons ausgelassen werden, sodass aus einem Gen verschiedene mRNAs und folglich auch verschiedene Proteine entstehen können (Rassow *et al.*, 2012, S. 452f.).

Bei co- und posttranslationalen Modifikationen finden während oder nach der Translation enzymatisch katalysierte Veränderungen der Proteine statt (Rassow *et al.*, 2012, S. 470ff.). In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob es sich bei den zusätzlich zur Hauptproteinbande aufgetretenen Banden tatsächlich um TKTL1-Isoformen handelt, indem die Expression des Proteins in der stabilen Transfektante 293pCAG-TKTL1 mit einer spezifischen siRNA reprimiert wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass lediglich das Volllängenprotein bei 65 kDa herabreguliert wurde und die beiden anderen Proteinbanden (42 und 78 kDa) unbeeinflusst blieben. Würde es sich bei den beiden zusätzlichen Proteinbanden um TKTL1-Isoformen handeln, wäre auch eine Repression dieser Proteine durch die spezifische siRNA zu erwarten gewesen. Allerdings ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, dass beim alternativen Spleißen die mRNA des kleineren Proteins (42 kDa) so verändert wurde, dass die spezifische siRNA nicht mehr binden konnte. Davon ist jedoch bei dem größeren Protein (78 kDa) nicht auszugehen, da hier, angenommen es handelt sich um eine Isoform von TKTL1, die mRNA wohl in voller Länge translatiert wurde und das Protein erst posttranslational verändert wurde. Die siRNA hätte somit die mRNA binden und zu deren Abbau oder zu einer Hemmung der Translation führen müssen. Zudem konnte in immunzytochemischen Analysen der TKTL1-Proteinexpression in keiner der Zelllinien, in denen die beiden zusätzlichen Proteinbanden zuvor im Western Blot auftauchten, eine Färbung detektiert werden (siehe 4.1.3). Lediglich 293pCAG-TKTL1 und THP-1 Zellen, in denen das Volllängenprotein schon im Immunoblot nachgewiesen werden konnte, zeigten mit dem JFC12T10-Antikörper eine Färbung. Sehr viel wahrscheinlicher ist es also, dass nur die 65 kDa Proteinbande TKTL1 repräsentiert.

Unterstützt wird dieses Resultat durch die Publikation von Mayer *et al.* (2010), die eine Western Blot Analyse aus HeLa und MCF-7 Zellen durchführten. Dabei bestimmten die Autoren die Proteinexpression nicht aus dem Gesamtzelllysate, sondern sie nahmen eine getrennte Proteinextraktion aus der zytoplasmatischen, der nukleären und der Membranfraktion der Zellen vor und konnten hierbei mit dem Antikörper JFC12T10 u. a. eine 75 kDa Bande ermitteln (Mayer *et al.*, 2010). Diese repräsentiert in der Veröffentlichung von Coy *et al.* (2005) auch in MCF-7 Zellen die dominante Proteinbande und nach Meinung der Autoren das TKTL1-Wildtypprotein. Mayer *et al.* (2010) konnten diese 75 kDa Bande in MCF-7 und HeLa Zellen allerdings hauptsächlich dem nukleären Kompartiment der Zellen zuordnen, wobei nur ein sehr schwacher Nachweis im Zytoplasma möglich war. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass das dem Zellkern zugeordnete

Protein nicht auf eine funktionsfähige Transketolase zurückgeführt werden kann, da der Pentosephosphatweg ausschließlich im Zytoplasma stattfindet (Mayer *et al.*, 2010). In der zytoplasmatischen Fraktion detektierten die Autoren zudem zahlreiche Proteinbanden mit Molekulargewichten zwischen 44 und 95 kDa, welche die Autoren als unspezifisch einstufen, da deren Molekulargewicht untypisch für ein TKTL1-Genprodukt war (Mayer *et al.*, 2010). Diese Befunde werden weiterhin dadurch unterstützt, dass in der Publikation von Mayer *et al.* (2010) ein Nachweis der TKTL1-mRNA in genau diesen Zelllinien (MCF-7, HeLa) nicht möglich war, wie zu Beginn dieses Abschnitts bereits beschrieben wurde.

Kämmerer *et al.* (2015) konnten in ihrer Publikation das TKTL1-Volllängenprotein mit einem Molekulargewicht von 65 kDa mit allen drei von ihnen verwendeten Antikörpern, einschließlich des JFC12T10-Antikörpers, in TKTL1-exprimierenden HEK293-Transfektanten nachweisen. Im Gegensatz zu den beiden anderen Antikörpern detektierte der JFC12T10-Antikörper multiple weitere Proteinbanden sowohl in der TKTL1-positiven als auch in der TKTL1-negativen stabilen Transfektante und in der Mehrzahl der untersuchten Karzinomzelllinien mit einer Hauptproteinbande bei 27 kDa (Kämmerer *et al.*, 2015). Die Autoren vermuten daher unspezifische Proteinbindungen des JFC12T10-Antikörpers, auch wenn sie die Möglichkeit nicht ausschließen, dass es sich bei den zusätzlichen Proteinen um kleinere TKTL1-Fragmente handeln könnte (Kämmerer *et al.*, 2015).

Es wird somit deutlich, dass bei der Detektion von TKTL1, insbesondere im Hinblick auf dessen Molekulargewicht in Standard-Immunoblots, beachtliche Unterschiede in der vorhandenen Literatur auszumachen sind. Zusammenfassend scheint es daher für eine valide Interpretation von Daten zur TKTL1-Expression mittels RT-PCR und Immunoblot unbedingt notwendig zu sein, mehr Kontrollen einzufügen, verschiedene Methoden zu kombinieren sowie verschiedene Primer und Antikörper einzusetzen, insbesondere wenn aus der Expression eine Korrelation mit klinischen Parametern und dem Überleben von Patienten folgt.

5.2.2 Die Detektion von TKTL1 mittels Immunhistochemie

Bei der Analyse der vorhandenen Daten in der Literatur zur TKTL1-Detektion mittels Immunhistochemie fiel auf, dass nahezu alle Autoren Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe für ihre Untersuchungen verwendeten (Ahopelto *et al.*, 2016; Bentz *et al.*, 2013; Djureinovic *et al.*, 2016; Fenske *et al.*, 2009; Foldi *et al.*, 2007; Fritz

et al., 2012; Grimm *et al.*, 2014; Grimm *et al.*, 2013; Jayachandran *et al.*, 2016; Krockenberger *et al.*, 2010; Krockenberger *et al.*, 2007; Langbein *et al.*, 2008; Langbein *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2010; Schultz *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2015; Staiger *et al.*, 2006; Volker *et al.*, 2008; Volker *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Zerilli *et al.*, 2008). Lediglich Schultz *et al.* (2008) bedienten sich neben der Formalinfixierung des Gewebes auch der HOPE-Technik. Diaz-Moralli *et al.* (2011) verwendeten zwar schockgefrorenes Gewebe, welches allerdings mit Paraformaldehyd fixiert wurde, sodass auch hier, wie bei Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe, vor der immunhistochemischen Färbung eine Antigendemaskierung durchgeführt werden musste. Generell lässt sich sagen, dass eine Gewebeprobe der Situation *in vivo* (Situation im lebenden Organismus) am nächsten kommt, wenn sie so wenig wie möglich behandelt wird. Die geringste Manipulation erfährt das Gewebe bei einer Kryokonservierung, d. h. wenn es ohne vorherige Fixierung in Einbettmedium schockgefroren wird und ohne Behandlung zur Antigendemaskierung, wie das Kochen in Citratpuffer oder eine enzymatische Behandlung, der immunhistochemischen Färbeprozedur zugeführt wird. Es konnte jedoch keine Publikation gefunden werden, in der natives, kryokonserviertes Gewebe ohne Fixierung und daraus resultierender Antigendemaskierung für immunhistochemische Analysezwecke herangezogen wurde. Laut Leong (2004) gibt es zahlreiche technische und interpretative Fallstricke, die bei der Arbeit mit Paraffin-eingebettetem Gewebe zu beachten sind. Diese Fallstricke beruhen nach Aussage des Autors auf der großen Bandbreite an Faktoren, welche die Möglichkeit relevante Antigene zu detektieren signifikant beeinflussen können (Leong, 2004). Zu diesen Faktoren werden u. a. die Art und Dauer der Fixierung, die Sensitivität und Spezifität des verwendeten Antikörpers und insbesondere die Methode der Antigendemaskierung gezählt (Leong, 2004). Die Antigendemaskierung der Formalin-fixierten Gewebe erfolgte in nahezu allen Fällen der gesichteten Literatur mittels Kochen in Citratpuffer, lediglich Ahopelto *et al.* (2016) führten die Antigendemaskierung mit einem Tris-HCl(Salzsäure)-Puffer durch. Bis auf Li *et al.* (2015) und Shi *et al.* (2015) verwendeten alle Autoren der zu Beginn dieses Abschnitts genannten Publikationen den TKTL1-Antikörper JFC12T10 zur immunhistochemischen Detektion des Proteins. Wie im vorherigen Abschnitt ausführlich beschrieben wurde, erkennt dieser neben dem TKTL1-Volllängenprotein im Immunoblot weitere, aller Wahrscheinlichkeit nach unspezifische, Proteine. Erwähnenswert ist daher, dass laut Mayer *et al.* (2010) umfassende immunhistochemische Studien mit einem alternativen TKTL1-Antikörper existieren

(siehe *The Human Protein Atlas*, einsehbar unter www.proteinatlas.org), die in klarem Gegensatz zu Untersuchungen stehen, die mit dem JFC12T10-Antikörper durchgeführt wurden. In diesen Studien (www.proteinatlas.org) wurden verschiedene Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Tumorgewebe nach hitzeinduzierter Antigendemaskierung immunhistochemisch sowohl mit dem JFC12T10-Antikörper (hier als CAB032191 bezeichnet) als auch mit dem alternativen Antikörper HPA000505 (polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen) auf eine TKTL1-Expression hin untersucht (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007350-TKTL1/pathology>, verwendete Antikörper siehe <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000007350-TKTL1/antibody>), (Uhlen *et al.*, 2015). Hierbei fiel auf, dass die untersuchten Kolorektal-, Prostata-, Pankreas-, Mamma-, Nieren-, Ovarial-, Zervix-, Magen-, Urothel- und Schilddrüsenkarzinome, Melanome, malignen Gliome sowie Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs bei Färbung mit beiden Antikörpern vollständig TKTL1-negativ waren, was im Gegensatz zu den Ergebnissen beispielsweise von Ahopelto *et al.* (2016); Bentz *et al.* (2013); Diaz-Moralli *et al.* (2011); Foldi *et al.* (2007); Grimm *et al.* (2014); Grimm *et al.* (2013); Jayachandran *et al.* (2016); Jia *et al.* (2015); Kohrenhagen *et al.* (2008); Krockenberger *et al.* (2007); Langbein *et al.* (2008); Langbein *et al.* (2006); Schmidt *et al.* (2010); Song *et al.* (2015); Volker *et al.* (2008); Volker *et al.* (2007); Zerilli *et al.* (2008) steht, die eine Expression von TKTL1 in den genannten Geweben mit dem Antikörper JFC12T10 detektieren konnten. Lediglich in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnte mit dem Alternativantikörper HPA000505 eine leichte bis moderate TKTL1-Expression nachgewiesen werden, während mit dem JFC12T10-Antikörper alle untersuchten Gewebeproben TKTL1-negativ blieben (siehe <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007350-TKTL1/pathology/tissue/lung+cancer>). Dahingegen konnten Kayser *et al.* (2011) und Schultz *et al.* (2008) mit dem JFC12T10-Antikörper eine Überexpression von TKTL1 in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen in ihren immunhistochemischen Untersuchungen feststellen. Bei der Bewertung der Ergebnisse auf www.proteinatlas.org muss beachtet werden, dass die beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen an Gewebeproben von nur maximal zwölf Patienten je Tumorart durchgeführt wurde, was eine vergleichsweise geringe Anzahl darstellt. Vollmer *et al.* (2006) vertreten in ihrer Publikation die Ansicht, dass jegliche Fixierung von Gewebe Artefakte erzeugt und Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe für immunhistochemische Untersuchungen nur mit Einschränkungen verwendet werden kann. Dies spricht erneut für die Verwendung von kryokonserviertem Material. Der

einzigste Einwand, der von Vollmer *et al.* (2006) sowie Leong *et al.* (2010) in Bezug auf die Verwendung von kryokonserviertem Gewebe erhoben wird, ist die nach Meinung der Autoren geringe morphologische Qualität des Materials bei dieser Art der Konservierung, die jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach mikroskopischer Begutachtung der kryokonservierten Gewebeschnitte nicht bestätigt werden konnte. Nach Ansicht von Vollmer *et al.* (2006) ist es zudem schwierig, das im Rahmen der Antigen-demaskierung wiederholte Kochen und Abkühlen der Gewebe zu standardisieren. Eine mangelnde Standardisierung diesbezüglich wird auch bei der Durchsicht der Literatur zu immunhistochemischen Färbungen von TKTL1 deutlich. Für die Demaskierung desselben Antigens, nämlich TKTL1, differiert die Kochzeit in Citratpuffer zwischen den einzelnen Publikationen doch beachtlich (zwischen 2 und 30 Minuten). Auch Leong (2004) bemängelt, dass es sich bei der Formalinfixierung um eine nicht einheitliche Prozedur handelt, sondern sich diese von Labor zu Labor unterscheidet. Ein weiterer Kritikpunkt lässt sich der Publikation von Leong *et al.* (2010) entnehmen, in der die Autoren deklarieren, dass weder die Mechanismen der Maskierung der Antigene durch Formalin noch die der Antigen-demaskierung vollständig verstanden sind.

Als ideale Alternative zur Formalinfixierung wird von Vollmer *et al.* (2006) die Fixierung mit HOPE vorgeschlagen, die von Olert *et al.* (2001) entwickelt wurde. Die Vorteile liegen nach Ansicht der Autoren in der exzellenten Konservierung der Antigene, der hohen Standardisierung der Methode sowie in der Möglichkeit eine immunhistochemische Färbung zu erzielen ohne vorher eine Antigen-demaskierung durchführen zu müssen, wie es bei der Formalinfixierung nötig ist (Goldmann *et al.*, 2003; Vollmer *et al.*, 2006). Dieselben Autoren stützten sich allerdings trotz der Aufzählung zahlreicher Nachteile der Formalinfixierung und Antigen-demaskierung (Vollmer *et al.*, 2006) nur zwei Jahre später in einer immunhistochemischen Untersuchung der TKTL1-Expression in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen und Mammakarzinomen in der Hauptsache auf Formalin-fixiertes, mit Citratpuffer behandeltes Gewebe anstatt auf HOPE-fixiertes Gewebe (Schultz *et al.*, 2008). Es wurde in dieser Studie zwar auch die HOPE-Technik angewandt, allerdings lediglich zur Validierung der Ergebnisse aus Analysen mit Formalin-fixiertem Gewebe und an einer weniger als halb so großen Anzahl an Gewebeproben im Fall von Bronchialkarzinomen und gar nicht im Fall von Mammakarzinomen (Schultz *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an den HOPE-fixierten Geweben wurden in der Publikation nicht dargestellt (Schultz *et al.*, 2008).

Um einen unmittelbaren Vergleich der verschiedenen Methoden zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Larynxkarzinom in drei gleiche Teile aufgeteilt, wobei ein Teil kryokonserviert, ein Teil Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet und der dritte Teil HOPE-fixiert und Paraffin-eingebettet wurde. Alle drei Teile sowie verschiedene kryokonservierte Normalgewebe wurden immunhistochemisch mit dem JFC12T10-Antikörper auf eine TKTL1-Expression hin untersucht. Abhängig von der Konservierung, Fixierung und Art der Antigendemaskierung unterschieden sich die Färbeargebnisse dabei zum Teil erheblich. Die Färbung von nativem Kryogewebe lieferte jedoch das am besten reproduzierbare Ergebnis und, mit Ausnahme von Drüsenlumina, auch die erwarteten negativen Resultate bei Färbung mit dem Isotypantikörper (siehe 4.2.1, Abbildung 4.5). Die Färbung von TKTL1 im kryokonservierten Teil des Larynxkarzinoms ergab dabei eine starke Expression des Proteins in einzelnen Zellen des Tumorgewebes, nicht jedoch homogen über das Tumorgewebe verteilt. Eine fokale TKTL1-Expression in einzelnen Zellen konnte aber nicht exklusiv im Tumorgewebe des Larynxkarzinoms ermittelt werden, sondern auch in kryokonservierter gesunder Larynxschleimhaut (siehe Abbildung 4.8). Auch gesunde Kolonschleimhaut zeigte eine starke Färbung in den Krypten (Abbildung 4.8). Mayer *et al.* (2010) fanden bei der immunhistochemischen Färbung von TKTL1 in gutartigen Leiomyomen ein ähnliches Expressionsmuster wie in einer Reihe maligner Tumoren. Auch Fenske *et al.* (2009) konnten eine TKTL1-Expression nicht nur in Nebennierenrindenzellkarzinomen, sondern auch in benignen Nebennierenadenomen und normalem Nebennierengewebe feststellen. Dies ist nach Ansicht der Autoren ein Hinweis darauf, dass TKTL1 keine essenzielle Rolle in Malignomen der Nebennierenrinde spielt (Fenske *et al.*, 2009). Ebenso konnten Lange *et al.* (2012) neben einer Expression des Proteins in malignen Tumoren der okulären Adnexe auch eine schwache Expression in benignen konjunktivalen Läsionen detektieren. Nach Meinung der Autoren ist es daher unwahrscheinlich, dass eine TKTL1-Expression ein allgemeines Merkmal maligner Zellen darstellt (Lange *et al.*, 2012).

Im HOPE-fixierten Teil des Larynxkarzinoms waren in der vorliegenden Arbeit neben einer homogenen Färbung des Tumorgewebes ebenfalls fokale Anreicherungen zu detektieren. Eine leichte homogene Färbung wurde dabei jedoch auch in der Isotypkontrolle ermittelt (Abbildung 4.6). Ähnlich fokale Expressionsmuster von TKTL1 konnten ebenfalls in einem Larynxkarzinom (Volker *et al.*, 2007), einem Mammakarzinom (Foldi *et al.*, 2007), einem Glioblastom (Volker *et al.*, 2008) und in einem Teil der untersuchten Melanome (Jayachandran *et al.*, 2016) in Formalin-fixierten und mit Ci-

tratpuffer behandelten Geweben detektiert werden. Das im Rahmen dieser Arbeit immunhistochemisch gefärbte Larynxkarzinom, das Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet und mit Citratpuffer behandelt wurde, zeigte, wie auch HOPE-fixiertes Gewebe, eine homogene Färbung über das Tumorgewebe, jedoch ohne fokale Anreicherungen. Zu beachten ist auch hier, dass eine ähnlich gleichmäßige Färbung, wenn auch sehr viel schwächer, mit dem Isotypantikörper erzielt wurde (siehe Abbildung 4.6). Schultz *et al.* (2008) konnten dagegen in ihren immunhistochemischen Untersuchungen von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen in den HOPE-fixierten Geweben vergleichbare Ergebnisse zu Formalin-fixierten, mit Citrat behandelten Geweben erzielen. Die Bewertung der Vergleichbarkeit ist jedoch dadurch erschwert, dass die Färbungen der HOPE-fixierten Gewebe in der Publikation nicht dargestellt wurden und keine Angaben dahingehend erfolgten, ob sich die Vergleichbarkeit der Ergebnisse auf die verwendete Einstufung der Färbeintensität (keine, schwache, moderate oder starke Färbung) oder auch auf das Expressionsmuster (homogen und/oder fokal) bezieht (Schultz *et al.*, 2008).

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Färbeintensität der Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeproben des Larynxkarzinoms von der Dauer der Behandlung mit Citratpuffer bei der Antigendemaskierung abhängt (siehe Abbildung 4.7). Je länger die Gewebeschnitte in Citratpuffer gekocht wurden, desto intensiver zeigte sich eine gleichmäßige über das Tumorgewebe verteilte Färbung von TKTL1. Eine mögliche Erklärung hierfür kann zwar eine zunehmende Antigendemaskierung mit steigender Kochzeit sein, dies ist allerdings nicht sicher belegbar, da laut Leong *et al.* (2010) die Vorgänge der Antigenmaskierung und -demaskierung noch nicht vollständig verstanden sind. Zudem konnte mit steigender Kochzeit ein Farbschleier über den gesamten Bereich der Tumorzellen hinweg detektiert werden, sodass eine dezidierte Lokalisation des Proteins kaum noch möglich war, was als Hinweis auf eine unspezifische Färbung gewertet werden kann. Hier kommt außerdem wieder die fehlende Standardisierung der Methode zum Tragen, da sich laut Leong (2004) bei der hitzeinduzierten Antigendemaskierung gerade die zwei Variablen Temperatur und Zeit kritisch auf den Prozess auswirken. Die Antigendemaskierung bei niedrigeren Temperaturen benötigt nach Aussage der Autoren längere Zeiten, um die gleiche Färbeintensität zu erreichen wie mit höheren Temperaturen (Leong, 2004). In der gesichteten Literatur ist wie oben bereits beschrieben keine Standardisierung des Prozesses zu erkennen, da nicht nur die Kochzeit in Citratpuffer deutlich variierte, sondern auch die eingestellte Wattzahl (W) der verwendeten Mikrowellengeräte (zwischen 100 und 900 W). Neben

einer Zunahme der gesamten Färbeintensität des Tumors konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei einer verlängerten Kochzeit zudem eine TKTL1-Expression in den Zellkernen detektiert werden (siehe Abbildung 4.7). Eine Lokalisation des Enzyms in diesem Zellkompartiment wäre jedoch ungewöhnlich, da der Pentosephosphatweg, in dem die Transketolase ihre Funktion ausübt, ausschließlich im Zytoplasma erfolgt. Bei Durchsicht der vorhandenen Literatur fällt auf, dass eine Kernlokalisierung von TKTL1 in erster Linie nach einer verlängerten Kochzeit der Gewebeschnitte in Citratpuffer (Coy *et al.*, 2005; Schultz *et al.*, 2008; Staiger *et al.*, 2006) oder nach anderen eher rauen Demaskierungsbedingungen wie dem Kochen in Citratpuffer mittels Druckgarer (Djureinovic *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2009) beschrieben wurde. Die Kochzeit betrug dabei im Einzelnen insgesamt 15 Minuten bei 900 W (Coy *et al.*, 2005; Staiger *et al.*, 2006) oder sogar 30 Minuten ohne Angabe der Wattzahl (Schultz *et al.*, 2008). Die Ausnahme stellen dabei die Publikationen von Langbein *et al.* (2006) und Langbein *et al.* (2008) dar, in denen eine Detektion von TKTL1 im Zellkern bereits nach dem Kochen des Gewebes in Citratpuffer für 1 Minute bei 450 W und anschließend noch einmal für 5 Minuten bei 100 W erfolgte. Auch Bentz *et al.* (2013) konnten eine nukleäre Expression von TKTL1 in Tubulizellen der Testes detektieren, eine Angabe der Kochzeit in Citratpuffer fehlte in der Publikation jedoch. Dennoch bleibt eine mögliche Lokalisation oder gar Funktion von TKTL1 im Zellkern unklar. Coy *et al.* (2005) sehen die Kernlokalisierung des Proteins als Hinweis dafür, dass TKTL1 ein sog. „moonlighting“ Protein, also ein multifunktionelles Protein ist. Einen Beweis hierfür gibt es bis dato allerdings nicht. Alle anderen Autoren enthielten sich in ihren Publikationen einer Aussage bezüglich der Bedeutung einer nukleären Expression von TKTL1. Mayer *et al.* (2010), die sowohl bei ihren Western Blot Experimenten (wie bereits unter 5.2.1 erläutert), als auch bei der immunhistochemischen Färbung eines gutartigen Leiomyoms des Uterus nach dem Kochen in Citratpuffer mittels Dampfgarer ein nukleäres Protein detektieren konnten, kamen zu dem Schluss, dass es sich dabei nicht um eine aktive Transketolase handeln kann. Auch nach Aussage von Semilia *et al.* (2015), die eine nukleäre Färbung von TKTL1 vorwiegend in benignem Urothelgewebe und zum kleineren Teil auch in malignem Urothelgewebe nachweisen konnten (ohne Angabe der Methode der Antigendemaskierung), ist es unklar, ob nukleäres TKTL1 irgendeine biologische Funktion hat. Die Möglichkeit einer unspezifischen Färbung in den Zellkernen im Rahmen der Antigendemaskierung muss hierbei in Betracht gezogen werden.

Die ausgeführten Erläuterungen zeigen somit, dass die Detektion von TKTL1 auch in der Immunhistochemie nicht unproblematisch ist und die Interpretation der Resultate auch hier mit Vorsicht erfolgen sollte. Die Definition und Einstufung des Expressionsniveaus von TKTL1 in Zelllinien und Tumoren sollte in Anbetracht der hier vorgestellten Resultate mit mehr Bedacht erfolgen. Der Nachweis von TKTL1 in der Immunhistochemie sollte an nativem Kryogewebe bestätigt werden und in Immunoblots detektierte Proteine mittels spezifischer siRNA verifiziert werden, um mögliche Zweifel an deren Identität auszuräumen.

5.3 Die Verwendung stabiler Transfektanten zur Untersuchung der TKTL1-Funktion

Einige Autoren beschrieben einen Zusammenhang zwischen der Expression von TKTL1 und der Proliferation verschiedener Karzinomzelllinien (Chen *et al.*, 2009; Diaz-Moralli *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2007; Jayachandran *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Einfluss von TKTL1 auf die Zellproliferation bestätigt werden. Untersuchungen hierzu wurden mittels exogen exprimiertem TKTL1 in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) durchgeführt. Ein Vorteil bei der Verwendung stabiler Transfektanten liegt in dem eindeutigen Expressionsmuster des interessierenden Proteins mit genuin negativen und positiven Zellen. Denn es wird entweder ein Expressionsplasmid oder der korrespondierende Leervektor stabil in die Zellen eingebracht. Im Vergleich hierzu hängt bei einer synthetischen Herabregulation von endogenem TKTL1 mittels RNA-Interferenz der Effekt der Repression stark von der Transfektionseffizienz und der Wirksamkeit der eingesetzten siRNA ab. Unter Transfektionseffizienz versteht man die Wirksamkeit, mit der die siRNA oder Plasmid-DNA in die Zellen eingebracht werden kann. Diese war im Fall der spezifischen TKTL1-siRNA in THP-1 Zellen, welche als einzige der in der vorliegenden Arbeit untersuchten malignen Zelllinien endogenes TKTL1 exprimierten, mit nur etwa 1 – 2 % nicht zufriedenstellend (Daten nicht gezeigt). Außerdem ist zu beachten, dass z. B. im Fall von LoVo Zellen die eingesetzte siRNA zwar sehr wirksam war und eine Repression der TKTL1-mRNA um ca. 94 % im Vergleich zur Kontroll-siRNA bewirkte, sich aber trotzdem noch Transketolaseaktivitäten zeigten, die nur um etwa 66 % reduziert waren (Hu *et al.*, 2007). In der Publikation von Yuan *et al.* (2010) gelang hingegen eine Herabregulation der TKTL1-mRNA nur um ca. 69 % mit einer Reduktion der Transketola-

seaktivitäten um etwa 64 %. Diaz-Moralli *et al.* (2016) beschrieben eine siRNA-induzierte Reduktion der TKTL1-Expression in HCT-116 Zellen um 60 % und in PC-3M Zellen um 81 %, wobei die Transketolaseaktivität in beiden Zelllinien kaum reduziert wurde (um nur 7 % in HCT-116 Zellen und nur 1 % in PC-3M Zellen). Dennoch zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proliferation in den mit siRNA behandelten Zellen, weshalb die Autoren mutmaßten, dass TKTL1 in diesem Fall die Proliferation der Zellen unabhängig von seiner Transketolasefunktion beeinflusste (Diaz-Moralli *et al.*, 2016). Dies dürfte wiederum die Beurteilung des Einflusses von endogenem TKTL1 auf die Zellproliferation bei der Analyse mittels RNA-Interferenz erschweren. Eine weitere Möglichkeit TKTL1-negative Zellen zu erhalten besteht in einem sog. zellulären *Knock-out*, also der Mutation des TKTL1-Gens mittels *Gen-Targeting* (gezielte Genmodifikation). Da in humanen Zellen hierfür aber die Mutation von mindestens zwei Allelen erforderlich ist, kann die Herstellung von *Knock-out*-Zelllinien äußerst zeitaufwendig sein (Bunz, 2002). Demgegenüber ist also die Herstellung von stabilen Transfektanten zu bevorzugen. Ein wesentlicher Nachteil bei der Bevorzugung von stabilen Transfektanten gegenüber Zellen, die das Protein endogen exprimieren, ist allerdings, dass TKTL1 nicht in seiner natürlichen Umgebung auf seine Funktion hin untersucht wird. Daher könnten Fragen zur physiologischen Relevanz aufkommen. Leider gestaltete sich aufgrund der zu geringen Transfektionseffizienz die transiente Transfektion der Suspensionszelllinie THP-1 mit siRNA schwierig, sodass eine Untersuchung der Proteinrepression von endogenem TKTL1 im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Hier ist jedoch anzumerken, dass der in der vorliegenden Arbeit eruierte moderate Proliferationsvorteil von TKTL1-positiven HEK293-Transfektanten unter Standardkulturbedingungen (siehe Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10) zu den Ergebnissen u. a. von Hu *et al.* (2007), Yuan *et al.* (2010), Diaz-Moralli *et al.* (2016), Xu *et al.* (2009), Jayachandran *et al.* (2016) und Chen *et al.* (2009) passt, die nach der Herabregulation von endogenem TKTL1 mittels siRNA eine Reduktion der Proliferation in den jeweils untersuchten Karzinomzelllinien beobachteten. Demzufolge scheinen exogene Expressionssysteme wie stabile Transfektanten die endogene Situation von TKTL1 gut widerzuspiegeln. Dennoch ist es sicherlich sinnvoll, zukünftige weiterführende Experimente zur TKTL1-Funktion *in vitro* auch an Zellen mit endogener Expression des Proteins oder sogar *in vivo* durchzuführen.

5.4 Effekte der TKTL1-Expression

Unter Standardkulturbedingungen konnte ein moderater Proliferationsvorteil der 293pCAG-TKTL1 Zellen im Vergleich zu den 293pCAG- Δ Zellen ermittelt werden (siehe 4.3.1). Dieser Proliferationsvorteil konnte in Übereinstimmung mit den Proliferationsversuchen von Hu *et al.* (2007), Yuan *et al.* (2010), Diaz-Moralli *et al.* (2016), Xu *et al.* (2009), Jayachandran *et al.* (2016) und Chen *et al.* (2009) auch nach einer Repression des Proteins in stabilen HEK293-Transfektanten mittels spezifischer siRNA bestätigt werden (siehe Abbildung 4.10). Die Effizienz der siRNA wurde dabei mittels RT-PCR und Western Blot nachgewiesen (siehe Abbildung 4.11). Dieser moderate Proliferationsvorteil wurde nach einem Entzug von Wachstumsfaktoren (1 % FKS) deutlich verstärkt und TKTL1-exprimierende Transfektanten zeigten sich unter diesen Voraussetzungen wesentlich robuster gegenüber Apoptose als ihr TKTL1-negatives Gegenstück (siehe Abbildung 4.15). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass TKTL1-exprimierende Zellen weniger auf die im FKS enthaltenen Wachstumsfaktoren angewiesen sind als TKTL1-negative Zellen und einen Proliferationsvorteil durch die TKTL1-Überexpression und die damit einhergehende erhöhte Metabolisierung von Glukose, die im DMEM der Zellkultur enthalten ist und nicht reduziert wurde, über den Pentosephosphatweg erlangen. 293pCAG-TKTL1 Zellen wäre es damit auch möglich durch das Enzym TKTL1 eine effektivere Ribose-5-Phosphat-Synthese im nicht-oxidativen Abschnitt des Pentosephosphatweges und damit auch eine gesteigerte RNA- und DNA-Synthese zu betreiben. Auch dieses Ergebnis deckt sich wieder mit dem Effekt der TKTL1-Repression mittels siRNA, der in einem Anstieg der Apoptoserate (Dong & Wang, 2017; Li *et al.*, 2015) und des Anteils der Zellen im G0/G1 Stadium sowie in einer Reduktion des Anteils der Zellen in der S-Phase oder im G2/M Stadium des Zellzyklus resultierte (Hu *et al.*, 2007; Jayachandran *et al.*, 2016). Das G0/G1 Stadium repräsentiert dabei den Ruhezustand (G0) bzw. die Wachstumsphase der Zelle (G1), während die S-Phase die DNA-Replikation und das G2/M Stadium die Vorbereitung der Mitose (G2) bzw. die Mitose selbst (M) repräsentiert (Rassow *et al.*, 2012, S. 501f.). Hu *et al.* (2007) vermuteten eine Arretierung der Zellen im G0/G1 Stadium und eine Inhibition der Proliferation aufgrund der TKTL1-Repression. Li *et al.* (2015) fanden zudem einen Zusammenhang zwischen der Herabregulation von TKTL1 und einer Hemmung der Expression von Cyclinen und MKI67, einem Indexprotein für die Zellteilung, was sie somit als Ursache für die Hemmung der Zellproliferation in den TKTL1-reprimierten Zellen sahen. Außerdem konnten die Autoren als Ursache für die erhöhte

Apoptoserate der Zellen nach der TKTL1-Repression eine erhöhte Expression proapoptotischer Proteine (Bax und Bak1) und eine reduzierte Expression antiapoptotischer Proteine (Bcl-2 und Bcl-x1) der Bcl-2-Familie in den Zellen nachweisen (Li *et al.*, 2015).

Demgegenüber war exogenes TKTL1 in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht in der Lage, der Apoptose und einer massiven Abnahme der Zellzahlen unter hypoxischen Bedingungen entgegenzuwirken (siehe Abbildung 4.12 und Abbildung 4.14). Dies deckt sich mit den Resultaten von Xu *et al.* (2009), die nach einer TKTL1-Repression mittels siRNA keine signifikante Erhöhung der Superoxidradikale (O_2^-) und nur einen geringfügigen Anstieg von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) detektieren konnten. Allerdings fanden die Autoren in den TKTL1-supprimierten HCT-116 Zellen verringerte Konzentrationen von Reduktionsäquivalenten (supprimierte NADPH/NADP⁺-Rate und verminderter Gehalt an reduziertem Glutathion) und nach einer Induktion von oxidativem Stress mittels Zugabe von H_2O_2 oder Phenethylisothiocyanat (PEITC) Zeichen der beginnenden Apoptose und eine erhöhte Anzahl an sub-G0/G1-Zellen (Xu *et al.*, 2009). Sie schlossen daraus, dass endogenes TKTL1 einen protektiven Effekt gegen oxidativen Stress zu haben scheint (Xu *et al.*, 2009). Wanka *et al.* (2012) konnten mittels Repression von endogenem TKTL1 in Gliomzellen eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber oxidativem Stress und damit einhergehendem Zelltod bestätigen, die Ergebnisse werden in der Publikation jedoch nicht dargestellt. Ähnlich zu den Beobachtungen von Xu *et al.* (2009) stellten Wanka *et al.* (2012) in TKTL1-supprimierten Glioblastomzellen, die zudem TIGAR (*Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator*) enthielten, unter normoxischen Bedingungen (21 % Sauerstoff) keinen relevanten Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies fest. Die Autoren konnten jedoch unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies in den TKTL1-reprimierten, TIGAR-enthaltenden Glioblastomzellen sowie eine erhöhte Rate an toten Zellen detektieren (Wanka *et al.*, 2012). Oxidativer Stress wurde auf die Zellen hierbei, wie in der vorliegenden Arbeit auch, mittels Inkubation der Zellen unter hypoxischen Bedingungen bei 0,1 % Sauerstoff ausgeübt (Wanka *et al.*, 2012). Dahingegen konnte in der vorliegenden Arbeit ein protektiver Effekt von exogenem TKTL1 gegen oxidativen Stress nicht bestätigt werden, da beide stabile HEK293-Transfektanten (TKTL1-positiv und TKTL1-negativ) unter Hypoxie über 7 Tage hinweg ähnliche Apoptosewerte zeigten und auch die TKTL1-positive Transfektante 293pCAG-TKTL1 an Tag 7 einen rapiden Anstieg der Apoptoserate aufwies, wie auch ihr TKTL1-negatives Gegenstück

293pCAG- Δ (siehe Abbildung 4.14). Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Resultate könnte darin liegen, dass in den Experimenten der vorliegenden Dissertation oxidativer Stress nicht wie in den Experimenten von Xu *et al.* (2009) durch direkte Zugabe von H₂O₂ oder PEITC erzielt wurde, sondern die Bildung von Sauerstoffradikalen in den Zellen unter hypoxischen Kulturbedingungen angeregt wurde. Eine geringere Effektivität des oxidativen Stresses auf die Zellen wäre somit denkbar. Dies erscheint jedoch in Anbetracht des massiven Zellsterbens nach 5 Tagen, welches auch auf gebildete Sauerstoffradikale zurückgeführt wird, eher unwahrscheinlich (siehe 4.3.2). Außerdem sollen durch die hypoxischen Zellkulturbedingungen die hypoxischen Bedingungen innerhalb eines Tumors imitiert werden, unter welchen es Zellen mit einer Überexpression von TKTL1 nach Ansicht von Coy *et al.* (2005) möglich sein soll, einen gesteigerten anaeroben Glukoseabbau zu Pyruvat und Laktat zu betreiben und sich damit an ein Wachstum ohne Sauerstoff zu adaptieren, was ihnen somit einen Überlebensvorteil gegenüber TKTL1-negativen Zellen verschafft (siehe 1.5.3.3). Dieser konnte in der vorliegenden Arbeit *in vitro* jedoch nicht nachgewiesen werden. Es erscheint daher sinnvoll, weiterführende Untersuchungen bezüglich eines Überlebensvorteils TKTL1-exprimierender Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen *in vivo* und damit in der natürlichen Mikroumgebung von Tumorzellen durchzuführen. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Resultaten von Wanka *et al.* (2012) ist nur begrenzt möglich, da ein Teil der Ergebnisse in der Publikation nicht dargestellt wird und die Zellen darüber hinaus zusätzlich mit *TIGAR* stabil transfiziert waren, einem Faktor, der u. a. für die Regulation von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich gemacht wird (Wanka *et al.*, 2012). Außerdem wurden die Zellen in den Experimenten von Wanka *et al.* (2012) nicht nur unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, sondern gleichzeitig auch in einem Medium ohne FKS, welchem Glukose zugegeben wurde, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zusätzlich erschwert. Zu beachten ist auch hier, dass die Experimente in der vorliegenden Arbeit mit exogenem TKTL1 und nicht wie im Fall von Xu *et al.* (2009) und Wanka *et al.* (2012) mit endogenem TKTL1 durchgeführt wurden.

Ähnlich wie Xu *et al.* (2009) gehen auch Bentz *et al.* (2011) von einem protektiven Effekt von TKTL1 gegen oxidativen Stress aus. Die Autoren beschrieben in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen einem TKTL1-Mangel und der Verschlechterung einer experimentellen Kolitis in Mäusen (Bentz *et al.*, 2011). Dies führten Bentz *et al.* (2011) darauf zurück, dass TKTL1 indirekt über den nicht-oxidativen Abschnitt des Pento-

sphosphatweges NADPH nachliefert und somit Schäden vermeidet, die von reaktiven Sauerstoffspezies ausgelöst werden. Interessant ist, dass Bentz *et al.* (2011) davon ausgehen, dass ein Fehlen von TKTL1 in Patienten, die an langjähriger *Colitis ulcerosa* leiden, die maligne Transformation der Zellen begünstigen kann. Im Gegensatz dazu trägt nach Meinung zahlreicher Autoren gerade die Überexpression von TKTL1 zu einem malignen Phänotyp bei, weshalb TKTL1 auch als mögliches neues Onkogen bezeichnet wird (Smith *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010). Onkogene sind durch ihre gesteigerte Aktivität oder Expression und nicht durch ihre Abwesenheit gekennzeichnet, wie bereits einleitend beschrieben wurde (siehe 1.1.1). Diese Eigenschaft wird dagegen von den Tumorsuppressorgenen (Anti-Onkogene) erfüllt, deren Inaktivierung die Entstehung von Tumorzellen fördern kann (siehe 1.1.2). Passend zu den Ergebnissen von Bentz *et al.* (2011) beschrieben Li *et al.* (2016) TKTL1 als mögliches Tumorsuppressorgen, welches durch die Hypermethylierung des Promotors in kolorektalen Karzinomen inaktiviert wird. Zu beachten bleibt jedoch, dass gerade in Kolon- (Diaz-Moralli *et al.*, 2011; Langbein *et al.*, 2006) und Rektumkarzinomen (Schwaab *et al.*, 2011) eine Überexpression von TKTL1 beschrieben wurde, nicht zuletzt von denselben Autoren, die auch eine maligne Entartung von Zellen aufgrund eines Mangels von TKTL1 für möglich hielten (Bentz *et al.*, 2013; Bentz *et al.*, 2011). Auch wenn es nach Meinung von Wittig und Coy (2008) Hinweise darauf gibt, dass die Aktivität von TKTL1 sowohl protektiv als auch destruktiv für den Organismus sein kann, bleibt die Funktion des Proteins zumindest hinsichtlich der Entstehung von kolorektalen Karzinomen ungeklärt.

Bentz *et al.* (2013) stellten in Sphäroiden der kolorektalen Karzinomzelllinie SW480 bei Kultivierung über fünf Tage unter der Vorstellung hypoxischer Konditionen im Zentrum der Zellaggregate eine Korrelation zwischen einer erhöhten HIF-1 α -Proteinexpression und einer erhöhten TKTL1-Expression fest und werteten dies als Hinweis auf einen Einfluss von Hypoxie auf die TKTL1-Expression. Die Autoren konnten diesbezüglich in den Kolonkarzinomzelllinien Caco-2 und T84 auch eine gesteigerte TKTL1-mRNA-Expression unter hypoxischen Bedingungen detektieren (Bentz *et al.*, 2013). Interessanterweise konnten Mayer *et al.* (2010) in ihrer Studie eine Steigerung der TKTL1-Expression unter hypoxischen Bedingungen in verschiedenen Karzinomzelllinien mittels RT-PCR ausschließen und auch im Western Blot keine Änderung des Expressionsniveaus der Proteine unter diesen Konditionen feststellen.

Im Zusammenhang mit Hypoxie scheint es auch erwähnenswert, dass das Enzym Transketolase von Zhao *et al.* (2010) als Komponente der HIF-1 α -abhängigen Imati-

nibresistenz identifiziert wurde. HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor und spielt eine zentrale Rolle bei der physiologischen Reaktion von Zellen auf Hypoxie (Fandrey, 2007) (siehe auch 1.3). HIF-1 α wird bei hohem Sauerstoffpartialdruck abgebaut, bei Sauerstoffmangel in der Zelle hingegen stabilisiert, akkumuliert sodann und transloziert in den Zellkern (Fandrey, 2007). Dort bildet es zusammen mit HIF-1 β ein Heterodimer und kann zusammen mit weiteren Koaktivatoren HIF-Zielgene aktivieren, die ein Überleben der Zelle unter hypoxischen Bedingungen ermöglichen sollen (Fandrey, 2007; Smith *et al.*, 2008). Zhao *et al.* (2010) beschrieben in ihrer Publikation, dass HIF-1 α in Imatinib-resistenten Leukämiezellen mit einer erhöhten BCR-ABL Expression (Philadelphia-Chromosom) in einer nicht-hypoxischen Weise aktiviert wurde und den Glukosemetabolismus der Zellen über eine Aktivierung des nicht-oxidativen Abschnitts des Pentosephosphatweges und des Enzyms Transketolase neu programmierte. Die Transketolase wird dabei von den Autoren als ein HIF-1 α Zielgen beschrieben und konnte in ihren Experimenten funktionell durch TKTL1 ersetzt werden (Zhao *et al.*, 2010). Wie bereits unter 1.5.3.3 dargestellt, beschrieben auch Sun *et al.* (2010) eine normoxische Stabilisation von HIF-1 α induziert durch eine TKTL1-Überexpression und die damit einhergehende Akkumulation von Pyruvat und Laktat. Während in der erstgenannten Publikation (Zhao *et al.*, 2010) davon ausgegangen wird, dass HIF-1 α aufgrund einer Überexpression von BCR-ABL in Leukämiezellen unter Normoxie induziert wird und dann die Transketolase aktiviert, gehen die Autoren der zuletzt genannten Publikation (Sun *et al.*, 2010) davon aus, dass die TKTL1-Überexpression eine normoxische HIF-1 α -Stabilisation und somit die vermehrte Expression von glykolytischen Enzymen bewirkt. Es wird somit deutlich, dass in der Literatur zahlreiche, zum Teil auch diskrepante, TKTL1-vermittelte Effekte beschrieben werden. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein Effekt, nämlich ein Selektionsvorteil von TKTL1-exprimierenden stabilen HEK293-Transfektanten unter Standardbedingungen und unter Entzug von Wachstumsfaktoren *in vitro* ermittelt werden. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit endogenes TKTL1 nur in einer der untersuchten malignen Zelllinien (THP-1) nachgewiesen werden konnte, scheint TKTL1 grundsätzlich das Potenzial zu haben, zum malignen Phänotyp von Tumorzellen beizutragen, wie auch von Sun *et al.* (2010) und Yuan *et al.* (2010) mit *in vivo* Experimenten in xenotransplantierten Mäusen gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse zur Funktion des Proteins in der gesichteten Literatur sind jedoch zum Teil widersprüchlich und insbesondere die Detektion von TKTL1 ist, wie bereits ausgeführt, sehr kontrovers. Mayer *et al.* (2010) äußerten aufgrund der Ergebnisse ihrer

Studie Zweifel an einer pathophysiologischen Relevanz von TKTL1 für den Energiestoffwechsel, das Wachstum und die Progression von malignen Tumoren. Es bleibt daher fraglich, ob TKTL1 das Ziel künftiger neuer Therapieansätze gegen Krebs sein kann, wie von vielen Autoren vorgeschlagen wird (Diaz-Moralli *et al.*, 2016; Diaz-Moralli *et al.*, 2011; Dong & Wang, 2017; Foldi *et al.*, 2007; Fritz *et al.*, 2012; Jayachandran *et al.*, 2016; Kayser *et al.*, 2011; Krockenberger *et al.*, 2010; Krockenberger *et al.*, 2007; Staiger *et al.*, 2006; Volker *et al.*, 2008; Volker *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2010). Dies gilt insbesondere in Anbetracht der Ergebnisse von Mitschke *et al.* (2010), Maslova *et al.* (2012), Meshalkina *et al.* (2013) sowie Schneider *et al.* (2012). Wie bereits einleitend unter 1.5.3.2 beschrieben, stellten Mitschke *et al.* (2010) und Maslova *et al.* (2012) bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen der TKT und TKTL1 fest, dass TKTL1 essenzielle Aminosäurereste für die Bindung von Kofaktor und Substrat fehlen und schlussfolgerten daraus, dass TKTL1 vermutlich keine Transketolaseaktivität besitzt. Dieses Ergebnis wird von Schneider *et al.* (2012) bestätigt, die in ihren Experimenten mit einer Deletionsvariante der TKT als Modell für TKTL1 zu dem Schluss kamen, dass eine enzymatische Rolle von TKTL1 im Tumorzellmetabolismus höchst unwahrscheinlich ist und eine biologische Funktion von TKTL1 in Tumorzellen, sofern vorhanden, nicht-enzymatischer Natur zu sein scheint. Nach Aussage von Meshalkina *et al.* (2013), die ebenfalls Versuche mit einer Deletionsvariante der TKT durchführten, bleibt die Funktion von TKTL1 und dessen potenzielle Rolle in Malignomen eine offene Frage.

Wenn TKTL1 in einer Vielzahl von soliden Tumoren überexprimiert ist und den Stoffwechsel von malignen Zellen steuert, wäre ein therapeutischer Ansatz bei diesem Gen denkbar. Weitere Studien zur TKTL1-Expression und -Funktion, insbesondere weitere *in vivo* Experimente, z. B. mit *knock-out* Mäusen, wären allerdings zuvor wünschenswert, um ein besseres Verständnis über die tatsächliche Rolle des Proteins im Stoffwechsel von Karzinomzellen herbeizuführen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Transketolasen sind Enzyme, die wesentliche Schritte im nicht-oxidativen Abschnitt des Pentosephosphatweges regulieren. Aus der Familie der Transketolasen, die aus der Transketolase selbst (TKT), dem Transketolase-*like* Protein 1 (TKTL1) und dem Transketolase-*like* Protein 2 (TKTL2) besteht, zog insbesondere TKTL1 in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit auf sich. Zahlreiche Studien wurden publiziert, die eine Überexpression des Proteins in soliden Tumoren und eine damit einhergehende schlechte Prognose der betroffenen Patienten nachwiesen. Darüber hinaus wird TKTL1 in Zusammenhang mit der Proliferation von Karzinomzellen gebracht. Die potenzielle Beteiligung des Enzyms im Metabolismus und bei der Regulation der Vermehrung von Tumorzellen führte zu der Annahme, dass es sich bei TKTL1 um ein mögliches neues Onkogen und spezifisches Therapieziel bei der Bekämpfung von Krebs handelt. Die Durchsicht der vorhandenen Literatur zur TKTL1-Expression, auch im Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, ergab kontroverse Expressionsmuster des Gens sowohl in der RT-PCR als auch im Immunoblot und in der Immunhistochemie.

In dieser Arbeit konnte TKTL1 mit dem monoklonalen JFC12T10-Antikörper im Immunoblot als ein 65 kDa Protein identifiziert werden, welches jedoch in der Mehrheit der untersuchten malignen Zelllinien nicht nachweisbar war. Lediglich in THP-1 Zellen gelang der Nachweis von endogenem TKTL1 auf mRNA- und Proteinebene. In den restlichen untersuchten Zelllinien, die ihren Ursprung in verschiedensten Tumoren haben, blieb das Expressionsniveau von TKTL1 in RT-PCR und Western Blot unterhalb der Nachweisgrenze.

Die immunhistochemische Färbung von Proben eines Larynxkarzinoms mit dem Antikörper JFC12T10 ergab in Abhängigkeit von der Fixierung, Konservierung und Antigendemaskierung unterschiedliche Resultate. Hierbei zeigte die Färbung von nativem Kryogewebe, welches die *in vivo* Situation des Gewebes am besten repräsentiert, ein fokales Expressionsmuster von TKTL1 mit einzelnen stark exprimierenden Zellen und keine homogene Verteilung der Färbung über das ganze Tumorgewebe. Auch in gesunder Larynxschleimhaut konnte ein solches fokales Expressionsmuster nachgewiesen werden. In der HOPE-fixierten, Paraffin-eingebetteten Probe des Larynxkarzinoms war neben einer fokalen Expression von TKTL1 auch eine mäßige homogene Expression im gesamten Tumorgewebe nachweisbar. Ein moderates gleichmäßiges Expressionsmuster

über das Tumorgewebe, allerdings ohne fokale Anreicherungen, zeigte sich auch in der Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten und mit Citratpuffer behandelten Probe. Zu beachten war hierbei allerdings, dass die Isotypkontrollen von HOPE-fixiertem und Formalin-fixiertem, mit Citrat behandeltem Gewebe ebenfalls eine schwache Färbung aufwiesen. Zudem konnte bei der Antigendemaskierung von Formalin-fixiertem Gewebe ein Zusammenhang zwischen der Kochzeit des Gewebes in Citratpuffer und der Färbintensität sowie einer Färbung von TKTL1 in den Zellkernen hergestellt werden.

Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass exogen exprimiertes TKTL1 stabilen HEK293-Transfektanten einen moderaten Proliferationsvorteil unter Standardkulturbedingungen verschafft, der nach Entzug von Wachstumsfaktoren verstärkt wurde und unter diesen restriktiven Bedingungen die Zellen vor Apoptose schützt. Ein protektiver Effekt von exogenem TKTL1 im Rahmen hypoxischer Zellkulturbedingungen konnte nicht nachgewiesen werden.

Als Fazit dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass TKTL1 zwar prinzipiell in der Lage ist, Zellen einen Proliferationsvorteil zu verschaffen, ein Nachweis im Großteil der untersuchten malignen Zelllinien allerdings fehlte und auch in der untersuchten nativen Probe des Larynxkarzinoms keine Überexpression, sondern eine ähnliche Expression wie in gesunder Larynxschleimhaut, nachgewiesen werden konnte und daher die Relevanz einer TKTL1-Expression in Malignomen fraglich bleibt. Aufgrund der in dieser Arbeit deutlich gewordenen kontroversen Datenlage hinsichtlich der TKTL1-Expression und -Funktion in malignen Zellen sollte die Interpretation von TKTL1-Expressionsmustern mit Vorsicht erfolgen und mögliche therapeutische Optionen hinsichtlich einer gezielten Hemmung des TKTL1-Enzyms erst dann in Betracht gezogen werden, wenn mehr Klarheit über das tatsächliche Expressionsmuster von TKTL1 in Malignomen sowie die Beteiligung des Proteins im Stoffwechsel bösartiger Zellen herrscht.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Der oxidative Abschnitt des Pentosephosphatweges.	17
Abbildung 1.2: Der nicht-oxidative Abschnitt des Pentosephosphatweges.	19
Abbildung 4.1: TKTL1-mRNA-Expression in Zelllinien.	56
Abbildung 4.2: TKTL1-Proteinexpression in Zelllinien.	58
Abbildung 4.3: Immunzytochemische Färbung von TKTL1 in Zelllinien.	59
Abbildung 4.4: TKTL1-Proteinrepression in der stabilen Transfektante 293pCAG-TKTL1.	61
Abbildung 4.5: Immunhistochemische Färbung von TKTL1 in einem kryokonservierten Larynxkarzinom.	63
Abbildung 4.6: Immunhistochemische Färbung von TKTL1 in einem Paraffin- eingebetteten Larynxkarzinom.	64
Abbildung 4.7: Immunhistochemische Färbung von TKTL1 in Abhängigkeit von der Dauer der Citratbehandlung.	65
Abbildung 4.8: Immunhistochemische Färbung von TKTL1 in gesunden kryokonservierten Geweben.	67
Abbildung 4.9: Vergleich der Proliferation von stabilen HEK293-Transfektanten unter Standardkulturbedingungen.	68
Abbildung 4.10: Vergleich der Proliferation von 293pCAG-TKTL1 Zellen mit und ohne TKTL1-Repression.	69
Abbildung 4.11: Nachweis der Effizienz der spezifischen TKTL1-siRNA.	70
Abbildung 4.12: Vergleich der Proliferation stabiler HEK293-Transfektanten unter hypoxischen Bedingungen.	72
Abbildung 4.13: Vergleich der Proliferation stabiler HEK293-Transfektanten unter Entzug von Wachstumsfaktoren.	73
Abbildung 4.14: Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptoseraten von stabiler HEK293-Transfektanten unter Hypoxie.	75
Abbildung 4.15: Durchflusszytometrische Auswertung der Apoptoseraten von stabiler HEK293-Transfektanten unter Entzug von Wachstumsfaktoren.	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper	30
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	30
Tabelle 3: Verwendete Kits	32
Tabelle 4: Eingesetzte Enzyme	33
Tabelle 5: Eingesetzte Größenmarker	33
Tabelle 6: Verwendete Geräte	33
Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien	35
Tabelle 8: In Anspruch genommene Dienstleistungen.....	36
Tabelle 9: Verwendete Plasmide	36
Tabelle 10: Verwendete Primer.....	36
Tabelle 11: Verwendete siRNAs	37
Tabelle 12: Verwendete Bakterienstämme.....	37
Tabelle 13: Verwendete Zelllinien	37
Tabelle 14: Bezugsquellen der verwendeten Gewebearten.....	38
Tabelle 15: Zusammensetzung des PCR Reaktionsansatzes.....	44
Tabelle 16: Phasen eines PCR-Zyklus	45
Tabelle 17: Reaktionsansatz für die Ligation in den pDrive-Vektor	49
Tabelle 18: Reaktionsansatz für die Ligation in den pCAG-Vektor	49

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (<i>Avidin/biotinylated enzyme complex</i>)
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ak	Antikörper
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
BW	<i>Backward</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoffatom
°C	Grad Celsius
ca.	<i>Circa</i>
CO ₂	Kohlendioxid
cDNA	komplementäre DNA
csiRNA	Kontroll-siRNA (<i>control-siRNA</i>)
dATP	5'-Desoxyadenosintriphosphat
d. h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	<i>et alii, et aliae</i> (und andere)
etc.	<i>et cetera</i> (und so weiter)
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FW	<i>Forward</i>
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81\text{m/s}^2$)
g	Gramm
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbarer Faktor-1-alpha
HOPE	<i>Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect</i>
i. d. R	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter

LB	Luria Broth
M	Molar
mA	Milliampere
MATra	Magnet-assistierte Tansfektion (<i>magnet assisted transfection</i>)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
o. g.	Oben genannt
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEITC	Phenethylisothiocyanat
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
s. a.	siehe auch
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
sog.	sogenannt
TKT	Transketolase
TKTL1	Transketolase- <i>like</i> Protein 1
TKTL2	Transketolase- <i>like</i> Protein 2

U	<i>Unit</i>
U	Uridin
u. a.	Unter anderem
V	Volt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
X _{Gal}	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-beta-D-galactopyranosid
X5P	Xylulose-5-Phosphat
z. B.	zum Beispiel
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
%	Prozent

Literaturverzeichnis

Ahn WS, Crown SB, Antoniewicz MR (2016) Evidence for transketolase-like TKTL1 flux in CHO cells based on parallel labeling experiments and (13)C-metabolic flux analysis. *Metabolic engineering* **37**: 72-78

Ahopelto K, Bockelman C, Hagstrom J, Koskensalo S, Haglund C (2016) Transketolase-like protein 1 expression predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* **17**: 163-168

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3983-3988

Bentz S, Cee A, Endlicher E, Wojtal KA, Naami A, Pesch T, Lang S, Schubert P, Fried M, Weber A, Coy JF, Goelder S, Knuchel R, Hausmann M, Rogler G (2013) Hypoxia induces the expression of transketolase-like 1 in human colorectal cancer. *Digestion* **88**: 182-192

Bentz S, Pesch T, Wolfram L, de Valliere C, Leucht K, Fried M, Coy JF, Hausmann M, Rogler G (2011) Lack of transketolase-like (TKTL) 1 aggravates murine experimental colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **300**: G598-607

Bonnet D, Dick JE (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* **3**: 730-737

Boros LG, Lee PW, Brandes JL, Cascante M, Muscarella P, Schirmer WJ, Melvin WS, Ellison EC (1998) Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct role in ribose synthesis in tumors: is cancer a disease of cellular glucose metabolism? *Med Hypotheses* **50**: 55-59

Boros LG, Puigjaner J, Cascante M, Lee WN, Brandes JL, Bassilian S, Yusuf FI, Williams RD, Muscarella P, Melvin WS, Schirmer WJ (1997) Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Res* **57**: 4242-4248

Bunz F (2002) Human cell knockouts. *Current opinion in oncology* **14**: 73-78

Campbell LL, Polyak K (2007) Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* **6**: 2332-2338

Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E, et al. (1993) Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *The Journal of pathology* **171**: 83-98

Chen H, Yue JX, Yang SH, Ding H, Zhao RW, Zhang S (2009) Overexpression of transketolase-like gene 1 is associated with cell proliferation in uterine cervix cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **28**: 43

Chen J, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF (2012) A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* **488**: 522-526

Chung HY, Park YK (2017) Rationale, Feasibility and Acceptability of Ketogenic Diet for Cancer Treatment. *Journal of cancer prevention* **22**: 127-134

Comin-Anduix B, Boren J, Martinez S, Moro C, Centelles JJ, Trebukhina R, Petushok N, Lee WN, Boros LG, Cascante M (2001) The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. A metabolic control analysis study. *Eur J Biochem* **268**: 4177-4182

Coy J, Franz M (2009) *Die neue Anti-Krebs Ernährung - Wie Sie das Krebs-Gen stoppen*, 1. Aufl. München: Gräfe und Unzer.

Coy JF (2017) EDIM-TKTL1/Apo10 Blood Test: An Innate Immune System Based Liquid Biopsy for the Early Detection, Characterization and Targeted Treatment of Cancer. *International journal of molecular sciences* **18**

Coy JF, Dressler D, Wilde J, Schubert P (2005) Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clin Lab* **51**: 257-273

Coy JF, Dubel S, Kioschis P, Thomas K, Micklem G, Delius H, Poustka A (1996) Molecular cloning of tissue-specific transcripts of a transketolase-related gene: implications for the evolution of new vertebrate genes. *Genomics* **32**: 309-316

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 10158-10163

DESTATIS - Statistisches Bundesamt (2017) Gestorbene nach Todesursachen, Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der ICD-10, abgerufen am 03.10.2017, <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/GestorbeneAnzahl.html>

DGE - Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (2015) Essen und Trinken während der Krebstherapie, abgerufen am 16.10.2017, <https://www.dge.de/presse/pm/essen-und-trinken-waehrend-der-krebstherapie/>

Diaz-Moralli S, Aguilar E, Marin S, Coy JF, Dewerchin M, Antoniewicz MR, Meca-Cortes O, Notebaert L, Ghesquiere B, Eelen G, Thomson TM, Carmeliet P, Cascante M (2016) A key role for transketolase-like 1 in tumor metabolic reprogramming. *Oncotarget*

Diaz-Moralli S, Tarrado-Castellarnau M, Alenda C, Castells A, Cascante M (2011) Transketolase-like 1 expression is modulated during colorectal cancer progression and metastasis formation. *PLoS One* **6**: e25323

Djureinovic D, Hallstrom BM, Horie M, Mattsson JS, La Fleur L, Fagerberg L, Brunnstrom H, Lindskog C, Madjar K, Rahnenfuhrer J, Ekman S, Stahle E, Koyi H, Branden E, Edlund K, Hengstler JG, Lambe M, Saito A, Botling J, Ponten F, Uhlen M, Micke P (2016) Profiling cancer testis antigens in non-small-cell lung cancer. *JCI insight* **1**: e86837

DKG - Deutsche Krebsgesellschaft (2014) Wissenschaftliche Stellungnahmen, 09/2014: Ketogene und kohlenhydratarme Diät, abgerufen am 16.10.2017, <https://www.krebsgesellschaft.de/deutsche-krebsgesellschaft/klinische-expertise/wissenschaftliche-stellungnahmen.html>

DKG - Deutsche Krebsgesellschaft (2015) Wissenschaftliche Stellungnahmen, 05/2015: Bestimmung des Enzyms TKTL1 mit dem EDIM-Test, abgerufen am 16.10.2017, <https://www.krebsgesellschaft.de/deutsche-krebsgesellschaft/klinische-expertise/wissenschaftliche-stellungnahmen.html>

Dong Y, Wang M (2017) Knockdown of TKTL1 additively complements cisplatin-induced cytotoxicity in nasopharyngeal carcinoma cells by regulating the levels of NADPH and ribose-5-phosphate. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **85**: 672-678

Driessens G, Beck B, Caauwe A, Simons BD, Blanpain C (2012) Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature* **488**: 527-530

- Fandrey J** (2007) Regulation der Sauerstoffhomöostase durch Hypoxie-induzierbaren Faktor-1. *BIOSpektrum* **13**: 26-28
- Fenske W, Volker HU, Adam P, Hahner S, Johanssen S, Wortmann S, Schmidt M, Morcos M, Muller-Hermelink HK, Allolio B, Fassnacht M** (2009) Glucose transporter GLUT1 expression is an stage-independent predictor of clinical outcome in adrenocortical carcinoma. *Endocrine-related cancer* **16**: 919-928
- Feyen O, Coy JF, Prasad V, Schierl R, Saenger J, Baum RP** (2012) EDIM-TKTL1 blood test: a noninvasive method to detect upregulated glucose metabolism in patients with malignancies. *Future oncology* **8**: 1349-1359
- Foldi M, Stickeler E, Bau L, Kretz O, Watermann D, Gitsch G, Kayser G, Zur Hausen A, Coy JF** (2007) Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer. *Oncol Rep* **17**: 841-845
- Foulds L** (1954) The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* **14**: 327-339
- Fritz P, Coy JF, Murdter TE, Ott G, Alscher MD, Friedel G** (2012) TKTL-1 expression in lung cancer. *Pathol Res Pract* **208**: 203-209
- Frohlich E, Fink I, Wahl R** (2009) Is transketolase like 1 a target for the treatment of differentiated thyroid carcinoma? A study on thyroid cancer cell lines. *Invest New Drugs* **27**: 297-303
- Gambhir SS** (2002) Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nature reviews Cancer* **2**: 683-693
- Gatenby RA, Gillies RJ** (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews Cancer* **4**: 891-899
- Gires O, Klein CA, Baeuerle PA** (2009) On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. *Nature reviews Cancer* **9**: 143; author reply 143
- Glinsky GV, Ivanova YA, Glinskii AB** (2003a) Common malignancy-associated regions of transcriptional activation (MARTA) in human prostate, breast, ovarian, and colon cancers are targets for DNA amplification. *Cancer Lett* **201**: 67-77
- Glinsky GV, Kronen-Herzig A, Glinskii AB** (2003b) Malignancy-associated regions of transcriptional activation: gene expression profiling identifies common chromosomal

regions of a recurrent transcriptional activation in human prostate, breast, ovarian, and colon cancers. *Neoplasia* **5**: 218-228

Goldmann T, Vollmer E, Gerdes J (2003) What's cooking? detection of important biomarkers in HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues eliminates the need for antigen retrieval. *Am J Pathol* **163**: 2638-2640

Goldmann T, Wiedorn KH, Kuhl H, Olert J, Branscheid D, Pechkovsky D, Zissel G, Galle J, Muller-Quernheim J, Vollmer E (2002) Assessment of transcriptional gene activity in situ by application of HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* **198**: 91-95

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59-74

Grimm M, Cetindis M, Lehmann M, Biegner T, Munz A, Teriete P, Kraut W, Reinert S (2014) Association of cancer metabolism-related proteins with oral carcinogenesis - indications for chemoprevention and metabolic sensitizing of oral squamous cell carcinoma? *Journal of translational medicine* **12**: 208

Grimm M, Feyen O, Coy JF, Hofmann H, Teriete P, Reinert S (2016a) Analysis of circulating CD14+/CD16+ monocyte-derived macrophages (MDMs) in the peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* **121**: 301-306

Grimm M, Hoefert S, Krimmel M, Biegner T, Feyen O, Teriete P, Reinert S (2016b) Monitoring carcinogenesis in a case of oral squamous cell carcinoma using a panel of new metabolic blood biomarkers as liquid biopsies. *Oral and maxillofacial surgery*

Grimm M, Kraut W, Hoefert S, Krimmel M, Biegner T, Teriete P, Cetindis M, Polligkeit J, Kluba S, Munz A, Reinert S (2016c) Evaluation of a biomarker based blood test for monitoring surgical resection of oral squamous cell carcinomas. *Clinical oral investigations* **20**: 329-338

Grimm M, Schmitt S, Teriete P, Biegner T, Stenzl A, Hennenlotter J, Muhs HJ, Munz A, Nadtschi T, Konig K, Sanger J, Feyen O, Hofmann H, Reinert S, Coy JF (2013) A biomarker based detection and characterization of carcinomas exploiting two fundamental biophysical mechanisms in mammalian cells. *BMC cancer* **13**: 569

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580

- Hanahan D, Weinberg RA** (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70
- Harris CC** (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* **88**: 1442-1455
- Hartmannsberger D, Mack B, Eggert C, Denzel S, Stepp H, Betz CS, Gires O** (2011) Transketolase-like protein 1 confers resistance to serum withdrawal in vitro. *Cancer Lett* **300**: 20-29
- Heppner GH** (1984) Tumor heterogeneity. *Cancer Res* **44**: 2259-2265
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC** (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* **253**: 49-53
- Hsu PP, Sabatini DM** (2008) Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**: 703-707
- Hu LH, Yang JH, Zhang DT, Zhang S, Wang L, Cai PC, Zheng JF, Huang JS** (2007) The TKTL1 gene influences total transketolase activity and cell proliferation in human colon cancer LoVo cells. *Anticancer Drugs* **18**: 427-433
- Ichim CV, Wells RA** (2006) First among equals: the cancer cell hierarchy. *Leukemia & lymphoma* **47**: 2017-2027
- Jacob LM, Weis N** (2012) Krebszellen mögen Zucker, aber noch mehr lieben sie Fett und tierisches Eiweiß. *DZO* **44**: 109-118
- Jansen N, Coy JF** (2013) Diagnostic use of epitope detection in monocytes blood test for early detection of colon cancer metastasis. *Future oncology* **9**: 605-609
- Jansen N, Walach H** (2016) The development of tumours under a ketogenic diet in association with the novel tumour marker TKTL1: A case series in general practice. *Oncology letters* **11**: 584-592
- Jayachandran A, Lo PH, Chueh AC, Prithviraj P, Molania R, Davalos-Salas M, Anaka M, Walkiewicz M, Cebon J, Behren A** (2016) Transketolase-like 1 ectopic expression is associated with DNA hypomethylation and induces the Warburg effect in melanoma cells. *BMC cancer* **16**: 134
- Jia X, Shan C, Xu O, Wang J** (2015) [Expression and clinical significance of MTDH, HIF-1 α and TKTL1 in laryngeal carcinoma]. *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai*

ke za zhi = Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery **29**: 2133-2138

Kämmerer U, Gires O, Pfetzer N, Wiegering A, Klement RJ, Otto C (2015) TKTL1 expression in human malign and benign cell lines. *BMC cancer* **15**: 2

Kämmerer U, Schlatterer C, Knoll G (2016) *Krebszellen lieben Zucker - Patienten brauchen Fett.*, 5. Aufl.: Systemed.

Kämmerer U, Schmidt M, Pfetzer N (2010) *Die Ketogene Ernährung bei Krebserkrankungen*, 3. Aufl. Würzburg: Universitätsklinikum Würzburg.

Kayser G, Sienel W, Kubitz B, Mattern D, Stickeler E, Passlick B, Werner M, Zur Hausen A (2011) Poor outcome in primary non-small cell lung cancers is predicted by transketolase TKTL1 expression. *Pathology* **43**: 719-724

Kilpatrick ES, Lind MJ (2009) Appropriate requesting of serum tumour markers. *BMJ (Clinical research ed)* **339**: b3111

Kohrenhagen N, Voelker HU, Schmidt M, Kapp M, Krockenberger M, Frambach T, Dietl J, Kammerer U (2008) Expression of transketolase-like 1 (TKTL1) and p-Akt correlates with the progression of cervical neoplasia. *J Obstet Gynaecol Res* **34**: 293-300

Krishan A (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* **66**: 188-193

Krockenberger M, Engel JB, Schmidt M, Kohrenhagen N, Hausler SF, Dombrowski Y, Kapp M, Dietl J, Honig A (2010) Expression of transketolase-like 1 protein (TKTL1) in human endometrial cancer. *Anticancer Res* **30**: 1653-1659

Krockenberger M, Honig A, Rieger L, Coy JF, Sutterlin M, Kapp M, Horn E, Dietl J, Kammerer U (2007) Transketolase-like 1 expression correlates with subtypes of ovarian cancer and the presence of distant metastases. *Int J Gynecol Cancer* **17**: 101-106

Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-16

Langbein S, Frederiks WM, zur Hausen A, Popa J, Lehmann J, Weiss C, Alken P, Coy JF (2008) Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: new targets for progressive renal cell cancer. *Int J Cancer* **122**: 2422-2428

Langbein S, Zerilli M, Zur Hausen A, Staiger W, Rensch-Boschert K, Lukan N, Popa J, Ternullo MP, Steidler A, Weiss C, Grobholz R, Willeke F, Alken P, Stassi G, Schubert P, Coy JF (2006) Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br J Cancer* **94**: 578-585

Lange CA, Tisch-Rottensteiner J, Bohringer D, Martin G, Schwartzkopff J, Auw-Haedrich C (2012) Enhanced TKTL1 Expression in Malignant Tumors of the Ocular Adnexa Predicts Clinical Outcome. *Ophthalmology*

Leong AS (2004) Pitfalls in diagnostic immunohistology. *Adv Anat Pathol* **11**: 86-93

Leong TY, Cooper K, Leong AS (2010) Immunohistology--past, present, and future. *Adv Anat Pathol* **17**: 404-418

Li B, Iglesias-Pedraz JM, Chen LY, Yin F, Cadenas E, Reddy S, Comai L (2014) Downregulation of the Werner syndrome protein induces a metabolic shift that compromises redox homeostasis and limits proliferation of cancer cells. *Aging cell* **13**: 367-378

Li J, Zhu SC, Li SG, Zhao Y, Xu JR, Song CY (2015) TKTL1 promotes cell proliferation and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **74**: 71-76

Li M, Gao F, Xia Y, Tang Y, Zhao W, Jin C, Luo H, Wang J, Li Q, Wang Y (2016) Filtrating colorectal cancer associated genes by integrated analyses of global DNA methylation and hydroxymethylation in cancer and normal tissue. *Scientific reports* **6**: 31826

Lindqvist Y, Schneider G, Ermler U, Sundstrom M (1992) Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J* **11**: 2373-2379

Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE. (2007) Biochemie und Pathobiochemie. *Springer-Lehrbuch*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Lu H, Forbes RA, Verma A (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* **277**: 23111-23115

Magee Jeffrey A, Piskounova E, Morrison Sean J (2012) Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell* **21**: 283-296

Maldonado EN, Lemasters JJ (2012) Warburg Revisited: Regulation of Mitochondrial Metabolism by Voltage Dependent Anion Channels in Cancer Cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*

Maslova AO, Meshalkina LE, Kochetov GA (2012) Computer Modeling of Transketolase-Like Protein, TKTL1, a Marker of Certain Tumor Tissues. *Biochemistry (Mosc)* **77**: 296-299

Mayer A, Von Wallbrunn A, Vaupel P (2010) Glucose metabolism of malignant cells is not regulated by transketolase-like (TKTL)-1. *International journal of oncology* **37**: 265-271

Meshalkina LE, Druitsa VL, Koroleva ON, Solovjeva ON, Kochetov GA (2013) Is transketolase-like protein, TKTL1, transketolase? *Biochim Biophys Acta* **1832**: 387-390

Mitschke L, Parthier C, Schroder-Tittmann K, Coy J, Ludtke S, Tittmann K (2010) The crystal structure of human transketolase and new insights into its mode of action. *J Biol Chem* **285**: 31559-31570

Nassar D, Blanpain C (2016) Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annual review of pathology* **11**: 47-76

National Center for Biotechnology Information USNLoM (2017) transketolase-like protein 1 isoform a [Homo sapiens], NCBI Reference Sequence: NP_036385.3, abgerufen am 19.10.2017, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_036385.3

National Center for Biotechnology Information USNLoM (2018a) TKT transketolase [Homo sapiens (human)], Gene ID: 7086, abgerufen am 17.03.2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7086>

National Center for Biotechnology Information USNLoM (2018b) TKTL2 transketolase like 2 [Homo sapiens (human)], Gene ID: 84076, abgerufen am 17.03.2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84076>

Negm RS, Verma M, Srivastava S (2002) The promise of biomarkers in cancer screening and detection. *Trends in Molecular Medicine* **8**: 288-293

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods* **139**: 271-279

Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**: 23-28

Olert J, Wiedorn KH, Goldmann T, Kuhl H, Mehraein Y, Scherthan H, Niketeghad F, Vollmer E, Muller AM, Muller-Navia J (2001) HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract* **197**: 823-826

Pedersen PL (2007) Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **39**: 211-222

Philipp M, Schwaab J, Dietz CT, Hanfstein B, Kalmanti L, Munjal U, Mossner M, Nowak D, Seifarth W, Hofmann WK, Hochhaus A, Muller MC, Erben P (2014) Expression of transketolase-like gene 1 (TKTL1) depends on disease phase in patients with chronic myeloid leukaemia (CML). *J Cancer Res Clin Oncol* **140**: 411-417

Rais B, Comin B, Puigjaner J, Brandes JL, Creppy E, Saboureau D, Ennamany R, Lee WN, Boros LG, Cascante M (1999) Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Lett* **456**: 113-118

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2012) *Duale Reihe Biochemie*, 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Renan MJ (1993) How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Molecular carcinogenesis* **7**: 139-146

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**: 105-111

Riccardi C, Nicoletti I (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols* **1**: 1458-1461

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**: 111-115

Robert Koch-Institut (Hrsg). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 1. Ausgabe. Berlin, 2016

Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Berlin, 2017

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd Aufl. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schenk G, Duggleby RG, Nixon PF (1998) Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **30**: 1297-1318

Schenk G, Layfield R, Candy JM, Duggleby RG, Nixon PF (1997) Molecular evolutionary analysis of the thiamine-diphosphate-dependent enzyme, transketolase. *Journal of molecular evolution* **44**: 552-572

Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, van den Born M, van Es JH, van de Wetering M, Clevers H (2012) Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* **337**: 730-735

Schmidt M, Kammerer U, Segerer S, Cramer A, Kohrenhagen N, Dietl J, Voelker HU (2008) Glucose metabolism and angiogenesis in granulosa cell tumors of the ovary: activation of Akt, expression of M2PK, TKTL1 and VEGF. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **139**: 72-78

Schmidt M, Voelker HU, Kapp M, Krockenberger M, Dietl J, Kammerer U (2010) Glycolytic phenotype in breast cancer: activation of Akt, up-regulation of GLUT1, TKTL1 and down-regulation of M2PK. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**: 219-225

Schneider S, Ludtke S, Schroder-Tittmann K, Wechsler C, Meyer D, Tittmann K (2012) A delta38 deletion variant of human transketolase as a model of transketolase-like protein 1 exhibits no enzymatic activity. *PLoS One* **7**: e48321

Schultz H, Kahler D, Branscheid D, Vollmer E, Zabel P, Goldmann T (2008) TKTL1 is overexpressed in a large portion of non-small cell lung cancer specimens. *Diagn Pathol* **3**: 35

Schwaab J, Horisberger K, Strobel P, Bohn B, Gencer D, Kahler G, Kienle P, Post S, Wenz F, Hofmann WK, Hofheinz RD, Erben P (2011) Expression of Transketolase like gene 1 (TKTL1) predicts disease-free survival in patients with locally advanced rectal cancer receiving neoadjuvant chemoradiotherapy. *BMC cancer* **11**: 363

Selivanov VA, Kovina MV, Kochevova NV, Meshalkina LE, Kochetov GA (2004) Kinetic study of the H103A mutant yeast transketolase. *FEBS Lett* **567**: 270-274

Semilia M, Hennenlotter J, Pavone C, Bischoff T, Kuhs U, Gakis G, Bedke J, Stenzl A, Schwentner C, Todenhofer T (2015) Expression patterns and prognostic role of transketolase-like 1 in muscle-invasive bladder cancer. *World J Urol*

Shi SR, Key ME, Kalra KL (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* **39**: 741-748

Shi Z, Tang Y, Li K, Fan Q (2015) TKTL1 expression and its downregulation is implicated in cell proliferation inhibition and cell cycle arrest in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **36**: 8519-8529

Shimizu T, Inoue KI, Hachiya H, Shibuya N, Shimoda M, Kubota K (2013) Frequent alteration of the protein synthesis of enzymes for glucose metabolism in hepatocellular carcinomas. *Journal of gastroenterology*

Singleton CK, Wang JJ, Shan L, Martin PR (1996) Conserved residues are functionally distinct within transketolases of different species. *Biochemistry* **35**: 15865-15869

Smith IM, Glazer CA, Mithani SK, Ochs MF, Sun W, Bhan S, Vostrov A, Abdullaev Z, Lobanenkov V, Gray A, Liu C, Chang SS, Ostrow KL, Westra WH, Begum S, Dhara M, Califano J (2009) Coordinated activation of candidate proto-oncogenes and cancer testes antigens via promoter demethylation in head and neck cancer and lung cancer. *PLoS One* **4**: e4961

Smith TG, Robbins PA, Ratcliffe PJ (2008) The human side of hypoxia-inducible factor. *British journal of haematology* **141**: 325-334

Song Y, Liu D, He G (2015) TKTL1 and p63 are biomarkers for the poor prognosis of gastric cancer patients. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* **15**: 591-597

Staiger WI, Coy JF, Grobholz R, Hofheinz RD, Lukan N, Post S, Schwarzbach MH, Willeke F (2006) Expression of the mutated transketolase TKTL1, a molecular marker in gastric cancer. *Oncol Rep* **16**: 657-661

Stiewe T (2007) The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature reviews Cancer* **7**: 165-168

Sun W, Liu Y, Glazer CA, Shao C, Bhan S, Demokan S, Zhao M, Rudek MA, Ha PK, Califano JA (2010) TKTL1 is activated by promoter hypomethylation and contributes to head and neck squamous cell carcinoma carcinogenesis through increased aerobic glycolysis and HIF1alpha stabilization. *Clin Cancer Res* **16**: 857-866

The Human Protein Atlas (2018a) Version 18, Expression of TKTL1 in cancer - Summary - The Human Protein Atlas, abgerufen am 02.05.2018, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007350-TKTL1/pathology>

The Human Protein Atlas (2018b) Version 18, Expression of TKTL1 in lung cancer - The Human Protein Atlas, abgerufen am 02.05.2018, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000007350-TKTL1/pathology/tissue/lung+cancer>

The Human Protein Atlas (2018c) Version 18, TKTL1 - Antibodies - The Human Protein Atlas, abgerufen am 02.05.2018, <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000007350-TKTL1/antibody>

Todenhofer T, Hennenlotter J, Keller G, Neumann T, Stenzl A, Bedke J (2017) Effect of radical prostatectomy on levels of cancer related epitopes in circulating macrophages of patients with clinically localized prostate cancer. *Prostate* **77**: 1251-1258

Tsaur I, Thurn K, Juengel E, Oppermann E, Nelson K, Thomas C, Bartsch G, Oremek GM, Haferkamp A, Rubenwolf P, Blaheta RA (2016) Evaluation of TKTL1 as a biomarker in serum of prostate cancer patients. *Central European journal of urology* **69**: 247-251

Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Ponten F (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**: 1260419

Umland O, Ulmer AJ, Vollmer E, Goldmann T (2003) HOPE fixation of cytospin preparations of human cells for in situ hybridization and immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* **51**: 977-980

Universal Protein Resource (UniProt) (2018) Entry version 161 (28 Mar 2018), UniProtKB - P51854 (TKTL1_HUMAN), abgerufen am 01.05.2018, <http://www.uniprot.org/uniprot/P51854>

Visvader JE, Lindeman GJ (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews Cancer* **8**: 755-768

Visvader JE, Lindeman GJ (2012) Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell stem cell* **10**: 717-728

Vogelstein B, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends in genetics : TIG* **9**: 138-141

Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine* **10**: 789-799

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-310

Volker HU, Hagemann C, Coy J, Wittig R, Sommer S, Stojic J, Haubitz I, Vince GH, Kammerer U, Monoranu CM (2008) Expression of transketolase-like 1 and activation of Akt in grade IV glioblastomas compared with grades II and III astrocytic gliomas. *Am J Clin Pathol* **130**: 50-57

Volker HU, Scheich M, Schmausser B, Kammerer U, Eck M (2007) Overexpression of transketolase TKTL1 is associated with shorter survival in laryngeal squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **264**: 1431-1436

Vollmer E, Galle J, Lang DS, Loeschke S, Schultz H, Goldmann T (2006) The HOPE technique opens up a multitude of new possibilities in pathology. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* **47**: 15-19

Wang Y, Fang F, Shi C, Zhang X, Liu L, Li J, Zhou X, Yao J, Kang X (2012) Evaluation of a method for the simultaneous detection of multiple tumor markers using a multiplex suspension bead array. *Clinical Biochemistry*

Wanka C, Steinbach JP, 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

Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**: 309-314

Warburg O, Posener K, Negelein E (1924) Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochemische Zeitschrift* **152**: 309-344

Ward PS, Thompson CB (2012) Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* **21**: 297-308

Wikner C, Meshalkina L, Nilsson U, Backstrom S, Lindqvist Y, Schneider G (1995) His103 in yeast transketolase is required for substrate recognition and catalysis. *Eur J Biochem* **233**: 750-755

Wittig R, Coy JF (2008) The role of glucose metabolism and glucose-associated signalling in cancer. *Perspect Medicin Chem* **1**: 64-82

World Health Organization (2018) Cancer, Fact sheet, February 2018, abgerufen am 21.03.2018, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

Wu HT, Allie N, Myer L, Govender D (2009) Anaplastic neuroblastomas express transketolase-like enzyme 1. *J Clin Pathol* **62**: 460-463

Xu X, Zur Hausen A, Coy JF, Lochelt M (2009) Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells. *Int J Cancer* **124**: 1330-1337

Yamamoto T (1993) Molecular basis of cancer: oncogenes and tumor suppressor genes. *Microbiology and immunology* **37**: 11-22

Yuan W, Wu S, Guo J, Chen Z, Ge J, Yang P, Hu B (2010) Silencing of TKTL1 by siRNA inhibits proliferation of human gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* **9**

Zerilli M, Amato MC, Martorana A, Cabibi D, Coy JF, Cappello F, Pompei G, Russo A, Giordano C, Rodolico V (2008) Increased expression of transketolase-like-1 in papillary thyroid carcinomas smaller than 1.5 cm in diameter is associated with lymph-node metastases. *Cancer* **113**: 936-944

Zhao F, Mancuso A, Bui TV, Tong X, Gruber JJ, Swider CR, Sanchez PV, Lum JJ, Sayed N, Melo JV, Perl AE, Carroll M, Tuttle SW, Thompson CB (2010) Imatinib resistance associated with BCR-ABL upregulation is dependent on HIF-1alpha-induced metabolic reprogramming. *Oncogene*

Zhao J, Zhong CJ (2009) A review on research progress of transketolase. *Neurosci Bull* **25**: 94-99

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Olivier Gires für das interessante Thema und die Möglichkeit, die Experimente für diese Doktorarbeit im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Klinikum Großhadern durchzuführen, bedanken. Vielen Dank für die fachlich anregenden Diskussionen, die mich bei meiner Arbeit immer weitergebracht haben, die menschliche und humorvolle Art, die tolle Unterstützung während und auch nach der Zeit im Labor und vor allem für die unendliche Geduld bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Die Zusammenarbeit war eine Bereicherung für mich, hat mich vieles gelehrt und auch in anstrengenden Zeiten Spaß gemacht.

Ein herzlicher Dank gilt auch dem restlichen Laborteam, insbesondere Frau Brigitte Mack, Frau Dr. Sabine Haberl (geb. Denzel), Frau Dr. Bárbara González Carvajal, Frau Dr. Dorothea Maetzel, Frau Carola Eggert und meiner Mitdotorandin Frau Verena Willige für die geduldige Einarbeitung in alle relevanten Methoden, die vielen hilfreichen Ratschläge, das immer offene Ohr und nicht zuletzt das tolle Arbeitsklima. Dies alles hat wesentlich mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch meiner Schwägerin Eva für das Korrekturlesen meiner Dissertation, meinen Geschwistern für ihre Unterstützung während meines Studiums sowie meiner Freundin Silvia und meiner Kollegin Claire für ihre Motivation und den Beistand in den Endzügen dieser Arbeit aussprechen.

Mein ganz besonderer und größter Dank aber gilt meinen Eltern und meinem Mann Simon für den bedingungslosen Rückhalt und ihr Verständnis während aller Höhen und Tiefen. Ohne ihre fortwährende Motivation und Ermutigung über all die Jahre hinweg wäre der erfolgreiche Abschluss meiner Promotion kaum vorstellbar gewesen. Vielen Dank für alles!