

Aus der Klinik für Innere Medizin I
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Schreiber)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Einfluss des Transkriptionsfaktors
Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)
auf die metabolische Reprogrammierung
kolorektaler Zellen während
der entzündlichen Karzinogenese des Darmes**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde einer Doktorin der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
vorgelegt von

KRISTINA DIEHL

aus Omsk

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Heiner Schäfer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Janka Held-Feindt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2018

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.08.2018

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden auf folgendem Kongress vorgestellt:

Diehl, K.; Bauer, I.; Witt-Ramdohr M.; Deisinger F.; Sebens, S.; Schäfer, H. (2015): Einfluss des Transkriptionsfaktors Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) auf die metabolische Reprogrammierung kolorektaler Zellen während der entzündlichen Karzinogenese des Darmes. Präsentiert auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) in Leipzig.

Weiterhin wurden Teile dieser Arbeit in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Diehl, K.; Dinges, L.-A.; Helm, O.; Ammar, N.; Plundrich, D.; Arlt, A.; Röcken, C.; Sebens, S.; Schäfer, H. (2017): Nuclear factor E2-related factor-2 has a differential impact on MCT1 and MCT4 lactate carrier expression in colonic epithelial cells: a condition favoring metabolic symbiosis between colorectal cancer and stromal cells. *Oncogene*; DOI: 10.1038/onc.2017.299.

Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkung	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis	XVI
1 Einleitung.....	1
1.1 Kolorektales Karzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Risikofaktoren.....	2
1.1.3 Oxidativer Stress	2
1.2 M1- und M2-Makrophagen.....	3
1.2.1 Colitis Ulcerosa-assoziierte Karzinogenese.....	3
1.3 <i>Nuclear factor E2-related factor-2</i> (Nrf2)	4
1.3.1 Struktur und Regulation	4
1.3.2 Nrf2-Zielgene.....	5
1.3.3 Nrf2-Aktivatoren.....	5
1.3.4 Duale Rolle von Nrf2.....	6
1.3.5 Tumorigene Funktion im Rahmen der metabolischen Reprogrammierung und Kompartimentierung	7
1.4 Monocarboxylat Transporter 1 (MCT1) und 4 (MCT4).....	9
1.5 Ziel der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Geräte	12
2.2 Chemikalien	14

2.3 Verbrauchsmaterialien	17
2.4 Antikörper	19
2.5 Primer.....	21
2.6 siRNAs	23
2.7 Plasmide	23
2.8 Zellbiologische Methoden.....	23
2.8.1 Zelllinien	23
2.8.2 Kulturmedien	24
2.8.3 Zellkultur.....	24
2.8.4 Indirekte Kokultur.....	25
2.8.5 Stimulation	27
2.8.6 Transfektion von Zellen	27
2.9 Proteinbiochemische Methoden.....	28
2.9.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten.....	28
2.9.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	28
2.9.3 Einstellung des Proteingehaltes	29
2.9.4 Herstellung von Kernextrakten	29
2.9.5 Konzentrationsbestimmung und Einstellung des Kernproteingehaltes ..	30
2.9.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.9.7 Western-Blotting	32
2.10 Molekularbiologische Methoden	34
2.10.1 RNA-Isolierung.....	34
2.10.2 Herstellung von cDNA (reverse Transkription).....	34
2.10.3 Real-Time PCR	34
2.11 Analytische Methoden	35
2.11.1 Caspaseassay	35
2.11.2 MTS Assay zur Bestimmung der Zellviabilität	36
2.12 Immunhistochemische Färbung	37
2.12.1 Konventionelle Immunhistochemie	37

2.12.2	Immunfluoreszenzfärbung	38
2.13	Immunzytochemie.....	38
2.13.1	Immunfluoreszenzfärbung auf Deckgläsern	38
2.14	Metabolische Analysen	39
2.14.1	Extrazelluläre Fluss-Analyse	39
2.14.2	¹⁴ C-Laktat-Aufnahme Assay.....	40
2.14.3	Glukose-Aufnahme Assay	41
2.15	Berechnungen, Statistiken, Graphik und Ausarbeitung.....	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Expression von MCT1 und MCT4 in menschlichem Darmgewebe in Abhängigkeit von einer Nrf2-Aktivierung.....	42
3.1.1	Reziproke MCT1- und MCT4-Expression in den Epithel- und Stroma- Kompartimenten des menschlichen KKK-Gewebes in Verbindung mit aktiviertem Nrf2.....	42
3.1.2	Epitheliale MCT1- und stromale MCT4-Expression in Geweben von CED-Patienten	44
3.2	Aktivierung von Nrf2-abhängigen Zellantworten in prämaligen und malignen humanen Kolonepithelzellen.....	46
3.3	Einfluss der M1- und M2-Makrophagen auf Nrf2 und die Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen	50
3.3.1	M1-Makrophagen beeinflussen die Expression von Matabolismusgenen in NCM460 Zellen	50
3.3.2	Die Effekte von M1-Makrophagen auf NCM460 Zellen sind abhängig von Nrf2	53
3.3.3	Effekt von M1-Makrophagen auf die Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen ist abhängig von ROS und Nrf2	54
3.3.4	Expression von Metabolismusgenen in den M1- und M2-Makrophagen...	55
3.4	Einfluss von Nrf2 auf die metabolische Reprogrammierung von NCM460 und HCT15 Zellen.....	57

3.5 Die Nrf2-induzierte MCT1-Expression vermittelt die Laktataufnahme in NCM460 und HCT15 Zellen	60
3.5.1 Einfluss von M1-Makrophagen auf die ¹⁴ C-Laktataufnahme von NCM460 Zellen	60
3.5.2 Abhängigkeit der ¹⁴ C-Laktataufnahme von der durch M1-Makrophagen vermittelten MCT1-Induktion in NCM460 Zellen	61
3.5.3 ¹⁴ C-Laktatimport in NCM460 und HCT15 Zellen ist abhängig von induziertem Nrf2 und seinem Einfluss auf die Expression von MCT1	62
3.6 Einfluss von Nrf2 auf den Phänotyp der Zellen.....	64
3.6.1 M1-Makrophagen vermitteln Nrf2-abhängigen Apoptoseschutz über die Induktion von MCT1 und G6PD in NCM460 Zellen.....	64
3.6.2 Der Nrf2- und MCT1-abhängige Laktataustausch fördert das Wachstum und das Überleben von malignen HCT15 Zellen.....	65
3.7 Unterschiedliche Lokalisation der Laktattransporter in kolorektalen Karzinomzelllinien.....	68
4 Diskussion	71
4.1 Bedeutung der reziproken Expression von MCT1/MCT4 als Ausdruck für Malignitäts-fördernde Kompartimentierung und reversen Warburg-Effekt.....	71
4.2 Regulation der Expression von MCT1.....	76
4.3 Metabolische Reprogrammierung und Laktatverwertung im Rahmen der Nrf2-Aktivierung	78
4.4 Einfluss von Makrophagen auf metabolische Kompartimentierung und Entwicklung von Malignitätsmerkmalen bei Karzinomzellen.....	80
4.5 Wachstumsvorteile durch metabolische Reprogrammierung und Kompartimentierung	82
4.6 Einfluss von Metaboliten auf das Epigenom	85
4.7 Rolle von Nrf2 in der Karzinogenese	86
4.8 Identität von nukleärem MCT1.....	86
4.9 Ansätze für antineoplastische Therapie	88

5	Zusammenfassung	92
5.1	Zusammenfassung.....	92
5.2	Summary	94
	Literaturverzeichnis	97
	Danksagung	111
	Erklärung	110

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland in 2010. Der Darmkrebs ist bei Männern der dritthäufigste und bei Frauen der zweithäufigste bösartige Tumor, der diagnostiziert wird (Modifiziert nach Robert-Koch-Institut 2013)..... 1
- Abbildung 2: Duale Rolle von Nrf2 in der Tumorgenese. Unter homöostatischen Bedingungen vermag Nrf2 tumorpräventiv zu wirken – unter exzessivem oxidativen Stress, Mutationen und/oder Einfluss von onkogenen Signalwegen fördert Nrf2 aber die Karzinogenese (aus Geismann et al. 2014)..... 7
- Abbildung 3: Modell indirekte Kokultur. 26
- Abbildung 4: A) Reziproke Expression von MCT1 und MCT4 in KRK ist abhängig von P-Nrf2. Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von Primärtumoren (Stadium III/IV, IUCC) von KRK-Patienten wurden einer konventionellen immunhistochemischen Färbung für MCT1, MCT4 oder aktiviertes Nrf2 (Phospho-Ser40-Nrf2) unterzogen. Die Abbildungen (200-fache Vergrößerung) von 6 aus 20 Fällen sind dargestellt; G1-G3: Grading 1-3. 43
- Abbildung 4: B) Reziproke Expression von MCT1 und MCT4 in KRK ist abhängig von P-Nrf2. Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von Primärtumoren (Stadium III/IV, IUCC) von KRK-Patienten wurden einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung für MCT1 und aktiviertes Nrf2 (Phospho-Ser40-Nrf2) unterzogen. Die Abbildungen von 6 Fällen von KRK sind in 400-facher oder 630-facher Vergrößerung dargestellt, MCT1 in grün, P-Nrf2 in rot und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. 44
- Abbildung 5: Reziproke Expression von MCT1 und MCT4 in CED ist abhängig von P-Nrf2. Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von Biopsien aus CED-Patienten wurden immunhistochemisch auf MCT1, MCT4, P-Nrf2 und CD68 untersucht. Die Abbildungen von 3 aus 10 Fällen sind in einer 200-fachen Vergrößerung dargestellt..... 45
- Abbildung 6: Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen. *Real-time* PCR zur semiquantitativen Bestimmung der MCT1, MCT4, G6PD und NQO1 mRNA in NCM460 Zellen unter Behandlung mit dem Nrf2-Aktivator tBHQ (50 µM)

über verschiedene Zeiten (h). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, statistische Signifikanz ($p < 0,05$; t-Test, MS-Excel) ist mit einem * gekennzeichnet.....	46
Abbildung 7: Expression von Metabolismusproteinen in NCM460 Zellen. A) Westernblot-Analyse von TALDO1, MCT4, TKT, LDHB, NQO1, G6PD und MCT1 unter Behandlung mit dem Nrf2-Aktivator tBHQ (50 μ M) über verschiedene Zeiten (h) bzw. ohne Behandlung (<i>w/o</i>). B) Westernblot-Analyse von TALDO1, MCT4, TKT, NQO1, LDHB, G6PD und MCT1. NCM460 Zellen wurden mit Kontroll siRNA oder Nrf2 siRNA transfiziert und anschließend mit tBHQ über 24 h stimuliert (+) bzw. nicht stimuliert (-). HSP90 wurde als Ladekontrolle detektiert. C) Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen nach Transfektion mit Kontrollplasmid-DNA (<i>mock</i>) bzw. ansteigenden Mengen Nrf2 Plasmid (<i>Nrf2 vector</i>).....	48
Abbildung 8: Expression von Metabolismusgenen in A) HCT15, HT29 und SW403 Zellen nach Stimulation mit tBHQ (50 μ M) oder SFN (10 μ M). B) HCT15 Zellen nach Transfektion mit Kontrollplasmid-DNA (<i>mock</i>) bzw. ansteigenden Mengen Nrf2 Plasmid (<i>Nrf2 vector</i>) oder in C) HCT15 Zellen unter tBHQ-Behandlung. In C) ist zusätzlich die Detektion von Nrf2 in Kernextrakten gezeigt.	50
Abbildung 9: Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen nach Kokultur ohne (-) oder mit M1- oder M2-Makrophagen. Dargestellt sind die Westernblot-Analysen von 7 Wiederholungen des Versuches.	51
Abbildung 10: Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen nach Kokultur ohne (-) bzw. mit M1- oder M2-Makrophagen über verschiedene Zeiten (h). <i>Real-time</i> PCR zur semiquantitativen Bestimmung der MCT1, MCT4, G6PD und NQO1 mRNA in NCM460 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des n-fachen Wertes in NCM460 Zellen ohne Makrophagen.	52
Abbildung 11: Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen nach Transfektion mit Kontroll siRNA oder Nrf2 siRNA und nach Kokultur ohne (<i>w/o</i>) oder mit M1- bzw. M2-Makrophagen. Dargestellt sind die Westernblot-Analysen der Gesamtzelllysate und der Kernextrakte der NCM460 Zellen. Lamin A dient hier zur Kontrolle der Beladung mit Kernprotein.....	54

Abbildung 12: Effekt von M1-Makrophagen auf die Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen ist abhängig von ROS und Nrf2. Expression von Metabolismusgenen nach Kokultur ohne (<i>w/o</i>) oder mit M1- bzw. M2-Makrophagen in Gegenwart des ROS-Scavengers Tiron oder ohne (<i>w/o</i>). Dargestellt sind die Westernblot-Analysen der Gesamtzelllysate und der Kernextrakte der NCM460 Zellen. Lamin A dient hier zur Kontrolle der Beladung mit Kernprotein.....	55
Abbildung 13: A) Expression von Metabolismusgenen in den M1- und M2-Makrophagen nach 120 h Kokultur ohne (–) oder mit (+) NCM460 Zellen. HSP90 dient der Ladekontrolle. B) Expression von MCT4 in M1- und M2-Makrophagen nach Kokultur ohne oder mit (+) NCM460 Zellen über 72 und 120 h. <i>Real-time</i> PCR zur semiquantitativen Bestimmung von MCT4 mRNA. Der mRNA-Gehalt wurde auf die Menge von hTBP mRNA normalisiert.....	56
Abbildung 14: Expression der charakteristischen Interleukine in M1- und M2-Makrophagen nach Kokultur ohne oder mit (+) NCM460 Zellen über 72 und 120 h. <i>Real-time</i> PCR zur semiquantitativen Bestimmung von IL-10 und IL-12a mRNA. Der mRNA-Gehalt wurde auf die Menge von hTBP mRNA normalisiert.	57
Abbildung 15: Glycolysis Stress Assay nach A) Stimulation mit tBHQ (NCM460 Zellen) oder ohne (<i>w/o</i>) bzw. B) Überexpression von Nrf2 (HCT15 Zellen) oder Kontrollplasmid (<i>mock</i>): ECAR (extrazelluläre Azidifizierungsrate in mpH/min) als Ausdruck der Laktatfreisetzung und Mito-Stress-Test: OCR (Sauerstoffaufnahme in pmol/min) als Ausdruck mitochondrialer Aktivität. Die Analyse erfolgte mittels des Seahorse XF, n=3, Mittelwerte ± Standardabweichung.	58
Abbildung 16: Expression von GLUT1 (A) und Glukoseaufnahme (B) in NCM460 Zellen ohne oder nach Stimulation mit 50 µM tBHQ bzw. nach Transfektion mit Kontrollplasmid-DNA (<i>mock</i>) bzw. Nrf2 Plasmid (Nrf2). Dargestellt sind A) die Westernblot-Analyse der Gesamtzelllysate von NCM460 bzw. HCT15 Zellen (Hsp90 diente der Ladekontrolle) und B) die Ergebnisse des luminometrischen Glukose-Aufnahme Assays (n=3, Mittelwerte ± Standardabweichung; Normalisierung der relativen Lumineszenz <i>units</i> (RLU) gegenüber dem Proteingehalt.	59

- Abbildung 17: Kokultur mit M1-Makrophagen erhöht die ^{14}C -Laktataufnahme von NCM460 Zellen. Indirekte Kokultur von NCM460 Zellen mit M1- oder M2-Makrophagen bzw. Monokultur (mono). Nach 48 h Zugabe von ^{14}C -Laktat für 1 h und Messung der aufgenommenen Laktatmenge in den Zelllysaten, ** $p < 0.02$ 61
- Abbildung 18: Kokultur mit M1-Makrophagen steigert über MCT1-Induktion in NCM460 Zellen deren ^{14}C -Laktataufnahme. Indirekte Kokultur von NCM460 Zellen mit M1-Makrophagen oder Monokultur (mono), zuvor siRNA-Transfektion mit Kontroll (*co*), MCT1 bzw. MCT4 siRNA. Nach 48 h Zugabe von ^{14}C -Laktat für 1 h und Messung der aufgenommenen Laktatmenge in den Zelllysaten; Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs unabhängigen Experimenten; ** $p < 0.02$. Westernblot-Analyse von NCM460 Gesamtzelllysaten nach Transfektion und Kokultur mit M1-Makrophagen bzw. Monokultur: MCT1, MCT4; Hsp90 dient der Ladekontrolle. 62
- Abbildung 19: Gesteigerte ^{14}C -Laktataufnahme in NCM460 und HCT15 Zellen nach Überexpression von Nrf2 und MCT1. A) NCM460 Zellen und B) HCT15 Zellen wurden mit Kontroll- (*mock*), MCT1, MCT4 und Nrf2 Plasmid-DNA transfiziert, das Kulturmedium im Anschluss mit ^{14}C -Laktat versetzt und nach 1 h die zellulär aufgenommene Menge vom ^{14}C -Laktat ausgewertet. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung aus fünf von einander unabhängigen Versuchen; * $p < 0.05$ und ** $p < 0.02$ im Vergleich zu *mock*. Es erfolgte die Kontrolle der induzierten Proteinexpression aus den Gesamtzelllysaten im Westernblot: MCT1, MCT4, Nrf2; Hsp90 als Ladekontrolle. 63
- Abbildung 20: A) Basale Caspase-3,-7-Aktivität / μg Protein in NCM460 Zellen, nach Transfektion mit Kontroll, MCT1, MCT4 und G6PD siRNA und Kokultur mit entweder PBMCs (Mo), M1- oder M2-Makrophagen; 6 unabhängige Versuche. B) Zeigt die Caspase-3,-7-Aktivität / μg Protein in NCM460 Zellen nach Transfektion mit siRNA (*Co* = Kontroll siRNA), Behandlung mit tBHQ oder ohne (*w/o*) und nach Behandlung mit TRAIL (+) oder ohne (-); 3 unabhängige Versuche..... 64
- Abbildung 21: Der Nrf2- und MCT1-abhängige Laktataustausch fördert das Wachstum und das Überleben von HCT15 Zellen. HCT15 Zellen, MCT4-überexprimierend oder nicht (Transwell: HCT15-MCT4^{TW} bzw. HCT15-*mock*^{TW}), wurden indirekt

mit HCT15 Zellen, Nrf2-überexprimierend oder nicht (HCT15-Nrf2^{BW} bzw. HCT15-*mock*^{BW}), im *bottom well* kokultiviert. Zuvor wurden die HCT15-Nrf2^{BW} bzw. HCT15-*mock*^{BW} mit Kontroll siRNA oder MCT1 siRNA behandelt. Zellen der *bottom wells* wurden nach Kokultur mittels MTS-Assay auf die Zellviabilität analysiert. 66

Abbildung 22: Der Nrf2- und MCT1-abhängige Laktataustausch schützt HCT15 Zellen vor TRAIL-induzierter Apoptose. Nach Kokultur mit HCT15^{TW} Zellen, MCT4-überexprimierend oder nicht, wurden HCT15 Zellen des unteren Kompartiments (HCT15-Nrf2^{BW} bzw. HCT15-*mock*^{BW} und mit oder ohne *knockdown* von MCT1 mittels siRNA für 8 h mit TRAIL (+) behandelt oder nicht. Anschließend wurde die Apoptose mittels der Caspase-3,-7-Aktivität/μg Protein in den HCT15^{BW} Zellen gemessen und die Proteinexpression von (gespaltenem) PARP-1 aus den Gesamtzelllysaten im Westernblot analysiert (unteres Feld). Die gezeigten Ergebnisse zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von sechs unabhängigen Versuchen; *p<0.05 & **p<0.02..... 67

Abbildung 23: Lokalisation von MCT1 und MCT4 auf den KRK-Zelllinien SW403 und HT29. Doppelte Immunfluoreszenzfärbung von SW403 und HT29 für MCT1 (rot), MCT4 (grün) und jeweils Gegenfärbung der Zellkerne mit Hoechst (blau). 800-fache Vergrößerung..... 68

Abbildung 24: Lokalisation von MCT1 und MCT4 auf den KRK-Zelllinien SW403 und HT29. Westernblot zeigt Zellkernlysate (Kernlysate) und Gesamtzelllysate beider Zelllinien, unbehandelt. Lamin AC: Lamin A dient dem Nachweis nukleären Proteins; Tubulin dient dem Nachweis zytoplasmatischen Proteins. 69

Abbildung 25: Modell zur metabolischen Kompartimentierung bei intratumoraler Heterogenität basierend auf reziproker Expression von MCT1/MCT4. Bei bestehendem Sauerstoffgradienten innerhalb der Tumormasse kommt es zur Ausbildung einer metabolischen Kompartimentierung. Demnach nehmen Tumorzellen in hypoxischen Regionen vermehrt Glukose auf und produzieren mittels der anaeroben Glykolyse Laktat, welches *via* MCT4 aus der Zelle exportiert wird. Dieses Laktat wird von den normoxischen Tumorzellen *via* MCT1 aufgenommen und dem Citratzyklus und anschließend der oxidativen Phosphorylierung zugeführt (*oxPhos*). Infolgedessen reduzieren Tumorzellen in normoxischen Regionen ihren Glukosekonsum, was in einer verlängerten Diffusionsstrecke für Glukose resultiert und für eine Konsolidierung der

metabolischen Kompartimentierung und Arbeitsteilung sorgt (angepasst an
Pisarsky et al. 2016). 74

Abbildung 26: Vorgeschlagenes Modell zum durch oxidativen Stress und Nrf2-
Induktion vermittelten MCT1-abhängigen Laktataustausch in KRK. Verursacht
durch eine persistierende Exposition des Kolonepithels gegenüber oxidativem
Stress – z. B. während einer chronischen Entzündung durch inflammatorische
Makrophagen lokal freigesetzte ROS – erfahren maligne wie prämaligne
Kolonozyten Nrf2-abhängigen Zellschutz, welcher die Hochregulation von
MCT1 einschließt. Die hohe MCT1-Expression befähigt diese Zellen zum
Laktatimport aus der Mikroumgebung, bestimmt durch den Status der
Sauerstoffversorgung sowie der HIF-1 α -Aktivierung, wobei das Laktat von den
hochglykolytischen und Laktat ausschleusenden (*via* MCT4) Karzinom-
und/oder Stromazellen („Warburg-Zellen“) stammt. Mittels der Laktataufnahme
und dessen Umwandlung zu Pyruvat können diese MCT1-überexprimierenden
Zellen die oxidative Phosphorylierung (*oxPhos*), aber auch kataplerotische
Stoffwechselwege und gar die Glukoneogenese aufrecht erhalten. Als
Bestandteil der Nrf2-abhängigen Zellprotektion, sowohl im KRK als auch
bereits während einer CED, könnte sich somit der reverse Warburg-Effekt
manifestieren (angepasst an Yoshida 2015; Nakajima und van Houten 2013). . 76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In der Deckglasfärbung verwendete Antikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.	19
Tabelle 2: In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.	19
Tabelle 3: In der Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.	20
Tabelle 4: In der Immunfluoreszenzfärbung verwendete Antikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.	20
Tabelle 5: Im Westernblot verwendete Primärantikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.	20
Tabelle 6: Im Westernblot verwendete Sekundärantikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.	21
Tabelle 7: In der <i>real-time</i> PCR verwendete Primer mit jeweiliger Angabe der Vorwärts- und Rückwärtsbasensequenz und des Herstellers.	21
Tabelle 8: Für den Gen- <i>Knockdown</i> verwendete siRNAs mit jeweiliger Angabe der Bestell-Nr. und des Herstellers.	23
Tabelle 9: Als Vektoren eingesetzte Plasmide mit jeweiliger Angabe des Herstellers. .	23
Tabelle 10: Die verwendeten Zelllinien mit der jeweiligen Angabe des Vertreibers.	23
Tabelle 11: Die verwendeten Zelllinien mit ihren jeweiligen Medien.	24

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
bidest.	bidestilliert
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FEP	Fluorethylenpropylen
h	Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl)ethansulfonsäure
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen-D <i>related</i>
HSP90	Hitzeschockprotein 90
G-6-P	Glukose-6-phosphat
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GCLC	<i>Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit</i>

GLUT1	Glukose Transporter 1
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KRK	Kolorektales Karzinom
LDHB	Laktatdehydrogenase B
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MCT	Monocarboxylat-Transporter
microRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i>
min	Minute
mM	Millimol
μCi	Mikrocurie
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor E-2 related factor 2</i>
NQO1	NAD(P)H Dehydrogenase [Quinone 1]
PARP-1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PI	Propidiumiodid
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PFKFB2	6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 2
PKM2	Pyruvat Kinase Isoenzym M2
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFN	Sulforaphan
SLC	Solute Carrier
TALDO1	Transaldolase 1
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
tBHQ	Tertiär-Butylhydrochinon
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBS-T	TBS-Tween
TGFβ1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TKT	Transketolase
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis inducing lig- and</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
x	-fach
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit stellt das kolorektale Karzinom (KRK) mit 1,36 Millionen diagnostizierten Neuerkrankungen im Jahre 2012 die dritthäufigste Krebsdiagnose dar (Ferlay et al. 2015). Nach dem Prostata- und Lungenkarzinom bei Männern und dem Mammakarzinom bei Frauen steht auch in Deutschland der Darmkrebs an dritter Stelle aller Malignomdiagnosen, der jährlich rund 28.000 Frauen und 36.000 Männer neu befällt (Abbildung 1). Zum Diagnosezeitpunkt sind Frauen im Mittel 75, Männer 71 Jahre alt. Trotz der steigenden Inzidenzzahlen sank in den letzten Jahren die Sterblichkeit durch Darmkrebs bei beiden Geschlechtern stark (Deutsches Krebsforschungszentrum 2014¹).

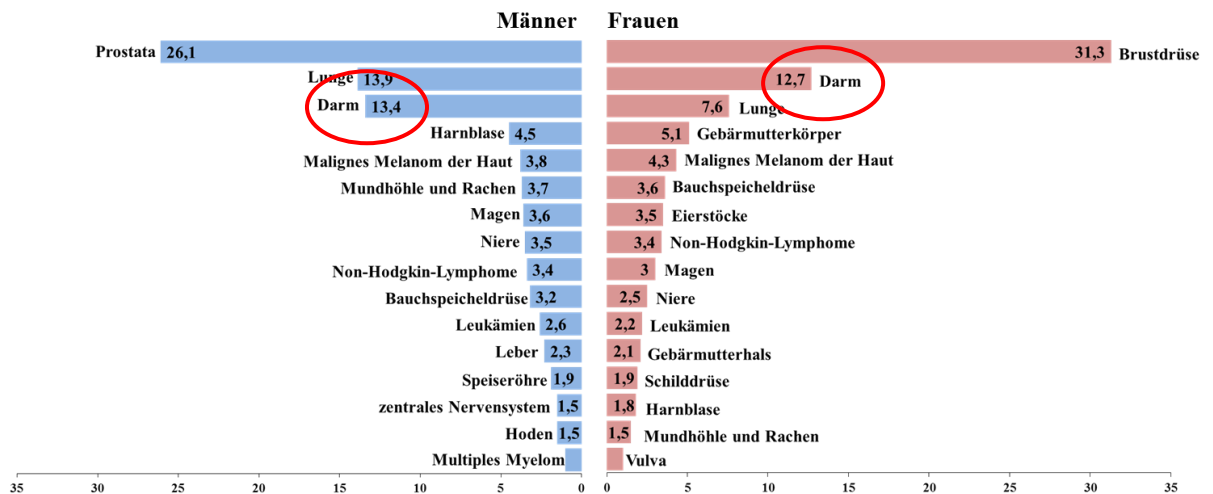


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland in 2010. Der Darmkrebs ist bei Männern der dritthäufigste und

¹ Deutsches Krebsforschungszentrum: „Zahlen und Fakten zu Darmkrebs“, unter: <http://www.dkfz.de/de/presse/darmkrebs-zahlen-fakten.html> (abgerufen am 12.09.2017).

bei Frauen der zweithäufigste bösartige Tumor, der diagnostiziert wird (Modifiziert nach Robert-Koch-Institut 2013²).

1.1.2 Risikofaktoren

Neben dem hohen Alter ist das Vorkommen von gutartigen Vorstufen, den Dickdarmadenomen, der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung vom KRK. Gemäß dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz (Vogelstein et al. 1988) entstehen etwa 90 % der KRK sporadisch auf dem Boden von erworbenen Genmutationen und etwa 5 % sind auf eine hereditäre Genese zurückzuführen (Weitz et al. 2005). Des Weiteren entwickeln sich auf dem Boden von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie der Colitis ulcerosa oder dem Morbus Crohn etwa 5 % aller Darmkarzinome (Scharl et al. 2014). Das relative Risiko für die Entwicklung von Darmkrebs bei CED-Patienten ist gegenüber der Allgemeinbevölkerung 10-fach erhöht. Im Zuge vieler Studien konnte bereits der Nachweis erbracht werden, dass u. a. der oxidative Stress im Rahmen ebendieser chronischen Entzündung einen bedeutenden Beitrag zur Karzinogenese leistet (Kruk und Aboul-Enein 2017; Seril 2003).

1.1.3 Oxidativer Stress

Der oxidative Stress im Sinne von übermäßiger Belastung von Zellen mit Sauerstoffradikalen spielt wahrscheinlich eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von KRK bei CED-Patienten. Hierbei steht v. a. die Colitis ulcerosa im Vordergrund, da diese Erkrankung im Gegensatz zu Morbus Crohn stets im Dickdarm lokalisiert ist (Yashiro 2015; Seril 2003).

Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) wie das Superoxid-Anionenradikal O_2^- , Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal $OH\cdot$ werden als Nebenprodukte physiologisch bei der mitochondrialen Elektronentransportkette gebildet (Schmidt und Lang 2007; Kehrer 2000). Darüber hinaus sind phagozytierende Entzündungszellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten in der Lage, die auf Pathogene bakterizid wirkenden ROS in großen Mengen zu generieren und im Sinne des Wirtszellschutzmechanismus in die Umgebung freizusetzen, wie es bei einer chronischen Entzündung gegeben ist (Roessner et al. 2008; Conner und Grisham 1996). Im Normalfall ist eine Körperzelle, die mit physiologischen Mengen an ROS konfrontiert

² Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V (2013): Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe, Berlin.

wird, dazu befähigt, mittels antioxidativen Systemen wie dem Glutathion Redox Puffer (Aslund et al. 1997) ein Gleichgewicht im Redoxstatus zu wahren. Überwiegen jedoch die oxidativen Reaktionen aufgrund von bspw. erhöhter Entzündungsaktivität, können ROS zelluläre Bestandteile schädigen, was dann als oxidativer Stress bezeichnet wird (Poli et al. 2004).

1.2 M1- und M2-Makrophagen

Es ist bekannt, dass das Stroma von kolorektalem Karzinomgewebe häufig in hohem Maße mit Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) durchsetzt ist. TAM zeigen dabei einen Malignitäts-fördernden Einfluss auf die Krebszellen, u. a. begünstigen sie Zellmigration und Metastasierung (Zhang et al. 2013). Abhängig von äußeren Einflüssen aus der direkten stromalen Umgebung differenzieren sich Monozyten entweder zu den sog. proinflammatorischen (M1) oder den antiinflammatorischen (M2) Makrophagen. Dabei weisen beide Gruppen jeweils charakteristische Merkmale auf: M1-Makrophagen sind gekennzeichnet durch die Expression von HLA-DR, IL-1 β , IL-6, IL-12 und TNF- α . Darüber hinaus sind sie mit der Fähigkeit ausgestattet, in großen Mengen ROS zu generieren (Covarrubias et al. 2013; Sebens et al. 2011). M2-Makrophagen hingegen exprimieren IL-10, CD163, CD 204/206 und TGF- β 1 auf ihrer Zelloberfläche (Helm et al. 2014a). Die Polarisation der Makrophagen lässt sich mittels bestimmter Wachstumsfaktoren auch *in vitro* herbeiführen und ihr Erfolg mithilfe der typischen Expressionsmuster überprüfen.

1.2.1 Colitis Ulcerosa-assoziierte Karzinogenese

Bei der Karzinogenese auf dem Boden von Colitis Ulcerosa steht der *crosstalk* zwischen Darmepithel- und den in Nachbarschaft sich aufhaltenden Entzündungszellen im Vordergrund. Insbesondere die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) scheinen hierbei eine herausragende Rolle zu spielen. Die durch die Makrophagen freigesetzten ROS verursachen DNA-Strangbrüche, Verkürzung der Telomere und direkte Schäden an DNA, welche zu Mutationen führen (Kruk und Aboul-Enein 2017) und vermögen darüber hinaus diverse Zellsignale zu vermitteln und tragen sogar zur Regulation der Genexpression bei (Lee et al. 2015). Die genannten genetischen und epigenetischen Veränderungen können die Funktion von Tumorsuppressorgenen beeinträchtigen und

eine Zunahme der Aktivität von Protoonkogenen bewirken, sodass die Entwicklung von kolorektalen Dysplasien und Karzinomen begünstigt wird (Roessner et al. 2008).

Durch chronische Entzündung und Belastung mit oxidativem Stress werden in der geschädigten Darmschleimhaut ROS-neutralisierende Signalkaskaden aktiviert und vermehrt genutzt, um eine epitheliale Adaptation an die oxidative Belastung zu erreichen. Diese Signalkaskaden schließen die Aktivierung des antioxidativen Transkriptionsfaktors *Nuclear factor E2-related factor-2* ein (Cho et al. 2006).

1.3 Nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2)

Im Hinblick auf die Detoxifizierung von zellschädigenden ROS gilt der Transkriptionsfaktor Nrf2 (*Nuclear factor E2-related factor-2*) als das Schlüsselement, welches mittels Induktion von antioxidativen Enzymen zur Regulation des Redoxgleichgewichts beiträgt (Nguyen et al. 2009).

1.3.1 Struktur und Regulation

Nrf2 gehört zur Familie der *Cap'n collar basic region leucine zipper proteins* und besteht aus sechs sog. Neh-Domänen (Moi et al. 1994). Die Neh2-Domäne stellt die N-terminale Region dar und dient als Bindungsdomäne für das Nrf2-hemmende zytosolische Protein Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) (Itoh et al. 1999). Unter Homöostase und Abwesenheit von oxidativem Stress liegt Nrf2 gebunden an Keap1 im Zytoplasma vor und ist dementsprechend nur in geringen Mengen frei vorhanden. Zusätzlich wird die Aktivität von Nrf2 dadurch gehemmt, dass Keap1 als Adapter fungiert und die durch Rbx1-/Cul3-Ligasen (*Ring box protein 1-* und *Cullin-3-* Ligasen) katalysierte Polyubiquitinierung und folgende proteasomale Degradierung von Nrf2 vermittelt (Cullinan et al. 2004; Katoh et al. 2005). Keap1 besitzt mehr als zwanzig freie Thiol-SH-Gruppen an Cysteinresten, diese funktionieren wie hochempfindliche Stresssensoren. Kommt es in einer Zelle zu oxidativem bzw. elektrophilem oder xenobiotischem Stress, wird der Nrf2-Signalweg aktiviert: Es kommt zu Modifizierungen der freien SH-Gruppen in den Cysteinresten von Keap1, sodass eine Formveränderung eintritt (Sporn und Liby 2012). Folglich wird aufgrund der Formveränderung die Rbx1-/Cul3-Ligasen-abhängige Polyubiquitinierung von Nrf2 verhindert, Nrf2 kann dissoziieren und akkumuliert im Zytoplasma (Yamamoto et al. 2008). Somit kann jenes und das *de novo*-synthetisierte Nrf2 in den Zellkern

translozieren, um die Transkription seiner Zielgene zu steuern (Cullinan et al. 2004). Hier bindet der Transkriptionsfaktor an die DNA als ein Heterodimer mit Maf-Proteinen an sein Wiedererkennungsmotiv – das ARE (*Antioxidant response element*), welches sich jeweils in der Promoterregion der Zielgene befindet. Somit wird die Transkription etlicher antioxidativer und entgiftender Gene induziert (Hayes und Dinkova-Kostova 2014).

1.3.2 Nrf2-Zielgene

Es wurden mittlerweile ca. 200 Zielgene von Nrf2 identifiziert, welche in Zellschutz, Lipidstoffwechsel und Gentranskription involviert sind (Hayes und Dinkova-Kostova 2014). Bzgl. der antioxidativen Wirkung und Entgiftung von Xenobiotika zählen v. a. viele Phase-I und Phase-II Enzyme dazu. Unter den Phase-II Enzymen finden sich unter anderem die UDP-Glucuronosyl-Transferase (UGT), NAD(P)H Dehydrogenase [Quinone 1] (NQO1), Glutathion S-Transferase (GST), *Glutamatcysteine ligase catalytic subunit* (GCLC) und die Superoxid-Dismutase (SOD) (Kumar et al. 2011; Hayes und Dinkova-Kostova 2014). Darüber hinaus induziert Nrf2 die Transkription der *multidrug-resistance-associated proteins* (MRP), mithilfe derer der Efflux von biotransformierten Produkten nach extrazellulär erleichtert wird (Maher et al. 2007). Viele der Arzneimittel-metabolisierenden Enzyme und antioxidativen Systeme benötigen NADPH als Kofaktor und interessanterweise ist Nrf2 an der Regulation von NADPH-generierenden Enzymen wie Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und Transaldolase1 (TALDO1) maßgeblich beteiligt (Hayes und Dinkova-Kostova 2014).

1.3.3 Nrf2-Aktivatoren

Neben ROS gibt es eine Reihe weiterer Nrf2-Aktivatoren wie z. B. Tertiär-Butylhydrochinon (tBHQ) oder Sulforaphan (SFN). Das Antioxidant tBHQ wird als Phenol synthetisch hergestellt und stellt ein bekanntes Konservierungsstoff in der Lebensmittelbranche dar³. Es aktiviert die Funktion von Nrf2 insofern, als dass Nrf2 stabilisiert wird und der proteasomalen Degradierung entkommt (Eftekharzadeh et al. 2010; Li et al. 2005). SFN hingegen, kommt als ein Isothiocyanat natürlich, z. B. in Brokkoli, vor (Sporn und Liby 2012) und ist ein unspezifischer Nrf2-Aktivator

³ World Health Organization, *International Programme on Chemical Safety* (2015).

(Guerrero-Beltrán et al. 2012). Neben der Entfaltung von antioxidativen Effekten, wirkt SFN bspw. noch inhibierend auf NF-κB (Heiss et al. 2001).

1.3.4 Duale Rolle von Nrf2

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass Nrf2 dem zellschädigenden und mutagenen Effekt von ROS entgegenwirkt. Daraus geht hervor, dass seine homöostatische Aktivität frühzeitig der Tumorentstehung vorbeugen kann. In vielen Studien konnte bereits eine tumorpräventive Wirkung für Nrf2 nachgewiesen werden (Hayes et al. 2010). So konnte am Tiermodell gezeigt werden, dass Wildtypmäuse im Gegensatz zu Nrf2-defizienten Mäusen weniger Tumoren entwickelt haben, nachdem sie mit SFN behandelt wurden (Xu et al. 2006). Schon auch anderen Agenzien wie z. B. Curcumin oder Oltipraz wurden aufgrund von aussagekräftigen Untersuchungen tumorpräventive Eigenschaften zugeschrieben (Ramos-Gomez et al. 2003). Unter der enthusiastischen Annahme, Nrf2 als induzierbares tumorpräventives *target* auch bei Menschen einsetzen zu können, werden zahlreiche klinische Studien v. a. in China durchgeführt (Kensler et al. 2013). Für die Anwendung von SFN wurden in diesem Rahmen die Verträglichkeit und eine Erhöhung des Gehalts an zytoprotektiven Enzymen bereits bestätigt (Cornblatt et al. 2007; Egner et al. 2011). Nichtsdestotrotz ist die Sympathie für Nrf2 seit neuestem einem Wandel unterlegen und die Bedenken im Hinblick auf die Langzeitanwendung sind gewachsen (Sporn und Liby 2012). Ursächlich dafür sind kürzliche Erkenntnisse darüber, dass Nrf2 in einer Reihe von verschiedenen Tumorentitäten wie dem Lungen-, Brust-, Ovarial-, Pankreas-, Prostata- und kolorektalem Karzinom überexprimiert ist und eine verstärkte Aktivität aufweist. Die Krebszellen erlangen in diesem Zuge Vorteile im Wachstum und Überleben (Lau et al. 2008). Offensichtlich kann Nrf2, trotz ursprünglich krebsvorbeugender Eigenschaften, durch eine längerfristige Aktivierung bspw. bei chronischem oxidativen Stress im Rahmen von CED oder einer Amplifizierung durch Mutationsereignisse, tumorfördernd wirken (Gañán-Gómez et al. 2013; Geismann et al. 2014). Tatsächlich wurde eine erhöhte Nrf2-Aktivität bereits in Vorstufen verschiedener Tumoren beschrieben (Petrelli et al. 2014; Chen et al. 2010). Des Weiteren ist inzwischen bekannt, dass sowohl genetische als auch epigenetische Veränderungen stark zur Deregulation von Nrf2 beitragen. Am häufigsten ist dabei der Inhibitor Keap1 betroffen – *loss of function*-Mutationen führen zu einer Hemmung der Nrf2-Bindung und die epigenetische Hypermethylierung inhibiert die Keap1-Expression. Weniger häufig treten Nrf2 *gain of function*-Mutationen auf (Taguchi et al.

2011). Darüber hinaus kann noch der *cross talk* mit anderen onkogenen Signalwegen (z. B. PI3K/Akt- oder kRas/Raf/MAPK-Signalweg) an der exzessiven Aktivierung von Nrf2 beteiligt sein (DeNicola et al. 2011). Diverse Zielgene von Nrf2 wie z. B. die proteasomalen Gene BclxL und Bcl-2 stehen im Zusammenhang mit maligner Transformation und einem veränderten Phänotyp von Tumorzellen (Arlt et al. 2009). Induziert durch Nrf2, tragen noch eine Reihe weiterer detoxifizierender Gene zur Resistenz gegenüber Zytostatika und Strahlentherapie bei (Wang et al. 2014; Mahaffey et al. 2009). Ein weiterer wichtiger Mechanismus, über den Nrf2 womöglich zur malignen Transformation von Zellen beiträgt, ist sein induzierender Effekt auf eine Vielzahl von Genen, welche im Glukose- und Energiestoffwechsel eine Rolle spielen (Mitsuishi et al. 2012).

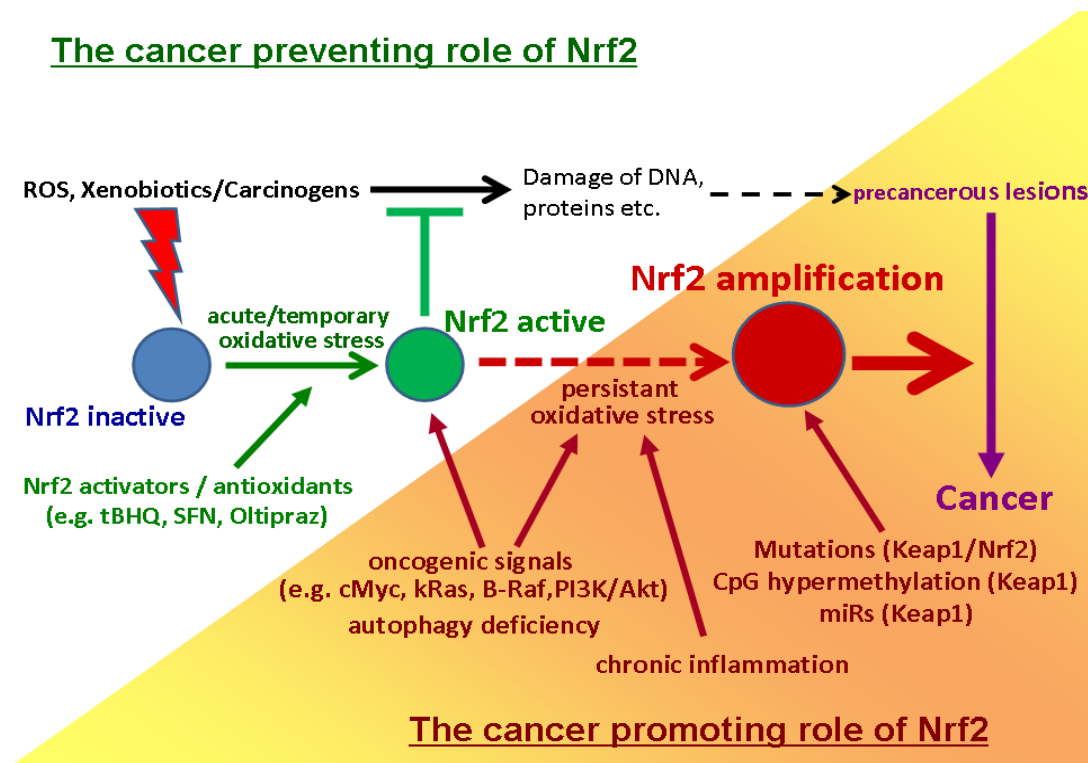


Abbildung 2: Duale Rolle von Nrf2 in der Tumorgenese. Unter homöostatischen Bedingungen vermag Nrf2 tumorpräventiv zu wirken – unter exzessivem oxidativen Stress, Mutationen und/oder Einfluss von onkogenen Signalwegen fördert Nrf2 aber die Karzinogenese (aus Geismann et al. 2014).

1.3.5 Tumorigene Funktion im Rahmen der metabolischen Reprogrammierung und Kompartimentierung

Schon 1924 hat Otto Warburg die Eigenschaft von Krebszellen beschrieben, ihre Energie unabhängig vom Sauerstoffangebot durch gesteigerte anaerobe Glykolyse, die s. g. Milchsäuregärung, bereit zu stellen. Dabei fallen hohe Raten an Laktat als

Endprodukt an (Warburg 1924). Diese Besonderheit wurde zunächst missinterpretiert und einer gestörten Mitochondrienfunktion zugeschrieben, statt einen Schaden an der Regulation der Glykolyse anzunehmen (Koppenol et al. 2011). Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurde dieses Thema wiederentdeckt, und es wuchs die Erkenntnis, dass der Warburg-Effekt bloß die „Spitze des Eisbergs“ darstellt bzgl. der metabolischen Umgestaltungsprozesse, welche die maligne Transformation begleiten. Dazu gehört nicht nur die anaerobe Glykolyse, sondern auch ein erhöhter Fluss durch den Pentosephosphatweg (PPP), erhöhte Rate der Lipidsynthese, hoher Glutaminkonsum und die Aufrechterhaltung einer Redox-Homöostase (Galluzzi et al. 2013).

Vorausgegangene Untersuchungen konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Nrf2 ein wichtiges Bindeglied zwischen der Adaptation von Zellen an inflammatorischen Stress, onkogener Signalübertragung und metabolischer Reprogrammierung darstellt (Hayes und Dinkova-Kostova 2014). Letztere wurde als ein „*hallmark of cancer*“ von Hanahan und Weinberg (2011) beschrieben und gilt als ein Wegbereiter für den Erwerb eines malignen Phänotyps von Zellen. Insbesondere Enzyme der Glykolyse und des PPPs (z. B. G6PD, TALDO1, TKT, PFKFB2) sind an der metabolischen Reprogrammierung beteiligt und die Regulation ihrer Expression steht unter dem Einfluß von Nrf2 (Mitsuishi et al. 2012; Hayes und Dinkova-Kostova 2014). Unter der Induktion dieser Enzyme kommt es zu einer gesteigerten Rate des PPPs und anderer anaplerotischer Stoffwechselwege (Hayes und Ashford 2012).

Mit den beschriebenen metabolischen Veränderungen geht auch die metabolische Kompartimentierung einher, bei welcher Tumor- und Tumorstromazellen (v. a. Fibroblasten) unterschiedliche Stoffwechselkonstellationen aufweisen und Metaboliten in symbiotischer Weise zwischen den beiden Kompartimenten ausgetauscht werden. Dieses Phänomen kann im Sinne eines reversen Warburg-Effektes ausgeprägt sein (Sotgia et al. 2012). Hierbei betreiben die Stromazellen Glykolyse und generieren große Mengen an Laktat, welches von den Tumorzellen aufgenommen und zur optimalen Energieausbeute der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien zugeführt wird. Gleichzeitig wird die Glukose auf diesem Wege anstatt der Energiegewinnung zur Biomasseproduktion bereitgestellt. Die Transporter Monocarboxylat-Transporter 1 und 4 (MCT1 bzw. MCT4), welche v. a. Laktat ein- bzw. auszuschleusen vermögen, scheinen durch ihre reziproke Expression in den beiden Kompartimenten eine richtungweisende Funktion für den Energietransfer zu erfüllen (Witkiewicz et al. 2012). Im Einzelnen ist MCT4 auf den Stromazellen und MCT1 auf den Tumorzellen in

hohem Maße exprimiert, wobei letztere mit diversen Wachstumsvorteilen ausgestattet sind (Pértega-Gomes et al. 2014). Demzufolge befähigt das verfügbare Metabolom – erworben durch die Nrf2-Überexpression – die Tumorzelle zu einer Stoffwechselkonstellation, die mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Witkiewicz et al. 2012; Vander Heiden et al. 2009; Sotgia et al. 2012).

1.4 Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1) und 4 (MCT4)

Im Rahmen eines reversen Warburg-Effektes nehmen die Monocarboxylat/Protonen-Symporter MCT1 und MCT4 eine zentrale Rolle im Energietransport ein, indem sie – wenn sie hochreguliert sind – ein Laktattransfersystem etablieren.

Es existieren vierzehn Isoformen der Monocarboxylat-Transporter, welche alle von der SLC16 Genfamilie kodiert werden. Die Monocarboxylate, welche von MCT1 und MCT4 Protonen-abhängig über die Zellmembran transportiert werden, sind Pyruvat, Ketonkörper und L-Laktat (Halestrap et al. 2013). Laktat ist das Abbauprodukt der anaeroben Glykolyse, welches, wenn es akkumuliert, den intrazellulären pH-Wert senkt und konsekutiv zu einem Funktionsverlust von Proteinen führt. Daher ist ein transmembraner Export von Laktat eine fundamentale Überlebensstrategie aller hypoxischen Zellen (Halestrap und Meredith 2004). Demgegenüber stehen Zellen, welche unter aeroben Bedingungen Laktat aufnehmen und dieses in der oxidativen Phosphorylierung unter Energiegewinn abbauen. Da es in Tumoren häufig zu ungleichmäßiger Versorgung mit Sauerstoff und zu lokalisierter Laktatanhäufung kommt, spielen hier die Transporter MCT1 und MCT4 eine bedeutende Rolle, da sie tumorigene Stoffwechselprozesse (siehe 1.3.5) aufrechterhalten können (Dhup et al. 2012).

Im Zusammenhang mit dem Laktattransfersystem ist die Expression von MCT1 und MCT4 jeweils spezifisch für den Zelltyp und die -funktion. Dabei weist MCT4 zwar eine niedrige Affinität für Laktat auf, schleust jedoch bevorzugt Laktat vor anderen Metaboliten aus der Zelle aus und wird vorrangig von hypoxischen Zellen exprimiert (Dimmer et al. 2000; Halestrap und Meredith 2004). Im Gegensatz dazu, vermag MCT1 aufgrund der hohen Affinität das extrazelluläre Laktat eher in die Zelle einzuschleusen und wird physiologischerweise von Zellen der Leber, Nieren, Herz und Muskel zur Glukoneogenese bzw. Energiebereitstellung aufgenommen (Lee und Yoon 2015, Sonveaux et al. 2008; Halestrap und Meredith 2004). Es existieren aber auch andere

Meinungen, die besagen, dass MCT1 bidirektional agiert und Laktat sowohl ein- als auch ausschleusen kann (Pinheiro et al. 2014). Folglich kann bei reziproker Expression von MCT1 und MCT4 in benachbarten Zellen ein gerichteter Laktatfluss von einer hoch glykolytisch aktiven Zelle in eine gering glykolytisch aktive Zelle zustande kommen. Physiologisch sind solche Bedingungen im ZNS, wobei Astrozyten als Quelle für das von den Neuronen über das MCT1 aufgenommene Laktat dienen (Pellerin et al. 1998). Auch im Muskelgewebe findet ein Laktataustausch von den schnell zu den langsam zuckenden Fasern statt, welche das Laktat über das MCT1 inkorporieren (McCullagh et al. 1996; Mengual et al. 2003). Ausgehend davon, können Interaktionen zwischen Tumor- und Stromazellen als eine Reminiszenz physiologischer Energietransfervorgänge angesehen werden. Dementsprechend sind Tumoren, welche einen reversen Warburg-Metabolismus betreiben, gekennzeichnet durch eine hohe Expression von MCT1 in den Tumorzellen und eine hohe Expression von MCT4 in den umgebenden Zellen des desmoplastischen Stromas (Fiaschi et al. 2012; Nakajima und van Houten 2013).

Kürzliche Untersuchungen zeigen, dass eine auf die MCTs (allen voran auf MCT1) abzielende Störung des Laktattransfers in Tumoren eine neue aussichtsreiche Therapiestrategie darstellt (Polański et al. 2014). Das CD147, auch bekannt als Basigin, ist ein Glykoprotein der Zellmembran von Epithelien, welches für die Lokalisierung von MCT1 und MCT4 in der Zellmembran zuständig und für ihre Transportfunktion unentbehrlich ist (Wilson et al. 2005; Kirk et al. 2000). Auch die therapeutische Interferenz mit CD147 vermag die MCTs in ihrer Funktionsweise einzuschränken und Malignitätskriterien wie Proliferation, Invasivität und Metastasierung abzumildern und wurde mehrfach als potentielle Therapiestrategie vorgeschlagen (Huang et al. 2015).

1.5 Ziel der Arbeit

Am Beispiel der entzündlichen Karzinogenese des Darmes soll im vorliegenden Projekt eine diesbezügliche Rolle von Nrf2 bei der Tumorentstehung näher untersucht werden. Hierbei steht die Modulation des Stoffwechsels und die metabolische Kompartimentierung infolge einer deregulierten Nrf2-Aktivität im Mittelpunkt des Interesses.

Die Arbeiten umfassten hierzu auf Zellkultur basierte Untersuchungen zur Rolle von Nrf2 bei der metabolischen Reprogrammierung (v. a. mittels Expressionsanalysen zu

Schlüsselenzymen der Glykolyse und des PPP) und der metabolischen Kompartimentierung (Expressionsanalyse von Laktattransportern MCT1 und MCT4) sowie Metabolitenmessungen in prämaligen und malignen Kolonepithelzellen. Im Zusammenhang mit der metabolischen Kompartimentierung sollte auch untersucht werden, wie sich ein proinflammatorisches *microenvironment* auf prämalige Kolonepithelzellen auswirkt. Hierzu sollten Kokultur-Versuche mit ROS-produzierenden Makrophagen (*in vitro*-generierte M1-Makrophagen) unternommen werden. Weiterhin sollten die Auswirkungen der Nrf2-Aktivität auf das Wachstums- und Apoptoseverhalten untersucht werden.

Einen wesentlichen Bestandteil des Projektes sollten zudem immunhistochemische Analysen von Patientengewebe darstellen. Anhand von Paraffingewebe aus Resektaten und Biopsaten von Kolitis- (CED) und KRK-Patienten sollen die in den *in vitro*-Experimenten erbrachten Befunde gezielt validiert werden.

Aus den zu erwartenden Ergebnissen sollten sich sowohl neue Parameter für eine frühzeitigere Diagnose und bessere Prognosestellung bei Risikopatienten für das KRK ergeben, als auch verbesserte Therapieoptionen.

2 Material und Methoden

Wenn nicht anders angegeben, sind Prozentangaben als *weight per volume* dargestellt.

2.1 Geräte

Analysewaage CP124S-OCE	Sartorius, Göttingen
Autoklav Tuttnauer	Systemec, Wettengel
Brutschrank BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Blotkammer Semi-Dry Electroblotter A	Ancos, Dänemark
Chemilumineszenzvideodokumentationssystem	
ChemiDoc-XRS™	Bio-Rad, München
Durchflusszytometer FACS-Verse	BD, Franklin Lakes, USA
Eismaschine ZBE150	Ziegra, Hannover
Elektrophoresekammer XCell SureLock	Invitrogen, USA
Elektrophoresenetztteil P25	Biometra, Göttingen
Fireboy plus	Integra Biosciences, Konstanz
Gefrierschrank, -80°C, KM-DU73Y1E	Panasonic, Japan
Gefrierschrank, -20°C, Premium NoFrost	Liebherr, Biberach an der Riss
Kühlschrank Profi Line	Liebherr, Biberach an der Riss
Kipptisch WT17	Biometra, Göttingen
Laborwaage, PT1200	Sartorius, Göttingen
Liquid Scintillation Counter, Beckman LS-6500	Beckman Coulter, Krefeld
Magnetrührer Ikamag RCT Ika	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Microplate Luminometer LB96V	Berthold Technologies, Bad Wildbad

Microprocessor pH537	WTW, Weilheim
Mikroskop, Axioplan 2 Imaging	Zeiss, Zaventem, Belgien
Minishaker MS1	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Zaventem, Belgien
Mikrowelle de luxe M686	Miele, Gütersloh
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Nano Drop Spectrophotometer 10-1000	peqLab Biotechnology, Erlangen
Papierschneidegerät	Dahle, Lingen
pH-Meter Microprocessor pH537	WTW, Weilheim
Photometer Opsys MR	Dynex Technologies, USA
Pipetboy	Integra, Fernwald
Pipetten Pipetman classic	Gilson, Limburg
Pipette Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Plate Illuminator Piko	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Real-Time PCR System PicoReal 96	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Reinstwassersystem Labostar	Siemens, Berlin
Rollenmischer roller mixer SRT6D	VWR, Darmstadt
Schüttler MTS2	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Sonicator Sonopuls	Bandelin, Berlin
Spectrophotometer Nano Drop 1000	PeqLab Biotechnology, Erlangen
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
Tecan Infinite-m200	Tecan Group, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Vakuumpumpe Laboport	KNF, Freiburg

Vortexer VF2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wärmeschrank B 6060	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad Precision	Labcare, USA
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Varifuge 20RS	Heraeus Sepatech, Osterode
Zentrifuge 400R function line	Heraeus Instruments, Hanau
XFp Extracellular Flux Analyzer	Seahorse Bioscience, USA

2.2 Chemikalien

Alle nicht angegebenen Chemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen Merck, Darmstadt oder Sigma-Aldrich, München bezogen.

Acrylamidlösung Rothiphorese Gel 40	Roth, Karlsruhe
AEC Peroxidase Substrat Kit	DakoCytomation
6-Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich Chemie, München
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Antigen-Retrieval	Eigenherstellung
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Bisbenzimid H 33258 (Hoechst)	Calbiochem, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Biomol, Hamburg
BSA Fraktion V	Biomol, Hamburg
¹⁴ C-L-Laktat	Hartmann Scientif., Braunschweig
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega, Mannheim

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie, München
DcFdA	Life Technologies, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie, München
DTT	Biomol, Hamburg
Dulbecco´s Modified Eagle Medium	Biochrom KG, Berlin
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie, München
Effectene™ Reagenz	Qiagen, Hilden
EnVision+ System-HRP anti-mouse	Dako Diagnostika, Hamburg
EnVision+ System-HRP anti-rabbit	Dako Diagnostika, Hamburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
FluorSave™ Reagent	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycin	Merck, Darmstadt
GM-CSF	RELIATech, Wolfenbüttel
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, München
HiperFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
H ₂ O ₂	Roth, Karlsruhe
IQ Sybr Green Supermix	Bio-Rad, München
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kristallviolettlösung	Sigma-Aldrich Chemie, München
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
LumiGlo Lösung	Cell Signaling, Frankfurt am Main
McCoy´s 5A modified Medium	Biochrom, Berlin
M-CSF	RELIATech, Wolfenbüttel
Methanol 100 %	Merck, Darmstadt
Meyers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt

MgCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie, München
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MitoSOX	Life Technologies, Darmstadt
MTS-Farbstoff	
[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium, Phenazinmetholsulfat (PES)	Promega, Mannheim
M3: BaseF TM	IncCell Corporation, USA
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker, Niederlande
Natriumpyruvat	PAA, Pasching, Österreich
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin
PCR Auftragspuffer (5x)	Qiagen, Hilden
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
PeqGOLD TOTAL RNA Kit	Peqlab, Erlangen
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich Chemie, München
Phosphatase Inhibitor Cocktail 3	Sigma-Aldrich Chemie, München
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie, München
Propranolol	Merck, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie, München
Protein Assay	Bio-Rad, München
Proteinbestimmungsassay Dc	Bio-Rad, München
Proteinmarker PageRuler TM	Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkription Reagenzien	Promega, Heidelberg
Rinderhypophysenextrakt	Life Technologies, Darmstadt
RNase	Qiagen, Hilden
RPMI Medium 1640	Biochrom KG, Berlin

Salzsäure, 37 %	Roth, Karlsruhe
SDS	Biomol, Hamburg
SFN	Sigma-Aldrich Chemie, München
SuperSignal Substrate	Thermo Scientific, Waltham, USA
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL, Eggenstein
tBHQ	Sigma-Aldrich Chemie, München
Temed	Roth, Karlsruhe
TGF- β 1	BioLegend, Fell
Tris Base	Biomol, Hamburg
Trypsin / EDTA solution	Biochrom KG, Berlin
Trypsin / EDTA solution (x10)	Biochrom KG, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, München
XF Glycolysis Stress Test Kit	Seahorse Bioscience, USA
XF Cell Mito Stress Test Kit	Seahorse Bioscience, USA
Xylol	Merck, Darmstadt

2.3 Verbrauchsmaterialien

96 Well PCR Platten	Corning, Amsterdam, Niederlande
96 Well Platten, weiß ummantelt	Falcon über BD Biosciences, Hamburg
Combitips advanced® 1ml/2,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser 18 mm	Glaswarenfabrik Hecht, Sondheim
FACS Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, München
Mikrotestplatte 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht
Multitips steril 12,5 ml	Th. Geyer GmbH & Co. KG,

	Hamburg
Parafilm	Bemis, USA
Pasteurpipetten ISO 7712	Schleicher & Schuell, München
Pipettenspitzen 10 µl/200 µl/1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Ritips 12,5 ml Ritter	GmbH, Schwabmünchen
Röhre 15ml/50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Roti®-PVDF, Porengröße 0,45 µm	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipette 5 ml/10 ml/25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Transwells ThinCert™ 0,4 µm transparent	Greiner bio-one, Belgium
Objektträger Menzel-Gläser	Thermo Scientific, Waltham, USA
VueLife Teflon Beutel	Süd-Laborbedarf, Gauting
Wattestäbchen	Noba Verbandmittel Danz GmbH, Wetter
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten 12 Well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten 6 Well	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
XF [®] 96 FluxPak	Seahorse Bioscience, USA

2.4 Antikörper

Tabelle 1: In der Deckglasfärbung verwendete Antikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-mouse (H+L) Zweitantikörper IgG Alexa Fluor® 488	Esel	Thermo Fisher Scientific, USA
Anti-rabbit (H+L) Zweitantikörper IgG Alexa Fluor® 488	Esel	Thermo Fisher Scientific, USA
Anti-mouse Zweitantikörper IgG Alexa Fluor® 594	Ziege	Thermo Fisher Scientific, USA
MCT1	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
MCT4	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Tabelle 2: In der Immunhistochemie verwendete Primärantikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.

Antikörper	Spezies	Hersteller
Isotypenkontrolle IgG 1	Maus	Chemicon, Limburg
Isotypenkontrolle Ig polyklonal	Kaninchen	Abcam, UK
MCT1	Kaninchen	Affinity/Biomol
MCT4	Kaninchen	Affinity/Biomol
p-Nrf2	Kaninchen	Abcam, UK
CD68	Maus	Biolegends

Tabelle 3: In der Immunhistochemie verwendete Sekundärantikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.

Antikörper	Hersteller
EnVision-Konjugat anti-Kaninchen-Peroxidase	DakoCytomation, Hamburg

Tabelle 4: In der Immunfluoreszenzfärbung verwendete Antikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.

Antikörper	Spezies	Hersteller
Cy3-konjugierter anti-rabbit-Antikörper	Ziege	Abcam, UK
Anti-mouse (H+L) Zweitantikörper IgG Alexa Fluor® 488	Esel	Thermo Fisher Scientific, USA

Tabelle 5: Im Westernblot verwendete Primärantikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.

Antikörper	Spezies	Hersteller
G6PD	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
GLUT1	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
HSP90	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
LDHB	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Lamin AC	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
MCT1	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
MCT4	Maus, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Nrf2	Kaninchen	Abcam, UK

NQO1	Maus	Cell Signalling, Frankfurt a. M.
PARP1	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
PKM2	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Transaldolase	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Transketolase	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Tubulin	Maus	Sigma Aldrich Chemie, München

Tabelle 6: Im Westernblot verwendete Sekundärantikörper mit jeweiliger Angabe der tierischen Spezies und des Herstellers.

Antikörper	Hersteller
Anti Maus IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signalling, Frankfurt a. M.
Anti Kaninchen IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signalling, Frankfurt a. M.

2.5 Primer

Tabelle 7: In der *real-time* PCR verwendete Primer mit jeweiliger Angabe der Vorwärts- und Rückwärtsbasensequenz und des Herstellers.

Primer	Vorwärts- und Rückwärtsbasensequenz	Hersteller
GCLC	5'- AGTTGAGGCCAACATGCGAA - 3' 5'- TGAAGCGAGGGTGCTTGTTT - 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
βActin2	5'- CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT - 3' 5'- AGCACTGTGTTGGCGTACAG - 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
IL1b	5'- AGTGCTCCTTCCAGGACCTGGA - 3' 5'- CACTCTCCAGCTGTAGAGTGG - 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg

IL6	5'- TTCTCCACAAGCGCCTTCGGT - 3' 5'- GTCTCCTTTCTCAGGGCTGAG - 3'	Biometra, Göttingen
IL-10	5'- CGCCTTGATGTCTGGGTCTT - 3' 5'- AGAACAGCTGCACCCACTTC - 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
IL-12a	5'- TTATGATGGCCCTGTGGCCTTAG - 3' 5'- AGGAAGCATTTCAGATAGCTCATC - 3'	Biometra, Göttingen
MCT1	5'- TCCAGCTCTGACCATGATTG - 3' 5'- GCCCCCAAGAATTAGAAAGC - 3'	RealTimePrimers, Elkins Park, USA
MCT4	5'- CTCGTGGTCTTCTGCATCTT - 3' 5'- AAAATCAGGGAGGAGGTGAG - 3'	RealTimePrimers, Elkins Park, USA
NQO1	5'- AAATCCTGGAAGGATGGAAG - 3' 5'- TTGTCAGTTGGGATGGACTT - 3'	RealTimePrimers, Elkins Park, USA
PFKFB2	5'- TGCAGTGGGTCTAAATGGAT - 3' 5'- TTCTCATGAAAGGAGGCAAG - 3'	RealTimePrimers, Elkins Park, USA
PKM2	5'- AGAAGATCAACGCCTCACTG - 3' 5'- AAAGGAAGCTGTCACCCTCT - 3'	RealTimePrimers, Elkins Park, USA
TATA Box Binding Protein	5'- TATAATCCCAAGCGGTTTGC - 3' 5'- GCTGGAAAACCCAACTTCTG - 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
TGFβ1	5'- CGTGGAGCTGTACCAGAAATA - 3' 5'- TCCGGTGACATCAAAAGATAA - 3'	RealTimePrimers, Elkins Park, USA

2.6 siRNAs

Tabelle 8: Für den Gen-Knockdown verwendete siRNAs mit jeweiliger Angabe der Bestell-Nr. und des Herstellers.

siRNA	Bestell-Nr.	Hersteller
negativ Kontroll siRNA	1027280	Qiagen, Hilden
MCT1	S103246404	Qiagen, Hilden
MCT4	S100720440	Qiagen, Hilden
G6PD	S100008855	Qiagen, Hilden

2.7 Plasmide

Tabelle 9: Als Vektoren eingesetzte Plasmide mit jeweiliger Angabe des Herstellers.

Plasmid	Hersteller
Kontrollplasmid	Eigenherstellung
MCT1	Eigenherstellung
MCT4	Eigenherstellung

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Zelllinien

Tabelle 10: Die verwendeten Zelllinien mit der jeweiligen Angabe des Verteibers.

Zelllinie	Vertreiber
NCM460	InCell Corp.

HCT15: Best.-Nr. CCL-225	American Type Culture Collection (ATCC) über LGC Standards (Wesel)
SW403: Best.-Nr. ACC-294 HT29: Best.-Nr. ACC-299	Leibnitz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

Die Authentizität von NCM460 und HCT15 Zellen wurde überprüft mittels des *STR-profiling*s des DSMZ⁴.

2.8.2 Kulturmedien

Tabelle 11: Die verwendeten Zelllinien mit ihren jeweiligen Medien.

Zelllinie	Medium
HCT15	RPMI supplementiert mit 1 % L-Glutamin (200 mM), 10 % FCS; Glukose-freies Medium ⁵
HT29	McCoy's 5A modified Medium, supplementiert mit 1 % L-Glutamin (200 mM), 10 % FCS
NCM460	M3: BaseF TM , supplementiert mit 10 % FCS; Experimente in RPMI supplementiert mit 1 % L-Glutamin (200 mM), 10 % FCS; Glukose-freies Medium
SW403	DMEM, supplementiert mit 1 % L-Glutamin (200 mM), 10 % FCS

2.8.3 Zellkultur

Alle im Folgenden beschriebenen zellbiologischen Arbeiten wurden unter der Sterilwerkbank mit autoklaviertem oder desinfiziertem Material und sterilfiltrierten Lösungen vorgenommen.

⁴ DSMZ, unter: www.dsmz.de/services/services-human-and-animal-cell-lines/online-str-analysis.html (abgerufen am 12.09.2017)

⁵ Medium enthält normalerweise 2 g/L Glukose

In FCS, versetzt mit 10 % DMSO, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Um eine Kultur anzusetzen, wurden Aliquots bei 37 °C aufgetaut und schrittweise mit dem jeweiligen Kulturmedium gemischt. Daraufhin wurden die Zellen 5 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesogen, das Pellet in 12 ml Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche gegeben.

Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % Luftfeuchtigkeit bis zu einer Konfluenz von 80-100 % kultiviert und zwei- bis dreimal wöchentlich geteilt. Zu diesem Zweck wurde das verbrauchte Medium aus der Flasche abgesaugt und 5 ml 1 x Trypsin-EDTA hineingegeben. Binnen einer Inkubationszeit von 5-15 min lösten sich die Zellen ab, dies wurde durch lockeres Klopfen gegen die Flasche verstärkt und der Erfolg unter dem Lichtmikroskop überprüft. Um die Reaktion mittels FCS zu stoppen, wurden 5 ml Medium hinzugefügt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in frischem Medium resuspendiert und für Versuche in 6 bzw. 12 Well Platten ausgesät oder für die weitere Kultur in eine neue Flasche gegeben.

2.8.4 Indirekte Kokultur

In vitro Generierung von M1- und M2-Makrophagen

Mit dem Ziel, das entzündliche stromale Mikromilieu von (prä-)malignen Enterozyten zu simulieren, wurden humane Primärzellen aufbereitet. Am Forschungszentrum Borstel wurden 15×10^6 Monozyten (95 % Reinheitsgrad) aus dem Blut gesunder Spender mittels Elutriation isoliert. Im Folgenden wurden diese PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) entweder mit 50 ng/ml GM-CSF (Polarisation zu M1-Makrophagen) oder mit 50 ng/ml M-CSF (Polarisation zu M2-Makrophagen) stimuliert und sieben Tage in RPMI, versetzt mit 1 % L-Glutamin, 10 % FCS und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin in Teflonbeschichteten VueLife FEP Beuteln kultiviert, welche die Adhäsion der Zellen unterbinden und somit deren endgültige Differenzierung fördern. Mittels Kühlung der Beutel für 1 h auf Eis wurden die Makrophagen abgelöst und anschließend in eiskaltem PBS resuspendiert. Die morphologische Differenzierung zu M1- bzw. M2-Makrophagen wurde mittels Durchflusszytometrie und qPCR bestätigt. Charakteristisch für M1-Makrophagen ist die Expression von IL-12a und HLA-DR, während für M2-Makrophagen die Expression von CD163 und IL-10 typisch

ist (Helm et al. 2014a). Die generierten M1- und M2-Makrophagen wurden in unser Labor überführt.

Prinzip

Zellen der Linie A wurden in Transwells ausgesät, die auf ihrem Boden eine Membran mit Poren von 0,4 µm Durchmesser aufweisen, sodass lösliche Moleküle sie passieren können. Im Anschluss wurden die Transwells in die bereits von der Zelllinie B besiedelten Wells von 12 Well Platten eingesetzt. Folglich standen die Medien beider Kompartimente in Verbindung zueinander und die Auswirkungen der ausgetauschten Stoffwechselprodukte und Signalmoleküle konnten im Anschluss untersucht werden.

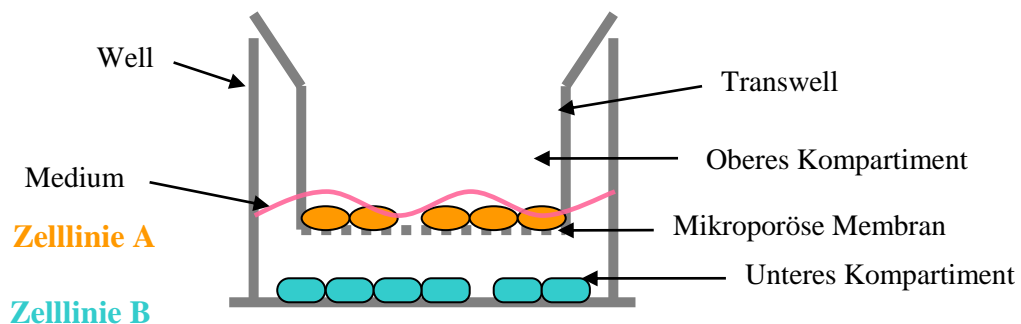


Abbildung 3: Modell indirekte Kokultur.

Um Austrocknungen vorzubeugen, wurde in jedes Well 1 ml des Mediums pipettiert. Nach 24 h wurde für alle Zellen ein Mediumwechsel vorgenommen und die Transwells mit der Zelllinie A auf die Wells mit der Zelllinie B gesetzt, bzw. zur Kontrolle auf Wells, die lediglich Medium enthielten. Dementsprechend wurden in Wells mit Linie B Transwells ohne Zellen aber mit Medium eingehängt. Aufrecht erhalten wurde die Kokultur für 24 (48, 72, 120) h.

Indirekte Kokultur von NCM460 Zellen mit M1- oder M2-Makrophagen

Zur Kokultivierung der NCM460 Zellen mit entweder M1- oder M2-Makrophagen wurden 3×10^4 (in 3.3.1, 3.5.1 und 3.5.2) bzw. 1×10^5 (in 3.3.2, 3.3.3 und 3.6.1) NCM460 Zellen in 1 ml des entsprechenden Versuchsmediums je 12 Well ausgesät. Zeitgleich wurde je Transwell 1 ml RPMI, versetzt mit 10 % FCS und 1 % Glutamin mit 3×10^5 (in 3.3.1, 3.5.1 und 3.5.2) bzw. 5×10^5 (in 3.3.2, 3.3.3 und 3.6.1) M1-Makrophagen oder 5×10^5 M2-Makrophagen ausgesät und die Transwells auf eine 12

Well Platte gesetzt. Dieses initiale Verhältnis von Makrophagen zu NCM460 Zellen berücksichtigt die NCM460 Zellverdopplungszeit und wurde gewählt, um während der Kokultur annähernd gleiche Zellzahlen zu erreichen.

Indirekte Kokultur von HCT15 Zellen mit HCT15 Zellen

Zur Kokultivierung von HCT15 Zellen, wurden 1×10^5 Zellen je Well entweder *mock*- oder Nrf2-transfiziert und in 12 Well Platten inkubiert, 24 h später gefolgt von einer Behandlung mit siRNA. Über Nacht wurden diese inkubiert und nach einem Mediumwechsel wurden Transwells mit 5×10^4 HCT15 Zellen je Well eingesetzt, welche MCT4 überexprimierten oder nicht. Die indirekte Kokultur erfolgte für 24 h.

2.8.5 Stimulation

Zur Stimulation der Zellen wurden $50 \mu\text{M}$ tBHQ oder $20 \mu\text{M}$ SFN eingesetzt.

2.8.6 Transfektion von Zellen

Transfektion mit siRNA

Mit der Absicht, die Expression von Genen für MCT1, MCT4 oder G6PD gezielt zu unterbinden, wurden die Zellen mit der jeweils spezifischen oder der Kontroll siRNA transfiziert.

Dies erfolgte in 12 Well Platten. Pro Well wurden $50 \mu\text{l}$ des auf 37°C aufgewärmten OptiMEM mit $0,6 \mu\text{l}$ siRNA und $6 \mu\text{l}$ HiperFect Transfektionsreagenz vermischt. Nach 10 min Inkubationszeit bei RT und einem Mediumwechsel mit 1 ml pro Well wurden $53 \mu\text{l}$ des Ansatzes tröpfchenweise auf jedes Well gegeben. Bis zur weiteren Bearbeitung der Zellen in Abhängigkeit der Fragestellung wurde die Zellkultur für mindestens 24 h weitergeführt.

Transfektion mit Plasmid-DNA

Um die grundlegende Expression von MCT1 oder MCT4 zu erhöhen, wurden die Zellen mit der jeweiligen Plasmid-DNA oder mit dem Kontrollplasmid transfiziert. Für die Durchführung in 12 Well Platten wurde zunächst ein Mediumwechsel mit $750 \mu\text{l}$ des entsprechenden Mediums je Well vorgenommen. Danach wurden pro Well $50 \mu\text{l}$ EC-Puffer, $0,4 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA und $3,2 \mu\text{l}$ Enhancer miteinander vermischt und für 5 min bei RT inkubiert (entsprechend den Herstellerangaben, Qiagen). Als Nächstes wurden

8 µl Effecten™ Reagenz pro Well hinzugefügt, der Ansatz vermischt und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden pro Well 300 µl Medium dem Reaktionsansatz zugesetzt und davon 350 µl auf jedes Well tröpfchenweise verteilt. Nach einer Kultivierung von 8-10 h wurde das Medium erneut gewechselt.

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten

Nachdem die Zellen wie in Kapitel 2.8.3 beschrieben in Platten ausgesät und entsprechend der Versuchsfragestellung kultiviert und stimuliert worden sind, sollten die Proteinexpressionsmuster untersucht werden. Um dafür die Gesamtzelllysate zu gewinnen, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und – je nach Zelldichte – mit 50-300 µl 2 x Lämmli Puffer pro Well versetzt. Die Zellen eines Wells wurden mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein Reagiergefäß überführt, worin sie zur Homogenisierung mit 3 Zyklen in 3 Sekunden mittels des Sonificators geschallt wurden. Im Folgenden konnten die Lysate bei -20 °C gelagert werden bzw. zur Proteinkonzentrationsbestimmung weiterverarbeitet werden (siehe 2.9.2).

2 x Lämmli Puffer: 128 mM Tris Base
 4,6 % SDS
 10 % (v/v) Glycerol
 ad 1000 ml *Aqua* bidest.
 pH 7,6

2.9.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde mittels Proteinassay D_C der Firma Bio-Rad nach Herstellerangabe ermittelt. Hierzu wurden je 5 µl der Proben in Doppelwerten auf 96 Well Mikrottest Platten pipettiert und die Reagenzien dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Konzentration mit dem Photometer Opsys MR (Dytec Technologies) sowie der Revelation QuickLink Software ausgewertet. Zur Ermittlung der Eichkurve diente die geometrische Verdünnungsreihe aus einem Proteinstandard und Lämmli-Puffer (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 0).

2.9.3 Einstellung des Proteingehaltes

4 x Farbpuffer: 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol
 in 2 x Lämmli-Puffer

Nach Ermittlung der Proteinkonzentration wurden die Proben mittels Lämmli-Puffer in separaten Reagiergefäßen auf eine einheitliche Konzentration eingestellt. Der hinzugefügte 4 x Farbpuffer stellte $\frac{1}{4}$ des Endvolumens dar und diente der Linearisierung und Anfärbung der Proteine für die weitere Verwendung in der Gelelektrophorese. Im Thermomixer wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und geschüttelt, daraufhin auf Eis abgekühlt.

2.9.4 Herstellung von Kernextrakten

Kernproteine wurden für die Expressionsanalysen im Westernblot benötigt und wurden wie im Folgenden beschrieben isoliert:

Es wurden pro 6 Well 4-7 x 10⁵ Zellen in 2 ml ausgesät und wie in Kapitel 2.8.3 kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit eiskaltem PBS gespült und mit 200 μ l EMSA-I-Puffer pro Well versetzt. Um eine höhere Ausbeute des Kernextraktes zu erzielen, wurden pro Ansatz 2-3 Wells ausgesät und die Zellen nach dem Abkratzen mit einem Zellschaber in ein gemeinsames Reagiergefäß zusammengetan. Nach 5 min Zentrifugation bei 3500 rpm wurde der Überstand (= Cytosol-Fraktion) bei -20 °C für Westernblot aufbewahrt oder verworfen. Das Pellet wurde mit 500 μ l EMSA-I-Puffer ohne Zusätze⁶ gewaschen, zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Daraufhin wurde das Pellet in 50-100 μ l EMSA-II-Puffer resuspendiert und die Kernproteine unter Schütteln für 30 min bei 4 °C extrahiert. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min wurde der Überstand (= Kernextrakt) abgenommen und bei -80 °C gelagert. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei einer Temperatur von 4 °C.

EMSA-I-Puffer:

10 mM	HEPES pH 7,9
10 mM	KCL

⁶ DTT, PMSF und Aprotinin wurden stets frisch zugesetzt.

0,2 mM	EDTA
1 mM	DTT
0,5 mM	PMSF
10 µg/ml	Aprotinin

EMSA-II-Puffer:

20 mM	HEPES pH 7,9
0,4 M	NaCl
0,2 mM	EDTA
1 mM	DTT
0,5 mM	PMSF
10 µg/ml	Aprotinin

2.9.5 Konzentrationsbestimmung und Einstellung des Kernproteingehaltes

Die Konzentrationsbestimmung des Kernproteingehaltes erfolgte wie unter 2.9.2 beschrieben mit dem Unterschied, dass zur Ermittlung der Eichkurve eine arithmetische Verdünnungsreihe (1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0 µg/µl) aus BSA und EMSA-II-Puffer ohne Zusätze und das Protein Assay als Reagenz verwendet wurde.

Für den einheitlichen Konzentrationsgehalt wurden die Proben mittels EMSA-II-Puffer in separaten Reagiergefäßen eingestellt. Im Thermomixer wurden die Proben für fünf min bei 95 °C erhitzt und geschüttelt, daraufhin auf Eis abgekühlt.

2.9.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die spezifischen Proteinexpressionsmuster in den Ganzzell- und Kernlysaten sowohl qualitativ als auch quantitativ nachzuweisen, wurden die Proteingemische in der Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

Hierzu wurde zunächst das Polyacrylamid-Gel gegossen. Zwischen zwei mit Abstandhaltern abgedichteten Glasplatten wurde das zuvor angesetzte 12,5 % Trenngel gefüllt und ein Luftblasen-freier Meniskus mit einigen Tropfen Iso-Propanolol erzielt. Nach etwa 1 h war das Trenngel vollständig polymerisiert und das Sammelgel mit dem Probenkamm wurde als obere Schicht gegossen und erneut trocknen gelassen.

Anschließend wurde das Polyacrylamid-Gel in der Blotkammer positioniert, die Kammer mit 1 x SDS-Laufpuffer befüllt und die eingestellten Proben (gemäß 2.9.3 und 2.9.5) in die durch den Probenkamm entstandenen Taschen pipettiert. Mindestens eine Tasche wurde stets mit dem PageRuler als farbig kennzeichnenden Größenstandard für die Proteine beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter Anlage einer elektrischen Spannung bei maximal 45 mA. Die negativ geladenen Proteine migrierten dabei unterschiedlich weit und schnell durch die Maschen des Gels. Je kleiner ein Protein war, desto schneller ist es zur Anode gewandert. Im Folgenden wurden die Proteine mittels Blotkammer auf eine Membran übertragen (siehe 2.9.7).

12,5 % Trenngel: 5,4 ml *Aqua dest.*

3 ml Trenngelpuffer pH 8,8

3,6 ml 40 % PAA

44 µl 10 % APS

8,8 µl Temed

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris

0,4 % SDS

pH-Wert mit HCl auf 8,8 eingestellt

Sammelgel: 1575 µl *Aqua dest.*

625 µl Sammelgelpuffer pH 6,8

250 µl 40 % PAA

13 µl 10 % APS

2,5 µl Temed

Sammelgelpuffer: 1,5 M Tris

0,4 % SDS

pH-Wert mit HCl auf 6,8 eingestellt

2.9.7 Western-Blotting

Proteintransfer

Für den immunhistochemischen Nachweis der Proteine, wurden diese vom Polyacrylamid-Gel mittels Elektrotransfer im Semidry-Blot-System auf eine PVDF-Membran überführt.

Zuvor wurde die Membran (6,5 cm x 9 cm) für 1 min in 100 % Methanol gelegt und danach mit *Aqua dest.* gespült. 6 Whatman-Papierblätter desselben Formats wurden in Blot-Puffer A und 3 Blätter in Blot-Puffer B getränkt und dann übereinander geschichtet. Auf diesen Stapel wurde die PVDF-Membran gelegt und mit dem SDS-Gel bedeckt. Obenauf wurden 6 in Blot-Puffer C getränkte Blätter platziert und der Transfer in der Blotkammer bei 70 mV über 1 h durchgeführt.

Da das elektrische Feld senkrecht zur Membran gerichtet ist, wandern die Proteine in Richtung Anode und haften dabei auf der Membran. Somit sind sie nun anderen Methoden zugänglich.

1 x TBS :	20 mM Tris-Base
	140 mM NaCl
	pH 7,6
TBS-Tween:	100 ml 10 x TBS
	500 µl Tween-20
	<i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
Blot-Puffer A:	300 mM Tris-Base
	20 % (v/v) Methanol
	pH 11
Blot-Puffer B:	25 mM Tris-Base
	20 % (v/v) Methanol
	pH 10,6
Blot-Puffer C:	25 mM Tris-Base
	20 % (v/v) Methanol
	0,04 M Aminocaprinsäure
	pH 10,6

Proteindetektion

Bei der Immundetektion der Proteine werden zuerst die Primärantikörper benutzt, welche an ihre Zielproteine binden. Im nächsten Schritt kommen dann die Sekundärantikörper zum Einsatz, welche an die Primärantikörper binden und an ein Enzym gekoppelt sind, welches bei einer Substratreaktion die messbare Chemilumineszenz generiert.

Hierzu wurde das an den Proteinen angelagerte SDS mit TBS-T auf einem Schüttler für 5 min ausgewaschen und die Membran für 1 h in 5 % Magermilch in TBS-T gespült, um unspezifische AK-Bindungsstellen zu blockieren. Im Folgenden wurde der jeweilige Primärantikörper nach Herstellerangabe in 5 % Magermilch in TBS-T verdünnt und mit der Membran in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde über Nacht bei 4 °C auf einem Kipptisch gelagert.

Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal je 10 min in TBS-T gewaschen und für 1 h analog der ersten Inkubation in ein Röhrchen mit der Zweitantikörperlösung (in 5 % Magermilch in TBS-T) gegeben, welche bei RT einwirkte. Bei dem Zweitantikörper handelte es sich um einen Horseradish-Peroxidase (HRP) -gekoppelten Antikörper. Es folgte erneut dreimal das Waschen der Membran mit TBS-T für je 10 min, um nicht gebundene AK zu beseitigen.

Die Entwicklung des Blots wurde mit SuperSignal Substrat oder LumiGlo Chemiluminescent Substrate durchgeführt, welches Luminol als Substrat für das HRP beinhaltet. Die Lichtreaktion an der Stelle der AK-Antigen-Komplexe wurde mittels ChemiDoc-XRSTM mit der Quantity One Software® von Bio-Rad gemessen und in Form von Banden detektiert. Die Intensität des Lichtsignals gab Auskunft über die Menge des in der Probe enthaltenen Proteins. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des SDS-Gels wurde auf jeder Membran das *housekeeping* Gen Hsp90⁷, Lamin A⁸ oder Tubulin⁹ detektiert.

⁷ HSP90 ist ein ubiquitäres Chaperon, das eines der am häufigsten vorkommenden Zellproteine und ein etablierter Marker für die Ladekontrolle im Westernblot ist (Ali et al. 2006.)

⁸ Lamin A gehört zu den Typ-V-Intermediärfilamenten und ist über eine Vielzahl von membrangebundenen Proteinen in der inneren Zellkernmembran verankert, ist daher ein gebräuchlicher Marker für Zellkernmaterial (Dorner et al. 2007).

⁹ Tubuline sind Proteine, welche im Zytosol von eukaryotischen Zellen vorkommen und Hauptbestandteil der Mikrotubuli sind. Tubulin ist demnach ein gängiger Marker zur Ladekontrolle im Westernblot (Findeisen et al. 2014).

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 RNA-Isolierung

Zum Zwecke der Analyse von zellulärer RNA wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.8.3 bzw. 2.8.4 beschrieben, ausgesät und kultiviert. Um die Ausbeute der RNA zu erhöhen, wurden die Zellen mindestens zweier Wells identisch behandelt und bei der späteren Aufarbeitung in einem Probenröhrchen zusammengeführt. Die RNA-Isolierung wurde mit dem peqGOLD Total RNA Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst das Medium aus den Wells abgesaugt und diese mit je 1 ml PBS gewaschen. Nach der Isolierung der mRNA in 40 µl RNase-freiem Wasser wurde die RNA-Konzentration in 2 µl einer Probe mit Hilfe des Nano Drop Spectrophotometers 10-1000 bestimmt. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C eingefroren.

2.10.2 Herstellung von cDNA (reverse Transkription)

Für die Durchführung der *real-time* PCR musste die gewonnene RNA nun mit der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben werden.

Für die reverse Transkription wurden die Reagenzien von Promega verwendet und alle folgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Nach der Messung der Probenkonzentration wurden die Proben auf 0,5 µg RNA je Probe eingestellt. Das benötigte Probenvolumen wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 11,5 µl aufgefüllt. Dazu wurde 1 µl Oligo-dT-Primer gegeben. Die Proben wurden im Folgenden 5 min bei 65 °C im Thermoblock schüttelnd inkubiert, auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert. Dann wurden 4 µl 5 x Reaktion Buffer, 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl), 2 µl dNTP Mix (10 mM) und 1 µl RevertAid M-MLV Reverse Transcriptase dazugegeben, die Proben gemischt und erneut kurz anzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Proben 60 min bei 42 °C und abschließend 5 min bei 70 °C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.10.3 Real-Time PCR

Zum Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen wurde die *real-time* PCR als Methode der Wahl bedient, welche mithilfe von Fluoreszenzmessung eine quantitative Aussage über den DNA-Gehalt ermöglicht.

Auf Eis wurde die hergestellte cDNA 1:5 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und die angesetzten Mastermixe auf einer 96 Well PCR-Platte vorgelegt. Auf ein Well kamen 10 µl des Mastermixes und 2 µl der cDNA, es wurden stets Doppelwerte pipettiert. Zum Schluss wurde die Platte mit einer selbstklebenden PCR-Folie verschlossen und für 15 Sekunden bei 1.200 rpm zentrifugiert. Die Messung erfolgte im *real-time* PCR System PicoReal 96 unter Verwendung der PikoReal-2.1 Software. Zur Kontrolle des äquivalenten cDNA-Gehaltes der Proben wurde das *housekeeping* Gene TBP oder β-Actin detektiert.

Mastermix je Probe (RealTimePrimers):

6 µl SYBR Green Mix
1 µl Primer-Mix (2 µM)
3 µl *Aqua* dest.

Mastermix je Probe (Eurofins Genomics, Biometra):

6 µl SYBR Green Mix
0,04 µl Foreward Primer (100 µM)
0,04 µl Reverse Primer
3,92 µl *Aqua* dest.

2.11 Analytische Methoden

2.11.1 Caspaseassay

Prinzip

Die Messung der Apoptose-Aktivität wurde mittels Caspase-Glo® 3/7 Assay durchgeführt. Mittels Lumineszenzmessung wurde hierbei die Caspase-3,-7-Aktivität ermittelt. Das Caspase-Substrat führt zur Zelllysis und wird nachfolgend gespalten, was zur Freisetzung von Aminoluciferin führt, welches von der Luciferase verbraucht wird. Dadurch wird ein Lumineszenz-Signal generiert, welches proportional zur Höhe der Caspase-3,-7-Aktivität ist.

Durchführung

Zur Durchführung des Caspaseassays wurde der Zellüberstand der behandelten Zellen abgenommen und in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 1 ml pro Well trypsinisiert. Die auf diese Weise aus der Kulturplatte gelösten Zellen wurden dann zu dem zugehörigen Zellüberstand gegeben und die gesamte Zellsuspension wurde 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Pellets in 1 ml PBS resuspendiert, die Proben in 1,5 ml Reagiergefäße pipettiert und erneut 5 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. Wiederholt wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl PBS aufgenommen. Dann wurden jeweils 25 µl der Zellsuspension als Doppelwerte mit 25 µl Caspase-Substrat in eine weißwandige 96 Well Platte pipettiert und 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Auswertung der Caspaseaktivität fand mittels Microplate Luminometer LB96V statt.

Im Anschluss ließ sich aus der Zellsuspension Gesamtzelllysate herstellen, um durch die Proteingehaltsbestimmung Referenzwerte für die Auswertung der Apoptoseaktivität sicherzustellen. Hierzu wurde, nach dem Herunterzentrifugieren der verbliebenen Zellsuspension, der Überstand abgenommen und das Pellet in ca. 100 µl 2 x Lämmli-Puffer aufgenommen und wie in Kapitel 2.9.1 weiterverarbeitet.

2.11.2 MTS Assay zur Bestimmung der Zellviabilität

Durchführung

Zuerst wurden HCT15^{BW} (*bottom well*) Zellen entsprechend des Versuchsprotokolls vorbehandelt und einer Kokultur mit HCT15^{TW} (*trans well*) Zellen für 24 h zugeführt. Im Anschluss wurden 125 µl des MTS-Farbstoffes (CellTiter96 proliferation-assay, Promega) zu 1 ml Medium pro Well hinzugefügt und die Inkubation bei 37 °C für unterschiedliche Zeitspannen fortgeführt. Dann wurden von jeder Probe 200 µl dreifach im Tecan Infinite-m200 Microplate Reader bei 490 nm vermessen. Die Hintergrundabsorption (MTS-Farbstoff ohne Zellen) wurde von jeder Probe subtrahiert.

MTS-Farbstoff: [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium (MTS)
Phenazinmethosulfat (PES)

Prinzip

MTS ([3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium) ist eine gelbe, lösliche Verbindung, welche durch mitochondriale

Succinatdehydrogenasen in lebenden Zellen zu einem magentafarbenen Formazansalz umgesetzt wird. Dabei ist die Menge an gebildetem Farbstoff proportional zur Zellviabilität.

2.12 Immunhistochemische Färbung

Die Verwendung der nachfolgend genannten Gewebe erfolgte mit Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel (Az: A526/14 und A443/09).

Konsequente 3 µm dünne Schnitte von formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem kolorektalem Gewebe von 20 Patienten mit KRK (UICC Stadium III/IV) oder von 10 Patienten mit CED wurden zunächst deparaffinisiert mittels Xylol und einem Bad in einer absteigenden Alkoholreihe sowie *Aqua dest.* Endogene Peroxidasen wurden mit Einsatz von 0,3 % H₂O₂ ausgeschaltet. Anschließend wurde die Freilegung von Antigenen unter der Verwendung von Antigen-Retrieval in Tris-EDTA Puffer (pH 9.0) für 20 min auf Sub-Siedetemperatur durchgeführt, gefolgt von 1 h Waschen in 4 % BSA/PBS, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nachfolgend wurden entweder konventionelle Färbungen oder Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

2.12.1 Konventionelle Immunhistochemie

Es erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper gegen aktiviertes Nrf2, CD68, MCT1 und MCT4 im Verhältnis 1:200 (P-Nrf2) oder 1:100 (CD68, MCT1, MCT4) in 1% BSA/PBS.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer wurden die Präparate dreimal in PBS gewaschen und dann für 1 h bei RT in einer Feuchtkammer mit dem Sekundärantikörper EnVision-Konjugat anti-Kaninchen-Peroxidase inkubiert. Im Anschluss daran folgten drei Waschschritte mit PBS. Die Substratreaktion erfolgte mit dem AEC Peroxidase Substrat Kit nach Herstellerangaben für 15 min bei RT. Danach wurden die Präparate mit Wasser gewaschen, die Zellkerne für 1 min in 50 % Meyers Hämalaunlösung angefärbt, für 10 min gewässert und abschließend in Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Das gleiche Protokoll wurde für die Negativkontrollen angewandt, wobei ein IgG-Kontroll-Antikörper verwendet wurde. Die gefärbten Gewebsschnitte wurden unter 200-facher Vergrößerung mit dem Axioplan 2 Imaging Mikroskop ausgewertet.

2.12.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die doppelte Immunfluoreszenzfärbung wurde wie schon in 2.12.1 beschrieben mit P-Nrf2- und MCT1-Antikörpern durchgeführt. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte mit einem Cy3-konjugierten *anti-rabbit*-Antikörper bzw. *anti-mouse*-IgG Alexa Fluor® 488 inkubiert. Vor der Beurteilung unter 400- und 630-facher Vergrößerung wurden die Kerne mit DAPI gegengefärbt.

2.13 Immunzytochemie

2.13.1 Immunfluoreszenzfärbung auf Deckgläsern

Zur Darstellung von MCT1 und MCT4 in Zellen der Linien HT29 und SW403 wurde die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt.

Zellen wurden auf in 12 Well Platten platzierten Deckgläsern ausgesät, nach 24 h entsprechend des Versuchsaufbaus behandelt und nach Erreichen einer Konfluenz von etwa 50 % angefärbt.

Im Detail wurden die Deckgläser auf ein Metallgestell geladen und in einem Plastikbehälter mit 1 x PBS gewaschen, für 15 min in -10 °C kaltem Methanol 100 % auf Eis fixiert und wiederholt in 1 x PBS gewaschen. Unspezifische Proteinbindungen mit den Primärantikörpern wurden unterbunden, indem jedes Deckglas in 200 µl 4 % BSA in PBS in einer Feuchtkammer für 30 min bei RT blockiert wurde. Nach einem weiteren Waschschrift in 1 x PBS, wurden die Deckgläser auf je 100 µl Primärantikörperlösung bzw. auf 1 % BSA in PBS als Negativkontrolle platziert und für 1 h bei RT inkubiert. Die MCT1- und MCT4-Antikörper wurden hierfür im Verhältnis 1:100 in 1 % BSA in PBS verdünnt. Des Weiteren wurden die Deckgläser im Plastikbehälter 3 x 5 min in 1 x PBS gewaschen. Als Zweitantikörper wurden die fluoreszenzmarkierten *anti-mouse*-IgG Alexa Fluor® 488, *anti-rabbit*-IgG Alexa Fluor® 488 bzw. *anti-mouse*-IgG Alexa Fluor® 594 jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 in 1 % BSA in PBS angesetzt und Bisbenzimid H 33258 (Hoechst) als Kernfarbstoff im Verhältnis 1:400 hinzugefügt. Die Inkubation der Deckgläser erfolgte wieder mit je 100 µl der Lösung für 1 h bei RT in der Feuchtkammer. Nach erneutem dreimaligem Waschen in 1 x PBS und kurzem Eintauchen in *Aqua* dest., wurden die Deckgläser mithilfe von FluorSave™ Reagent auf beschriftete Objektträger eingedeckt und im Folgenden bei 4 °C in Dunkelheit gelagert.

Die Bilder wurden mit dem Mikroskop Axioplan 2 Imaging aufgenommen und mit der Axiovert 2.7. Software verarbeitet.

2.14 Metabolische Analysen

2.14.1 Extrazelluläre Fluss-Analyse

Prinzip

Mithilfe des XFp Extracellular Flux Analyzers ließen sich die beiden wichtigsten energieliefernden Stoffwechselprozesse der Zelle – die Glykolyse und die mitochondrielle Atmung – messen. Eine steigende Sauerstoffverbrauchsrate (*Oxygen consumption rate*; OCR) zeigte dabei die mit der oxidativen Phosphorylierung einhergehende Reduktion von O₂ zu H₂O, während die Azidifizierungsrate (*Extracellular acidification rate*; ECAR) ein Indikator für die glykolytische Aktivität, einhergehend mit Bildung von Laktat und H⁺-Ionen, darstellte. Die Messung erfolgte noninvasiv, simultan und repetitiv ermittelbar.

Durchführung

Zur Durchführung des Mito Stress Assays mit dem XF Cell Mito Stress Test Kit wurden zunächst 8 x 10³ NCM460 Zellen je XF24 Well in Mikroplatten ausgesät und für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 85 % Luftfeuchtigkeit anwachsen gelassen. Als Nächstes wurden sie für 18 h mit 50 µM tBHQ inkubiert und danach wurde das Versuchsmedium gegen das XF Base Medium des Kits ausgewechselt. Vor der Messung wurde die Mikroplatte für 1 h in einem CO₂-freien Inkubator bei 37 °C gelagert während die *cartridge* mit den Reagenzien beladen wurde. Nach einer Messung der basalen OCR und ECAR, wurde während der Analyse Oligomycin, FCCP (*Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone*) und Antimycin A mit Rotenon zu festgelegten Zeitpunkten hinzugefügt.

Zur Durchführung des Glycolysis Stress Assays mit dem XF Glycolysis Stress Test Kit wurde wie schon bei dem Mito Stress Assay beschrieben verfahren. Lediglich mit anderen Reagenzien wurde die *cartridge* beladen. Während der Messung wurden Glukose (10 mM), Oligomycin (1 µM) und 2-Deoxy-glucose (50 mM) nach und nach hinzugefügt.

Aus drei gleich behandelten Wells wurde dabei mithilfe von der Stress test Reporter Generator Software stets der Mittelwert berechnet. Außerdem wurden im Anschluss

Zelllysate hergestellt, um die enthaltene Proteinmenge in den Wells zu bestimmen und die ECAR und OCR dementsprechend zu normalisieren.

2.14.2 ¹⁴C-Laktat-Aufnahme Assay

Durchführung

Zur Messung der zellulären Laktataufnahme, wurden $1-2 \times 10^4$ NCM460 bzw. HCT15 Zellen in 1 ml Glukose-freiem Medium je 12 Well ausgesät. Des Weiteren wurde das Medium ersetzt durch den Aufnahme-Puffer, versetzt mit dem unmarkierten Laktat oder 2 μ Ci (0.5 μ M) radioaktiv markiertem ¹⁴C-L-Laktat. Im Anschluss wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und zu Gesamtzelllysaten verarbeitet, wobei pro Well 500 μ l Aufnahme-Puffer mit 2 % SDS verwendet wurden.

Aufnahme-Puffer: 10 mM Hepes/pH 7.50
 5 mM KCL
 100 mM NaCl,
 1 mM MgCl₂

Die gewonnenen Gesamtzelllysate aus der Kultur mit dem markiertem ¹⁴C-L-Laktat wurden der Analyse mittels des Liquid Scintillation Counter (Beckman LS-6500) zugeführt, ein auf Szintillation basierendes Messgerät zur Bestimmung der Energie und der Intensität von ionisierender Strahlung.

Prinzip

Das Prinzip dieser Messmethode besteht darin, dass die Elektronen, welche beim Zerfall von radioaktivem ¹⁴C-L-Laktat als ionisierende β -Strahlung emittiert werden, auf einen Szintillator treffen, welcher dadurch dazu angeregt wird, Photonen in entsprechendem Maße zu generieren. Die emittierten Photonen werden durch einen Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches schlussendlich gemessen wird. Von der Höhe des Stromimpulses können dann Rückschlüsse auf die Laktatmenge in den Gesamtzelllysaten gezogen werden.

Parallel dazu wurden die Gesamtzelllysate aus der Kultur mit dem unmarkierten Laktat auf ihre Proteinmenge mittels Proteinassay untersucht. Folglich wurde der gemessene Stromimpuls (dreifache Messung) auf die Proteinkonzentration bezogen.

2.14.3 Glukose-Aufnahme Assay

Durchführung

Zur Messung der zellulären Glukosaufnahme wurden NCM460 und HCT15 Zellen auf 12 bzw. 6 Well Platten ausgesät und entweder mit tBHQ behandelt oder mit einer Kontrollplasmid- bzw. einer Nrf2 Plasmid-DNA transfiziert.

Nach Inkubation der Zellen wurden diese einer Aufarbeitung mit einem kommerziellen, auf Chemilumineszenz-basierten Glukose-Aufnahme Assay (*Glucose Uptake Glo*, Promega) zugeführt. Die mittels Luminometer ermittelten Lumineszenzintensitäten (korrespondierend zur Glukose-Aufnahme) wurden gegen den parallel quantifizierten Proteingehalt normalisiert. Durchgeführt wurde der Assay in Dreifachbestimmung.

Prinzip

Das Prinzip dieser Messmethode beruht auf der Aufnahme des Glukoseanalogons 2-Desoxyglukose (2-DG). Dieses wird analog der Glukose durch die GLUT-Proteine aufgenommen und anschliessend zu 2-DG-6-P phosphoryliert, jedoch dann nicht weiter glykolytisch umgewandelt. Nach Denaturierung des zellulären Proteins und des NADPH wird in einer enzymatischen Reaktion anschliessend durch Zusatz von G6PDH das 2-DG-6-P zu 6-Phosphodeoxygluconat oxidiert. Das hierbei generierte NADPH dient dann der reduktiven Umwandlung von ProLuciferin in Luciferin. Letzteres wird dann unter Erzeugung eines Lichtsignals von einer Luciferase umgewandelt.

2.15 Berechnungen, Statistiken, Graphik und Ausarbeitung

Die Berechnungen der Mittelwerte, der Standardabweichungen und Signifikanzen sowie die graphischen Darstellungen wurden mit Microsoft Excel 2010 und Powerpoint 2010 (Microsoft, München) erstellt. Die Bearbeitung des digitalisierten Bildmaterials wurde mit Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) durchgeführt. Die Ausarbeitung der Dissertation erfolgte mit Word 2003 (Microsoft, München). Zur Beurteilung der Signifikanzen wurde der doppelseitige Student's t-Test angewandt und bei einem p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von MCT1 und MCT4 in menschlichem Darmgewebe in Abhängigkeit von einer Nrf2-Aktivierung

3.1.1 Reziproke MCT1- und MCT4-Expression in den Epithel- und Stroma-Kompartimenten des menschlichen KRK-Gewebes in Verbindung mit aktiviertem Nrf2

Mittels Immunhistochemie wurde zunächst die histoanatomische Verteilung von aktiviertem Nrf2 (P-Nrf2), MCT1 und MCT4 in Paraffinschnitten von kolorektalem Tumorgewebe untersucht.

Wie in Abbildung 4 zu erkennen, zeigen KRK-Zellen eine Kolokalisation von nukleärer Expression des aktivierten (phosphorylierten) Nrf2 und einer ausgeprägten MCT1-Expression an der Oberfläche epithelialer Strukturen. Dies war sowohl in der konventionellen Färbung (Abbildung 4 A) als auch in einer Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 4 B) deutlich auszumachen. Diese Kolokalisation war bereits sehr deutlich in G1 und G2 Tumoren festzustellen.

Die Expression von MCT4 wurde im Gegensatz dazu hauptsächlich in den desmoplastischen Stromazellen gefunden. Darüber hinaus war der konventionellen Färbung (Abbildung 4 A) zu entnehmen, dass epitheliale Bereiche mit geringer oder fehlender P-Nrf2-Expression nur eine grenzwertige MCT1-Färbung aufwiesen, wohingegen diese Areale positiv hinsichtlich einer MCT4-Expression waren (Abbildung 4 A).

Die gezeigten Ergebnisse einer reziproken Verteilung von MCT1 und MCT4 deuten somit auf die Existenz einer metabolischen Kompartimentierung und des reversen Warburg-Effektes im KRK hin, verbunden mit einer verstärkten Nrf2-Aktivierung im MCT1 exprimierenden, epithelialen Kompartiment.

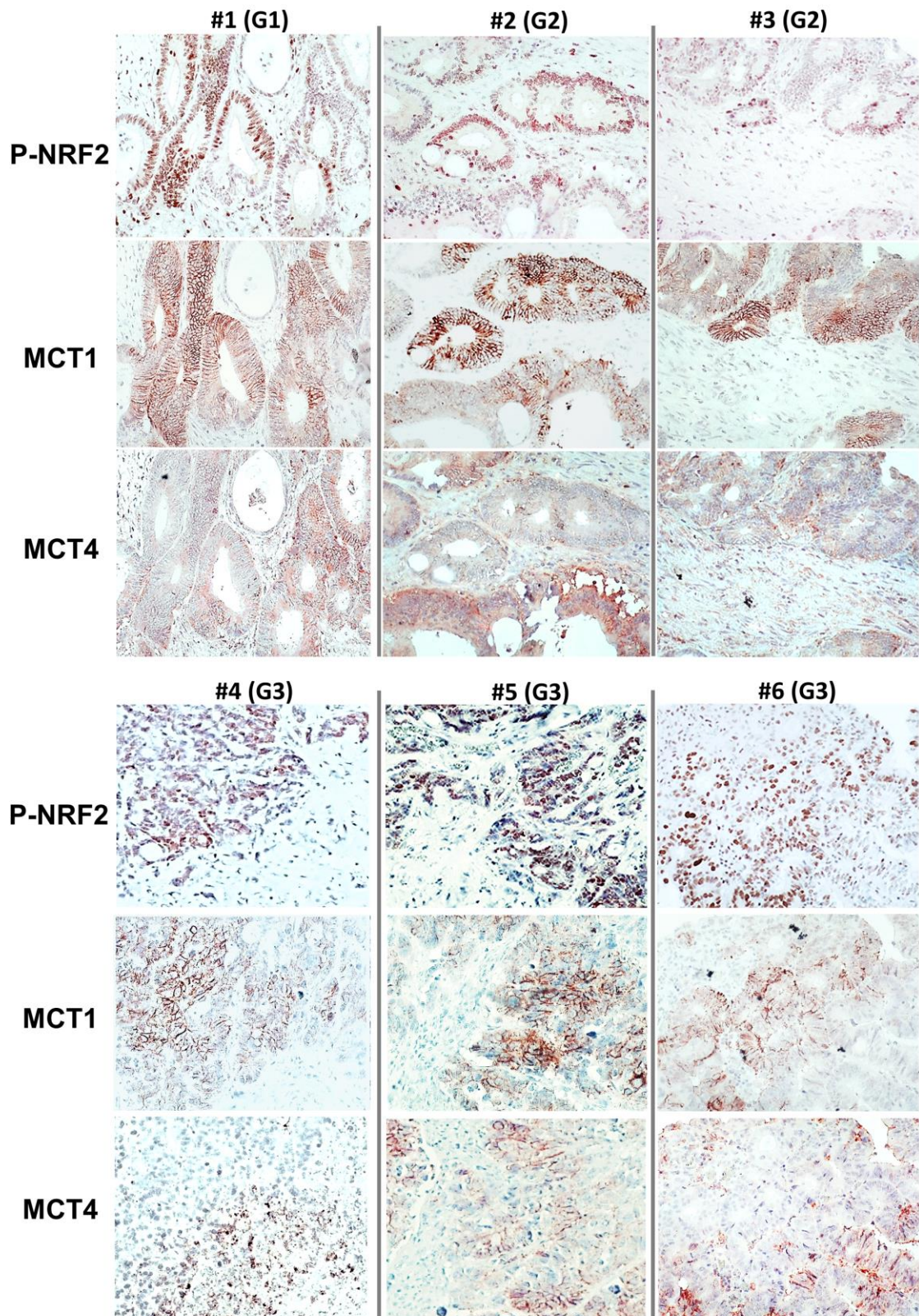


Abbildung 4: A) Reziproke Expression von MCT1 und MCT4 in KRK ist abhängig von P-Nrf2. Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von Primärtumoren (Stadium III/IV, IUCC) von KRK-Patienten wurden einer konventionellen immunhistochemischen Färbung für MCT1, MCT4 oder aktiviertes Nrf2 (Phospho-Ser40-Nrf2) unterzogen. Die Abbildungen (200-fache Vergrößerung) von 6 aus 20 Fällen sind dargestellt; G1-G3: Grading 1-3.

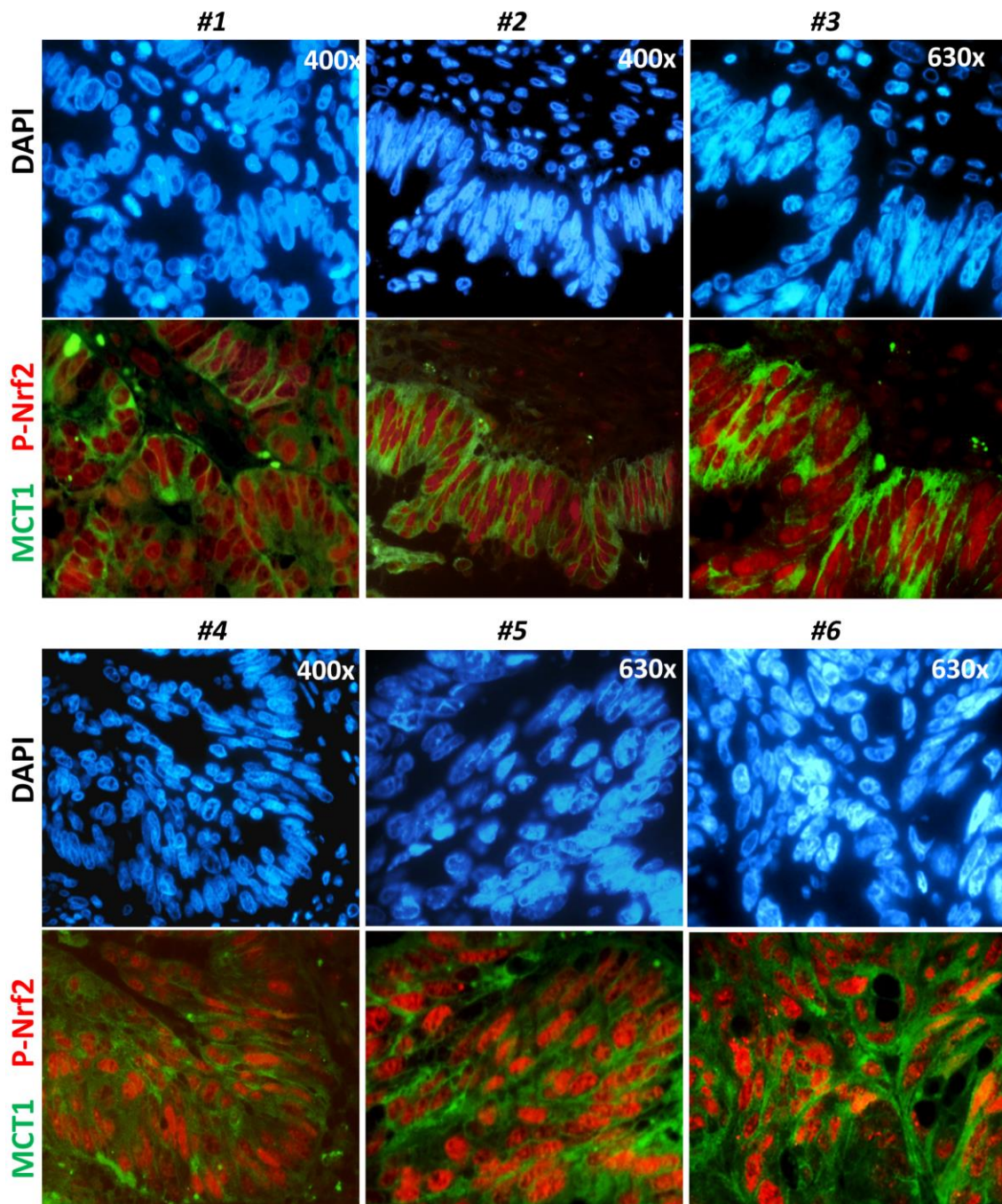


Abbildung 4: B) Reziproke Expression von MCT1 und MCT4 in KRK ist abhängig von P-Nrf2. Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von Primärtumoren (Stadium III/IV, IUCC) von KRK-Patienten wurden einer doppelten Immunfluoreszenzfärbung für MCT1 und aktiviertes Nrf2 (Phospo-Ser40-Nrf2) unterzogen. Die Abbildungen von 6 Fällen von KRK sind in 400-facher oder 630-facher Vergrößerung dargestellt, MCT1 in grün, P-Nrf2 in rot und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI.

3.1.2 Epitheliale MCT1- und stromale MCT4-Expression in Geweben von CED-Patienten

Da es im Zuge der chronischen Entzündung bei CED im intestinalen Epithel zu einer Aktivierung von Nrf2 kommt, kann dessen Persistenz und Deregulation zur Förderung

der Karzinogenese führen. Als Nächstes wurde daher die histoanatomische Verteilung von P-Nrf2, MCT1 und MCT4 in Biopsieproben von Patienten mit CED (Kruse et al. 2016) untersucht. P-Nrf2 war wiederum im Zellkern des Kryptenepithels nachweisbar, begleitet von einer epithelialen MCT1-Expression auf der Zelloberfläche. Demgegenüber zeigte sich eine MCT4 Expression vornehmlich im umgebenden Stroma, v.a. der *Lamina propria*. Interessanterweise enthielt diese viele CD68-positive Makrophagen¹⁰ (Abbildung 5). Somit konnte der immunhistochemische Nachweis geführt werden, dass sich eine metabolische Kompartimentierung und ein reverser Warburg-Effekt bereits frühzeitig während einer chronischen Entzündung ausbildet und Wegbereiter der Karzinogene sein kann.

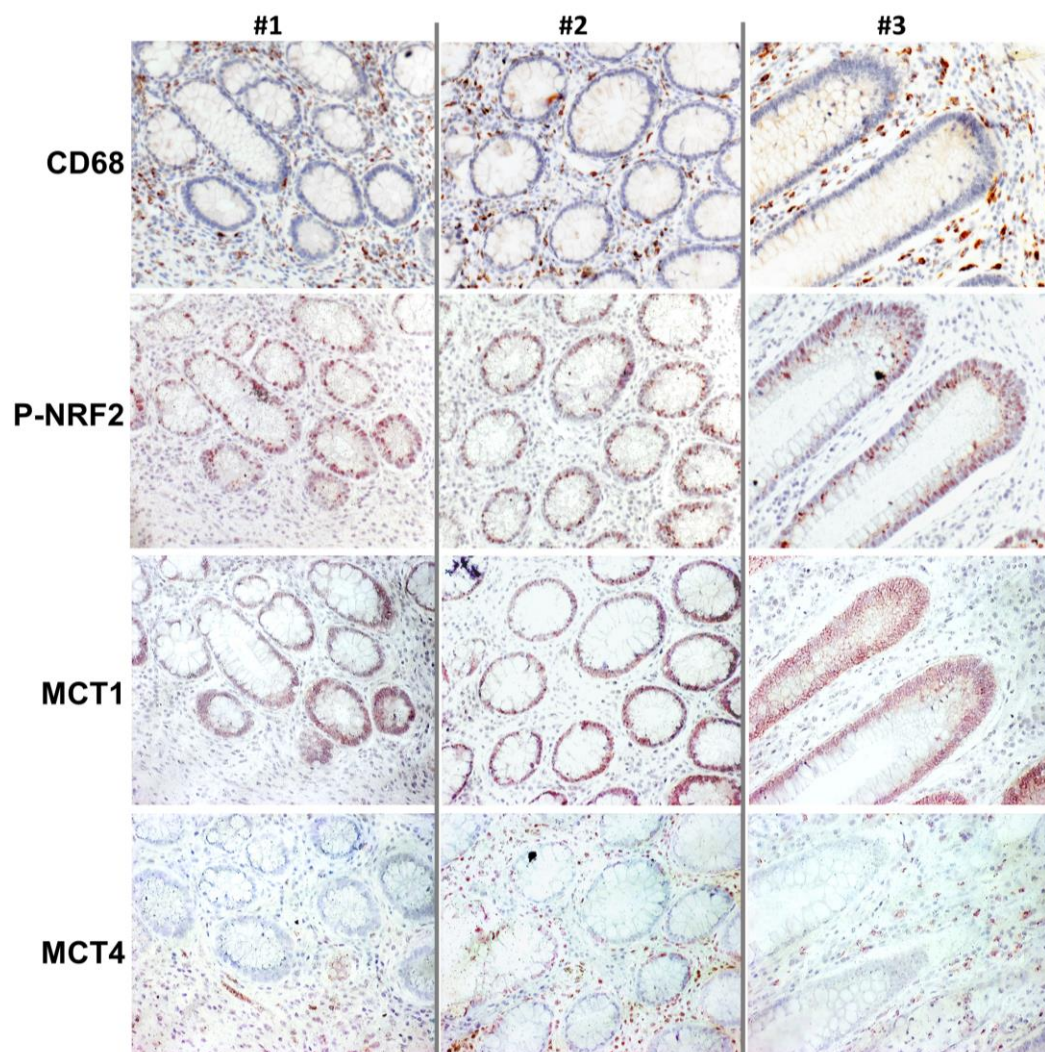


Abbildung 5: Reziproke Expression von MCT1 und MCT4 in CED ist abhängig von P-Nrf2. Formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von Biopsien aus CED-Patienten wurden immunhistochemisch auf MCT1, MCT4, P-Nrf2 und CD68 untersucht. Die Abbildungen von 3 aus 10 Fällen sind in einer 200-fachen Vergrößerung dargestellt.

¹⁰ CD68 ist ein etablierter immunhistochemischer Marker für Makrophagen und andere mononukleäre Phagozyten (Chistiakov et al. 2017).

3.2 Aktivierung von Nrf2-abhängigen Zellantworten in prämaligen und malignen humanen Kolonepithelzellen

Zunächst war das Ziel, zu validieren, dass die Expression bestimmter Enzyme der Glykolyse und des PPP in der prämaligen humanen Kolonepithelzelllinie NCM460 und in ausgesuchten Kolonkarzinomzelllinien durch die Aktivität von Nrf2 beeinflusst wird. Darüber hinaus sollte an diesen Zellen insbesondere untersucht werden, ob die Expression der Transporter MCT1 und MCT4 auch unter der Einwirkung von Nrf2 steht. Dabei war sowohl die Expression auf der mRNA- als auch auf Proteinebene von Interesse.

Hierfür wurden Zellen der Linie NCM460 mit 50 μM tBHQ stimuliert. Nach einem unterschiedlichen Behandlungszeitraum (0, 6, 24, 48 h) wurde die mRNA der Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der *real-time* PCR semiquantitativ analysiert (Abbildung 6). Der ermittelte Gehalt an mRNA der Zielgene wurde auf den mRNA-Gehalt des *housekeeping* Gens hTBP normiert.

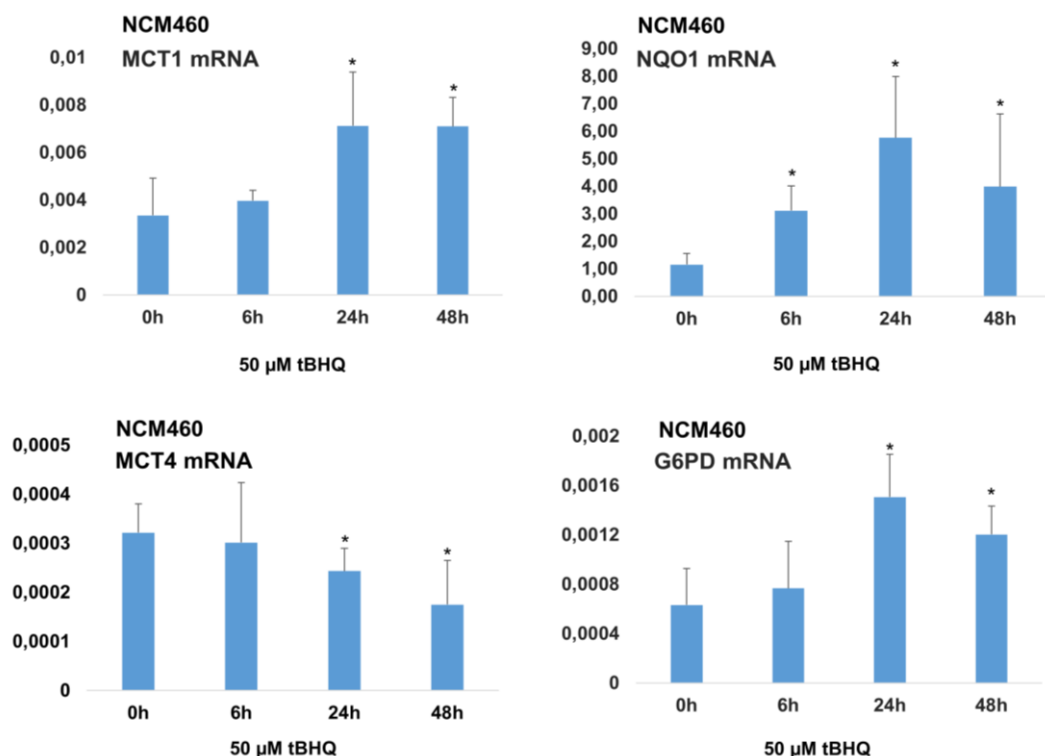


Abbildung 6: Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen. *Real-time* PCR zur semiquantitativen Bestimmung der MCT1, MCT4, G6PD und NQO1 mRNA in NCM460 Zellen unter Behandlung mit dem Nrf2-Aktivator tBHQ (50 μM) über verschiedene Zeiten (h). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, statistische Signifikanz ($p < 0,05$; t-Test, MS-Excel) ist mit einem * gekennzeichnet.

In den NCM460 Zellen zeigte sich nach der Stimulation mit tBHQ eine zeitlich abhängige, starke Induktion der Genexpression von G6PD (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase)¹¹. Nach 24 h Behandlung war die stärkste Hochregulierung erkennbar, welche nach 48 h etwas abnahm. Auch MCT1 wurde nach 24 h moderat induziert und die Heraufregulation war auch noch nach 48 h Behandlung zu beobachten. MCT4 wurde im zeitlichen Verlauf gleichmäßig leicht herabreguliert, wobei dieser Effekt nach 48 h am deutlichsten zu erkennen war.

Um die Aktivierung von Nrf2 durch tBHQ zu belegen, wurde die mRNA-Expression von NQO1 gemessen. In der Tat konnte aufgrund der starken und zeitabhängigen Hochregulation von NQO1 die vermehrte Aktivität von Nrf2 bestätigt werden. Letztlich lassen die gezeigten Ergebnisse die Annahme zu, dass Nrf2 in der Lage ist, die Expression der mRNA für G6PD und MCT1 durch eine zeitlich abhängige Aktivität heraufzuregulieren, während MCT4 leicht herabreguliert wird.

Als Nächstes war es das Ziel, zu ergründen, ob sich die oben beschriebenen Befunde auch auf Proteinebene widerspiegeln. Hierfür wurden die NCM460 Zellen erneut für unterschiedliche Zeitspannen (24, 48, 72 h) mit tBHQ behandelt und danach als Gesamtzelllysate aufgearbeitet, um einer Analyse im Westernblot zugänglich zu werden. Untersucht wurde die Proteinexpression von G6PD, MCT1, MCT4, NQO1, LDHB¹², TKT¹³ und TALDO1¹⁴. Hsp90 diente als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung.

Wie der Abbildung 7 zu entnehmen ist, zeigte sich die schon auf mRNA-Ebene beobachtete Induktion von MCT1 durch tBHQ im Westernblot nach 48 h wesentlich wirkungsvoller und bestand auch noch nach 72 h Behandlung. G6PD wurde, im Einklang mit der qPCR, nach 24 h stark induziert, wobei dieser Effekt im zeitlichen

¹¹ G6PD ist ein Enzym aus der Gruppe der Oxidoreduktasen und bewerkstelligt die Umwandlung von Glukose-6-Phosphat in 6-Phosphogluconolaktol im Rahmen des Pentosephosphatweges. Außerdem wird bei dieser chemischen Reaktion NADP⁺ zu NADPH umgewandelt. In der oxidativen Phase des Pentosephosphatweges kommt es sowohl zur Regenerierung von Pentosen für die Nucleotid- und Nucleinsäuresynthese sowie von NADPH, welches bspw. zur Regeneration der Glutathionreduktase dient (Ham et al. 2013). Die Glutathionreduktase spielt eine zentrale Rolle bei der Regeneration von Glutathion (über Glutathion S-Transferase), dem Antioxidans einer Zelle.

¹² LDHB ist die B-Untereinheit (auch als H-Untereinheit bekannt) vom Enzym LDH, welches die reversible Umwandlung von Laktat zu Pyruvat katalysiert (Ding et al. 2017). Eine Isoform des LDHs, die LDH1, besteht aus 4 Untereinheiten von LDHB, wobei LDH5 aus 4 Untereinheiten LDHA besteht. Die Reaktion von Pyruvat zu Laktat wird bevorzugt von LDHA umgesetzt und die entgegengesetzte endergone Reaktion, von LDHB. Somit deutet eine hohe Expression von LDHB auf eine Regeneration von Pyruvat unter aeroben Bedingungen hin (Schueren et al. 2014).

¹³ TKT ist ein Enzym des Pentosephosphatweges und überträgt eine Ketolgruppe von Xylulose-5-Phosphat auf ein Aldol, meist Ribose-5-Phosphat.

¹⁴ TALDO1 ist das Enzym im Pentosephosphatweg, welches die Übertragung eines C3-Körpers von Sedoheptulose-7-Phosphat auf D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat und umgekehrt ermöglicht und wie TKT zur Bildung von Ribose-5-Phosphat beiträgt.

Verlauf nur marginal abnahm. Die Expression von LDHB nahm deutlich zu und erreichte nach 48 und 72 h ihr Maximum. Eine leichte Zunahme der Expression zeigte auch TKT mit unterschwelliger zeitlicher Komponente. TALDO1 wurde moderat induziert, am stärksten nach 48 h. MCT4 zeigte ähnlich der mRNA eine leichte Abnahme in der Proteinexpression, welche nach 72 h Behandlung eindeutig vermindert war. NQO1 wurde augenfällig in zeitlicher Abhängigkeit heraufreguliert, was wieder die erhöhte Aktivität von Nrf2 belegte. Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die im Westernblot gezeigten Ergebnisse für die NCM460 Zellen vereinbar sind mit denen in der *real-time* PCR.

Anschließend sollte die Nrf2-Abhängigkeit des Effektes von tBHQ nachgewiesen werden. Hierfür wurden die NCM460 Zellen mit Nrf2 siRNA oder Kontroll siRNA transfiziert und für 24 h mit tBHQ oder ohne behandelt. Wie in Abbildung 7 B) zu erkennen ist, war die Induktion von TALDO1, TKT, NQO1, G6PD, LDHB und MCT1 durch tBHQ deutlich vermindert, nachdem die NCM460 Zellen einen *knockdown* von Nrf2 erfahren hatten. Ebenfalls die durch tBHQ herbeigeführte Abnahme der Expression von MCT4 war in Anwesenheit der Nrf2 siRNA aufgehoben.

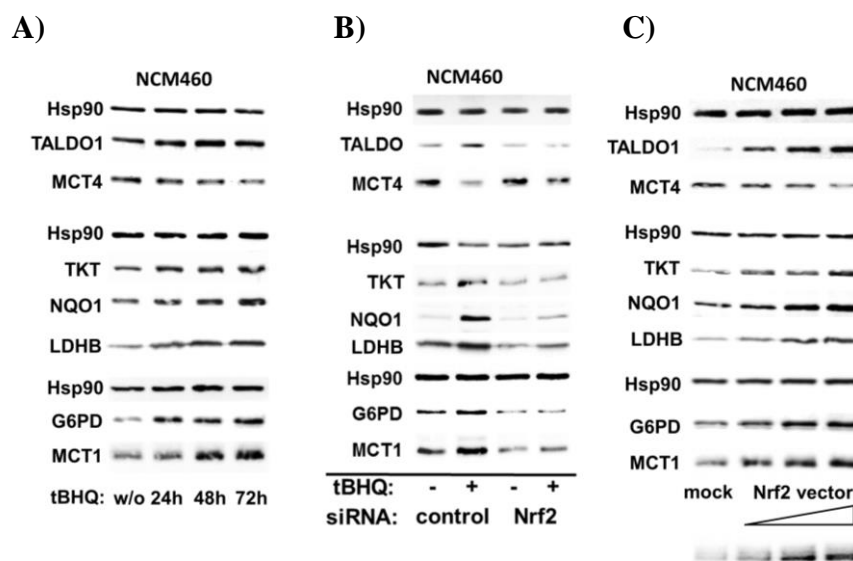


Abbildung 7: Expression von Metabolismusproteinen in NCM460 Zellen. **A)** Westernblot-Analyse von TALDO1, MCT4, TKT, LDHB, NQO1, G6PD und MCT1 unter Behandlung mit dem Nrf2-Aktivator tBHQ (50 μ M) über verschiedene Zeiten (h) bzw. ohne Behandlung (*w/o*). **B)** Westernblot-Analyse von TALDO1, MCT4, TKT, NQO1, LDHB, G6PD und MCT1. NCM460 Zellen wurden mit Kontroll siRNA oder Nrf2 siRNA transfiziert und anschließend mit tBHQ über 24 h stimuliert (+) bzw. nicht stimuliert (-). HSP90 wurde als Ladekontrolle detektiert. **C)** Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen nach Transfektion mit Kontrollplasmid-DNA (*mock*) bzw. ansteigenden Mengen Nrf2 Plasmid (Nrf2 *vector*).

Um weiter zu verifizieren, dass die zuvor gezeigten Effekte Nrf2-abhängig sind, wurden NCM460 Zellen mit einem Nrf2 Expressions-Plasmid bzw. Kontrollplasmid transfiziert. Wie der Abbildung 7 C) zu entnehmen ist, erfolgte unter Nrf2-Überexpression innerhalb von 48 h eine Induktion der Expression von TALDO1, TKT, NQO1, LDHB und G6PD, während MCT4 weniger exprimiert wurde. Somit konnte die Nrf2-Abhängigkeit der vorher gezeigten Effekte gesichert werden.

Schlussfolgernd, dass die Veränderungen im Metabolom der prämaligen Kolonepithelzelllinie NCM460 ein Phänomen der frühen Karzinogenese darstellen könnte, wurde das Augenmerk auch auf Vorgänge in malignen Kolonepithelzellen gerichtet. In diesem Zuge wurden die KRK-Zelllinien HCT15, HT29 und SW403 darauf überprüft, ob sich die in NCM460 Zellen gesehenen Effekte der Nrf2-Induktion durch tBHQ und SFN reproduzieren lassen.

Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Zelllinien für 48 h mit tBHQ oder SFN stimuliert und dann als Gesamtzellysat aufgearbeitet. Im Westernblot wurden wieder MCT1, MCT4, G6PD und NQO1 detektiert. Wie in Abbildung 8 A) zu erkennen, wiesen die HCT15 Zellen von Grund auf eine geringe Menge an MCT1-Protein auf, die jedoch durch SFN und insbesondere durch tBHQ erhöht wurde. Beide Stimulanzen bewirkten eine Steigerung der G6PD- und NQO1- sowie eine Hemmung der MCT4-Expression in den HCT15 Zellen.

Bei den HT29 war lediglich eine geringe Induktion von NQO1 durch tBHQ zu erkennen, ansonsten keine relevanten Veränderungen in den Expressionsmustern der anderen Metabolismusgene. Angemerkt sei, dass MCT1 in den HT29 Zellen nur spärlich vorhanden war. Gegensätzlich zu den HCT15 Zellen, wurde in den SW403 Zellen MCT1 eher durch SFN als durch tBHQ induziert. Jedoch trug tBHQ letztlich mehr zu der Herab- und Heraufregulation von MCT4 respektive G6PD und NQO1 bei.

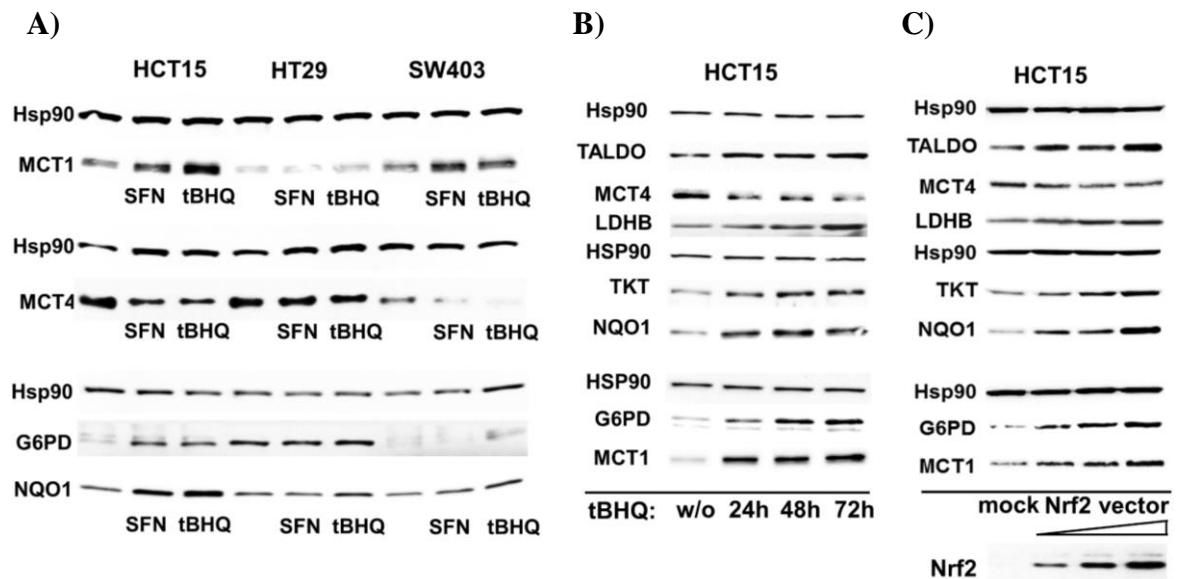


Abbildung 8: Expression von Metabolismusgenen in A) HCT15, HT29 und SW403 Zellen nach Stimulation mit tBHQ (50 μM) oder SFN (10 μM). **B) HCT15 Zellen** nach Transfektion mit Kontrollplasmid-DNA (*mock*) bzw. ansteigenden Mengen Nrf2 Plasmid (*Nrf2 vector*) oder in **C) HCT15 Zellen** unter tBHQ-Behandlung. In **C)** ist zusätzlich die Detektion von Nrf2 in Kernextrakten gezeigt.

Im weiteren Verlauf wurde die Nrf2-Abhängigkeit der Metabolismusexpression in den HCT15 Zellen näher untersucht, da diese Zelllinie diesbezüglich die ausgeprägtesten Effekte aufwies. Analog der NCM460 Zelllinie wurden die HCT15 Zellen hierzu entweder mit tBHQ behandelt oder mit Nrf2 Plasmid transfiziert und ihre Gesamtzelllysate mittels Westernblot untersucht. Zusätzlich wurden von Nrf2-transfizierten HCT15 Zellen Kernextrakte auf die Nrf2-Expression überprüft. Dabei konnten, wie den Abbildung 8 B) und C) zu entnehmen ist, in HCT15 Zellen ganz analoge Expressionsveränderungen der Metabolismusgene in Abhängigkeit von Nrf2 beobachtet werden wie zuvor in NCM460 Zellen.

3.3 Einfluss der M1- und M2-Makrophagen auf Nrf2 und die Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen

3.3.1 M1-Makrophagen beeinflussen die Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen

Vor dem Hintergrund, dass Entzündungszellen wie die TAM in der Lage sind, u. a. mithilfe von ROS Zellsignale zu vermitteln und Nrf2 wiederum durch ROS aktiviert wird, war es interessant, nachzuvollziehen, ob der Kontakt zu Makrophagen die Nrf2-

vermittelten Effekte wiederzugeben vermag. Zudem sollte aufgezeigt werden, dass die Auswirkungen auf die Expression von Metabolismusgenen Nrf2-abhängig sind. Hierfür wurde sich der Methode der indirekten Transwell-Kokultur bedient. Hierbei wurden die NCM460 Zellen im unteren Kompartiment allein oder zusammen mit Makrophagen im oberen Kompartiment (Transwell) kultiviert. Vorerst wurden die Makrophagen polarisiert mittels GM-CSF in proinflammatorische M1- oder mittels M-CSF in antiinflammatorische M2-Makrophagen.

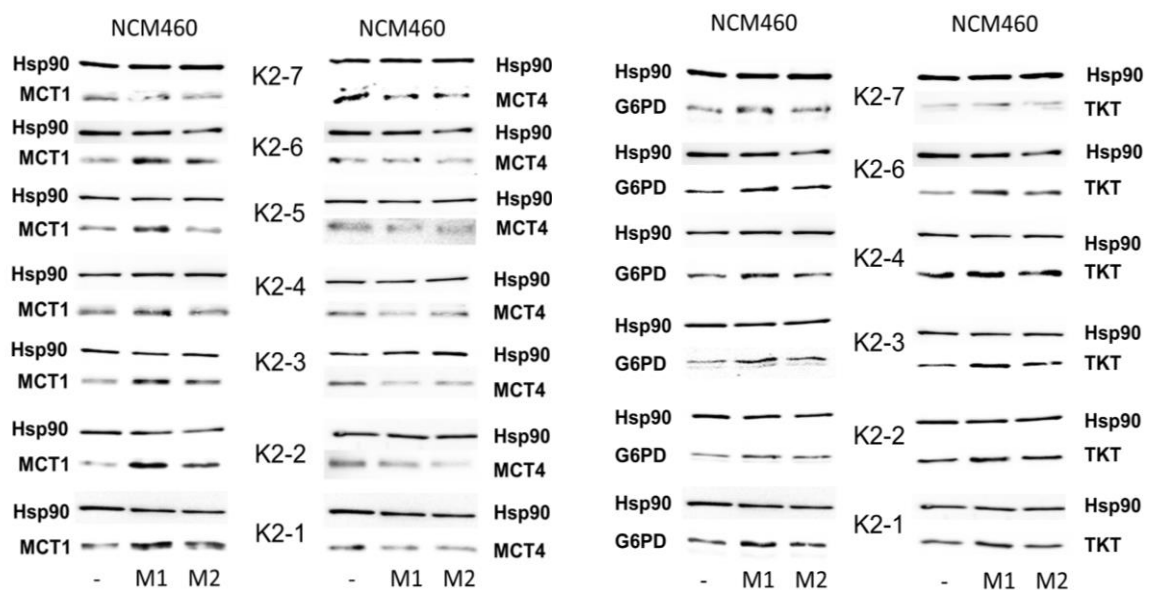


Abbildung 9: Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen nach Kokultur ohne (–) oder mit M1- oder M2-Makrophagen. Dargestellt sind die Westernblot-Analysen von 7 Wiederholungen des Versuches.

Nach einer 72-stündigen Kokultur wurden sowohl die NCM460 Zellen als auch die Makrophagen (Ergebnisse hier nicht gezeigt) als Gesamtzelllysate aufgearbeitet und der Analyse im Westernblot unterzogen. Wie der Abbildung 9 zu entnehmen ist, zeigte sich in den NCM460 Zellen in Gegenwart der M1-Makrophagen eine starke Induktion der Expression von MCT1. Währenddessen erwies sich die Änderung der MCT1-Expression im Beisein der M2-Makrophagen als weniger ausgeprägt. MCT4 wurde sowohl mit M1- als auch mit M2-Makrophagen herunterreguliert – wobei der Effekt durch M1-Makrophagen insgesamt stärker ausfiel. Auch G6PD zeigte eine höhere Induktion nach Kokultur mit M1-Makrophagen als mit M2-Makrophagen. TKT zeigte eine leichte Induktion nach Kokultur mit M1-Makrophagen und in geringerem Maße mit M2-Makrophagen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass v. a. die M1-

Makrophagen in der Lage sind, die Expression der Metabolismusgene in den NCM460 Zellen zu beeinflussen.

Nachfolgend wurde die Expression der oben besprochenen Metabolismusgene in den NCM460 Zellen unter Kokultur auch auf mRNA-Ebene untersucht. NCM460 Zellen waren hierfür einer Kokultur mit den M1- oder M2-Makrophagen für 72 oder 120 h ausgesetzt worden. Die hieraus generierten cDNA-Proben wurden mittels der *real-time* PCR wieder semiquantitativ auf die Stoffwechselgene MCT1, MCT4, G6PD und NQO1 analysiert.

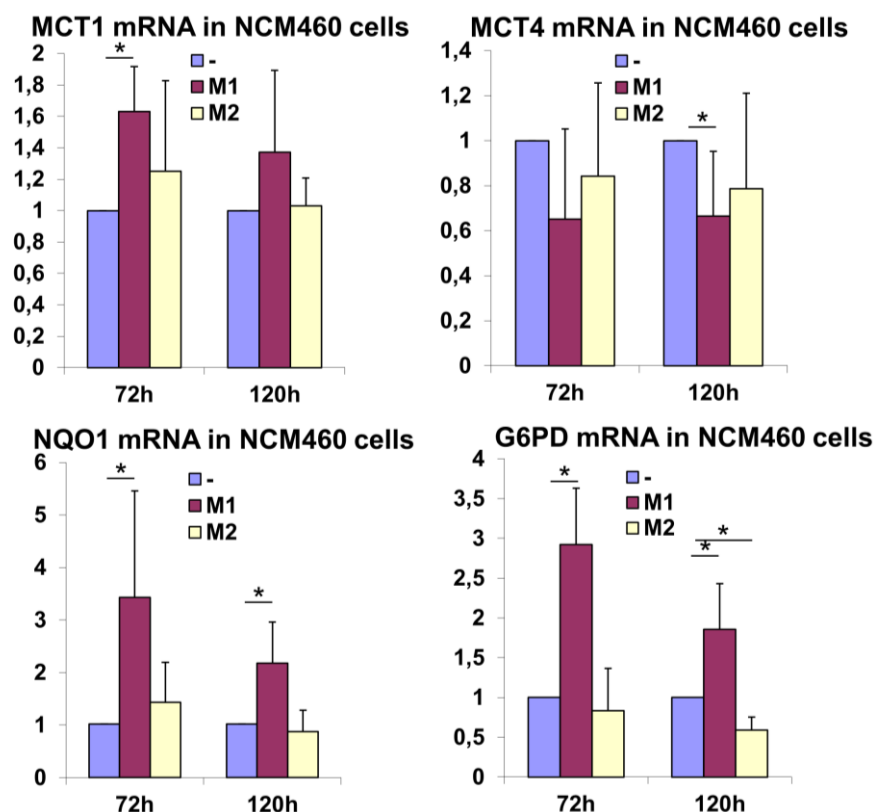


Abbildung 10: Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen nach Kokultur ohne (-) bzw. mit M1- oder M2-Makrophagen über verschiedene Zeiten (h). *Real-time* PCR zur semiquantitativen Bestimmung der MCT1, MCT4, G6PD und NQO1 mRNA in NCM460 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des n-fachen Wertes in NCM460 Zellen ohne Makrophagen. Die statistische Signifikanz ($p < 0,05$; t-Test, MS-Excel) ist mit einem * gekennzeichnet.

Der Abbildung 10 ist zu entnehmen, dass die Expression von G6PD mRNA durch Kokultur mit M1-Makrophagen nach 72 h um das 3-fache anstieg. Dieser Anstieg flachte nach 120 h Kokultur bis auf eine Verdopplung der Expression ab. Im Gegensatz dazu war unter M2-Kokultur sogar eine leichte Abnahme festzustellen. Die Expression

der MCT1 mRNA stieg nach 72 h Kokultur mit M1-Makrophagen um das 1,6-fache an, wobei dieser Effekt im zeitlichen Verlauf auch wieder etwas abnahm.

Demgegenüber war der Anstieg von MCT1 in Gegenwart von M2-Makrophagen deutlich schwächer ausgeprägt. Die MCT4 mRNA-Expression war unter Einfluss der M1-Makrophagen um etwa 40 % vermindert und unterlag kaum zeitlichen Schwankungen. Auch die Kokultur mit M2-Makrophagen bewirkte eine leicht verminderte MCT4-Expression. NQO1 mRNA wurde zum Zwecke der Kontrolle der Nrf2-Aktivierung analysiert und zeigte eine 3,5-fache Induktion der Expression nach 72 h mit M1-Makrophagen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die dargestellten Ergebnisse aus der Analyse auf mRNA-Ebene die Aussagen der Untersuchungen im Westernblot bestätigen.

3.3.2 Die Effekte von M1-Makrophagen auf NCM460 Zellen sind abhängig von Nrf2

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die oben beschriebenen Effekte über die Aktivierung von Nrf2 vermittelt wurden. Hierzu wurden die NCM460 Zellen zuerst mit Kontroll siRNA bzw. Nrf2 siRNA für 24 h behandelt und im Anschluss der 24-stündigen Kokultur mit M1- oder M2-Makrophagen zugeführt bzw. ohne diese. Dann wurden die NCM460 Zellen als Gesamtzelllysate oder als Kernextrakt aufgearbeitet und die Expression der Metabolismusgene und die Lokalisation von Nrf2 im Zellkern im Westernblot beurteilt.

Der Abbildung 11 sind wiederholt die oben beschriebenen Effekte auf die Proteinexpression zu entnehmen. Zusätzlich wurden hier noch LDHB und G6PD und TALDO1 untersucht. Beide Proteine zeigten ebenfalls eine Nrf2-abhängige Induktion durch die M1-Makrophagen. Interessanterweise fand sich eine große Menge von aktiviertem Nrf2 im Zellkern der NCM460 Zellen in Gegenwart von M1-Makrophagen, während die Nrf2 Aktivierung in Gegenwart von M2-Makrophagen nur sehr gering war. Unter *knockdown* von Nrf2 durch die siRNA war nicht nur zu erkennen, dass die Menge des nukleären Nrf2 nahezu vollständig vermindert war, sondern auch der durch die Kokultur mit M1-Makrophagen vermittelte Effekt auf die Expression der Metabolismusgene.

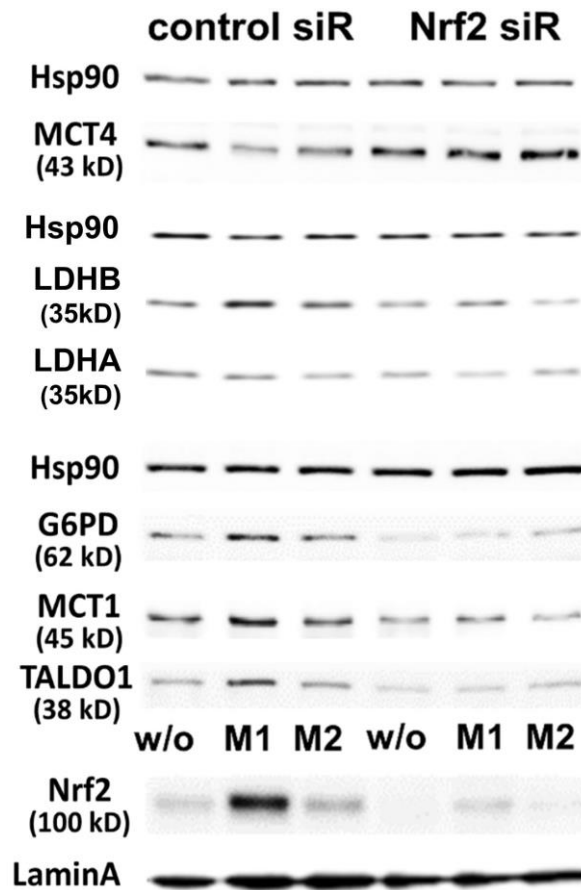


Abbildung 11: Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen nach Transfektion mit Kontroll siRNA oder Nrf2 siRNA und nach Kokultur ohne (w/o) oder mit M1- bzw. M2-Makrophagen. Dargestellt sind die Westernblot-Analysen der Gesamtzelllysate und der Kernextrakte der NCM460 Zellen. Lamin A dient hier zur Kontrolle der Beladung mit Kernprotein.

3.3.3 Effekt von M1-Makrophagen auf die Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen ist abhängig von ROS und Nrf2

Im folgenden Versuch sollte nun der direkte Zusammenhang zwischen der Konfrontation mit ROS und der Aktivierung von Nrf2 am Beispiel der NCM460 Zelllinie gezeigt werden. Hierfür wurden die NCM460 Zellen zuerst für 24 h mit 200 μ M des ROS-Scavengers Tiron¹⁵ behandelt oder ohne diesen, und dann für weitere 24 h der Kokultur mit M1- bzw. M2-Makrophagen zugeführt oder mit zellfreiem Transwell inkubiert.

Wie der Abbildung 12 zu entnehmen ist, unterdrückt Tiron die durch die M1-Makrophagen vermittelten Effekte. Entsprechend war nach einer Behandlung mit Tiron

¹⁵ Tiron, auch bekannt als 1,2-Dihydroxybenzol-3,5-disulfonsäure-Dinatriumsalz, ist sowohl ein Chelatkomplexbildner für bestimmte Metallionen, als auch ein Fänger von Superoxidradikalen. Seine geringe Molekülgröße erleichtert es ihm, in die Zelle eindringen (Ledenev et al. 1986).

die M1 induzierte Expression von aktiviertem Nrf2, MCT1, G6PD, LDHB und TALDO1 in den NCM460 Zellen deutlich vermindert (Abbildung 12).

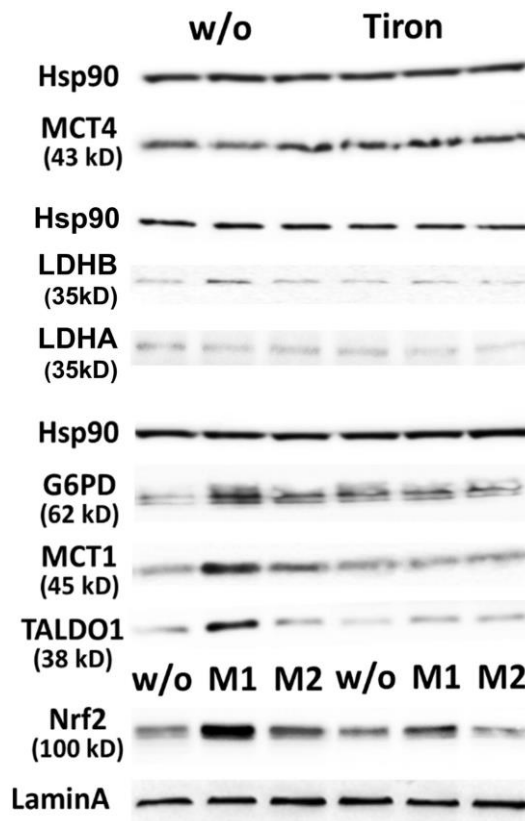


Abbildung 12: Effekt von M1-Makrophagen auf die Expression von Metabolismusgenen in NCM460 Zellen ist abhängig von ROS und Nrf2. Expression von Metabolismusgenen nach Kokultur ohne (*w/o*) oder mit M1- bzw. M2-Makrophagen in Gegenwart des ROS-Scavengers Tiron oder ohne (*w/o*). Dargestellt sind die Westernblot-Analysen der Gesamtzelllysate und der Kernextrakte der NCM460 Zellen. Lamin A dient hier zur Kontrolle der Beladung mit Kernprotein.

Die beschriebenen Ergebnisse weisen eindeutig darauf hin, dass die durch die M1-Makrophagen in NCM460 Zellen verursachten Effekte bzgl. der Expression von Metabolismusgenen auf Proteinebene über die Nrf2-Aktivierung durch ROS vermittelt werden.

3.3.4 Expression von Metabolismusgenen in den M1- und M2-Makrophagen

Abgesehen von den Vorgängen in den NCM460 Zellen, waren weiterhin die Veränderungen der Expressionsmuster der Metabolismusgene in den Makrophagen selbst von Interesse (Abbildung 13). Daher wurden auch die Gesamtzelllysate der M1- und M2-Makrophagen im Westernblot analysiert.

Die M1-Makrophagen zeigten eine leichte Zunahme der Expression von MCT4 nach Kokultur mit NCM460 Zellen, die M2-Makrophagen hingegen eine Abnahme. TALDO1 wurde in den M1-Makrophagen stark induziert, während die M2-Makrophagen keine Änderung in der Expression zeigten. MCT1 wies in den M1-Makrophagen praktisch keine Veränderung auf, zeigte in den M2-Makrophagen jedoch eine Herabregulation nach Kokultur mit NCM460 Zellen. Ebenso wurde die Expression von G6PD in beiden Makrophagentypen nicht durch die Kokultur mit NCM460 Zellen beeinflusst. Auffallend war jedoch eine per se niedrigere G6PD-Expression in den M2- als in den M1-Makrophagen. Dies könnte als Hinweis für eine höhere Akkumulation von ROS in den M1-Makrophagen verstanden werden, welche sich mit der Regeneration von Redox-Puffersystemen unter Zuhilfenahme von G6PD-Aktivität selbst vor oxidativem Stress schützen.

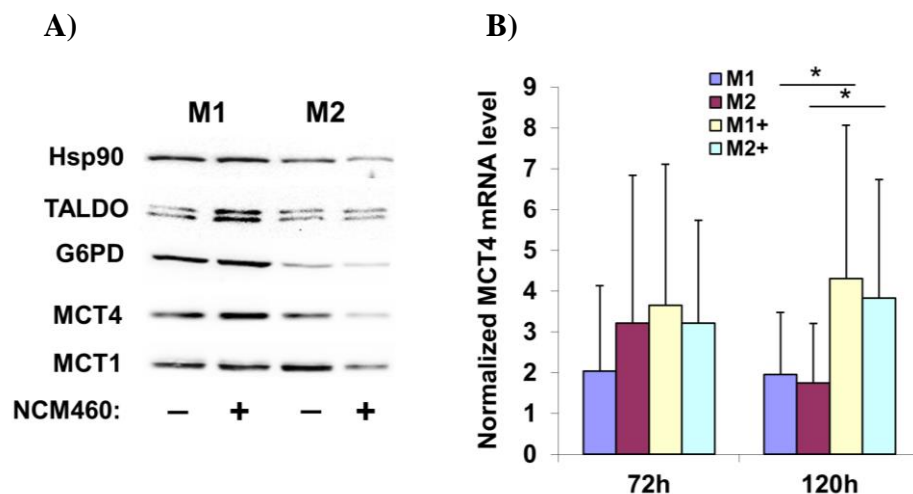


Abbildung 13: A) Expression von Metabolismusgenen in den M1- und M2-Makrophagen nach 120 h Kokultur ohne (-) oder mit (+) NCM460 Zellen. HSP90 dient der Ladekontrolle. B) Expression von MCT4 in M1- und M2-Makrophagen nach Kokultur ohne oder mit (+) NCM460 Zellen über 72 und 120 h. *Real-time* PCR zur semiquantitativen Bestimmung von MCT4 mRNA. Der mRNA-Gehalt wurde auf die Menge von hTBP mRNA normalisiert.

Auch in der *real-time* PCR zeigte sich eine Induktion der Expression von MCT4 in den M1-Makrophagen nach Kokultur mit NCM460 Zellen, v. a. nach 120 h – dies untermauert die Aussage der Westernblot-Analyse. In M2-Makrophagen war hingegen nach 120 h die MCT4 mRNA ebenfalls erhöht, was diskrepant zum Westernblotbefund ist. Offenbar ist die Veränderung auf Proteinebene unter Kokultur träger und daher verzögert im Vergleich zur mRNA-Expression.

Die erfolgreiche Polarisation der Makrophagen und die Auswirkungen der Kokultur mit den NCM460 Zellen auf diese, wurden anhand des Expressionsmusters der mRNA für Interleukine mittels der *real-time* PCR überprüft.

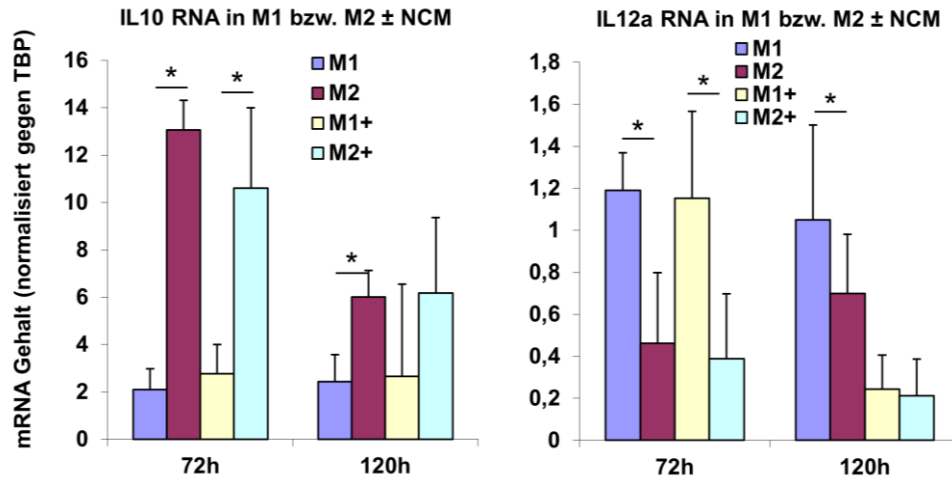


Abbildung 14: Expression der charakteristischen Interleukine in M1- und M2-Makrophagen nach Kokultur ohne oder mit (+) NCM460 Zellen über 72 und 120 h. *Real-time* PCR zur semiquantitativen Bestimmung von IL-10 und IL-12a mRNA. Der mRNA-Gehalt wurde auf die Menge von hTBP mRNA normalisiert.

Der Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass die M1-Makrophagen grundsätzlich mehr IL-12a aufwiesen als die M2-Makrophagen, letztere wiederum mehr IL-10 mRNA generierten als die M1-Makrophagen. Nach 120 h Kultur nahm der Gehalt an IL-10 mRNA in den M2-Makrophagen sowohl in Beisein der NCM460 Zellen als auch ohne diese, ab. Der IL-12 mRNA-Gehalt stieg hingegen in den M2-Makrophagen nach 120 h Kultur ohne NCM460 Zellen an, während er in den M1-Makrophagen nach der 120 h Kokultur mit NCM460 Zellen abnahm. Demzufolge scheint sich die Expression der IL-12a mRNA in beiden Makrophagen-Subpopulationen zeitabhängig anzugleichen.

3.4 Einfluss von Nrf2 auf die metabolische Reprogrammierung von NCM460 und HCT15 Zellen

Um zu untersuchen, ob die Effekte von Nrf2 auf die Metabolismusgene eine Stoffwechseländerung herbeiführen, wurde auf den XFp Extracellular Flux Analyzer der Firma Seahorse (inzwischen Firma Aligent) zurückgegriffen, um an den Zellen eine Messung der ECAR und OCR in Echtzeit vorzunehmen. Im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen, zeigten die mit tBHQ behandelten NCM460 Zellen im Glycolysis Stress Assay eine verminderte Laktatfreisetzung auch nach Hemmung der

mitochondrialen ATP-Synthese und im Mito-Stress-Test einen leicht erhöhten Sauerstoffverbrauch (Abbildung 15 A). Ein gleichförmiges Verhalten war auch in den Nrf2-überexprimierenden HCT15 Zellen zu beobachten, wo es wiederum zu einer Reduktion der Laktatfreisetzung und leichter Erhöhung des Sauerstoffverbrauches im Vergleich zu den *mock*-transfizierten Zellen kam (Abbildung 15 B).

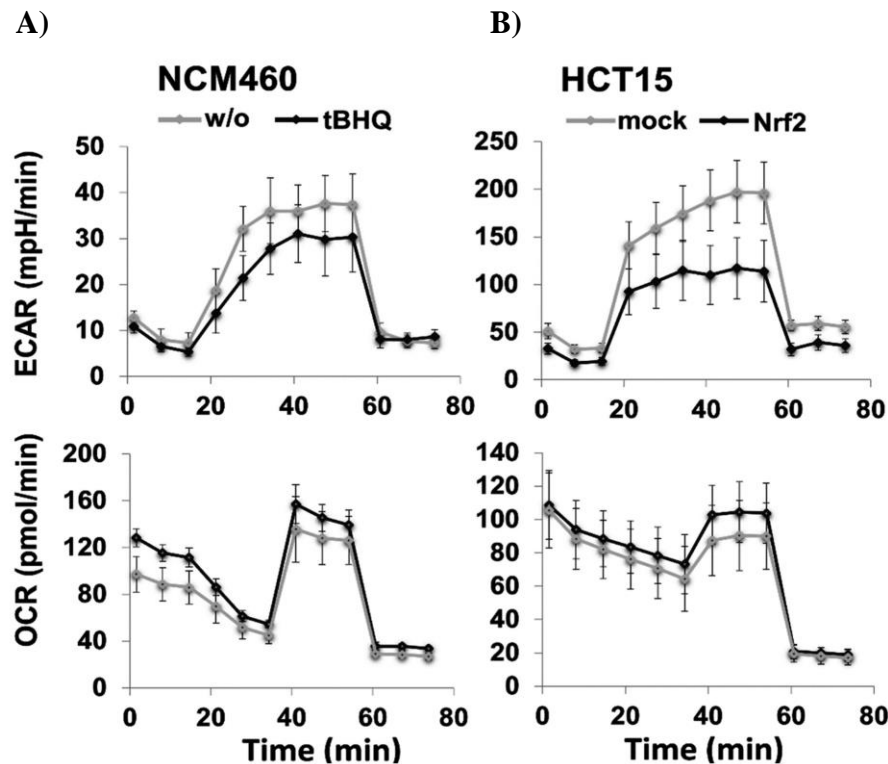


Abbildung 15: Glycolysis Stress Assay nach A) Stimulation mit tBHQ (NCM460 Zellen) oder ohne (*w/o*) bzw. B) Überexpression von Nrf2 (HCT15 Zellen) oder Kontrollplasmid (*mock*): ECAR (extrazelluläre Azidifizierungsrate in mpH/min) als Ausdruck der Laktatfreisetzung und **Mito-Stress-Test:** OCR (Sauerstoffaufnahme in pmol/min) als Ausdruck mitochondrialer Aktivität. Die Analyse erfolgte mittels des Seahorse XF, n=3, Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Nrf2 nur geringfügig in den oxidativen Stoffwechsel der untersuchten Zelllinien eingreift. Somit erscheint die Erklärung, dass die herabgesetzte Laktatfreisetzung durch eine verminderte oxidative Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette zustande komme, unwahrscheinlich. Stattdessen kommt eher in Betracht, dass eine verminderte Aufnahme und Katabolismus von Glukose den Abfall der ECAR verantwortet.

Daher wurde anschließend die Expression des Glukose-transportierenden Transmembranproteins GLUT1¹⁶ nach Stimulation mit tBHQ oder Nrf2-Überexpression analysiert (Abbildung 16 A).

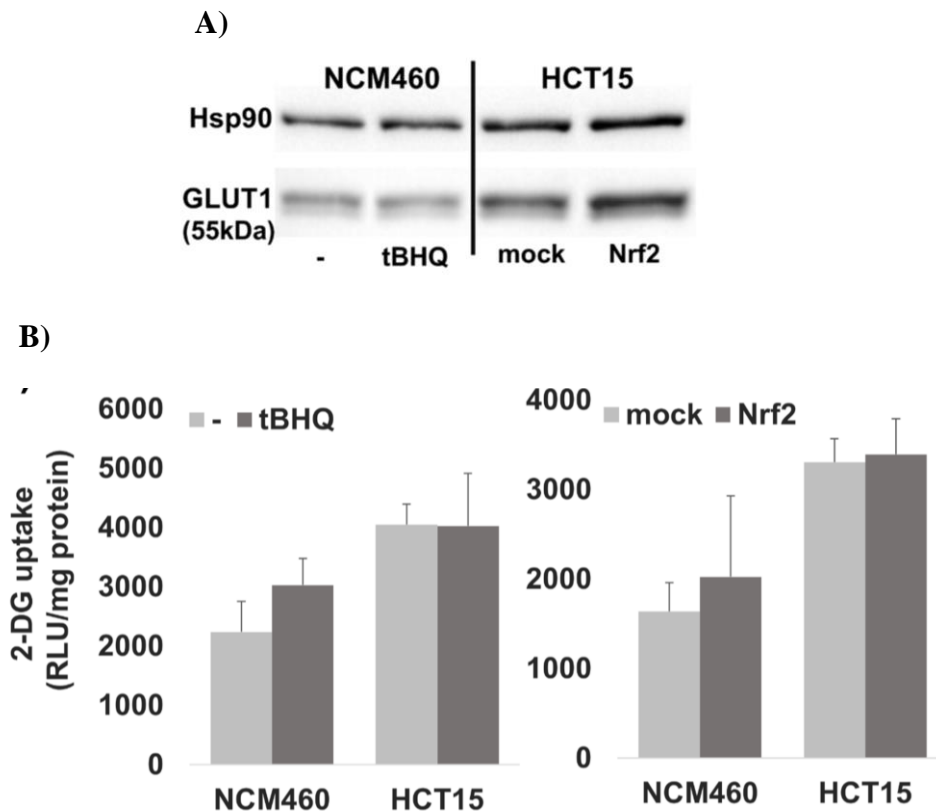


Abbildung 16: Expression von GLUT1 (A) und Glukoseaufnahme (B) in NCM460 Zellen ohne oder nach Stimulation mit 50 μ M tBHQ bzw. nach Transfektion mit Kontrollplasmid-DNA (*mock*) bzw. Nrf2 Plasmid (Nrf2). Dargestellt sind A) die Westernblot-Analyse der Gesamtzelllysate von NCM460 bzw. HCT15 Zellen (Hsp90 diente der Ladekontrolle) und B) die Ergebnisse des luminometrischen Glukose-Aufnahme Assays (n=3, Mittelwerte \pm Standardabweichung; Normalisierung der relativen Lumineszenz *units* (RLU) gegenüber dem Proteingehalt).

Wie der Abbildung 16 A) zu entnehmen ist, nahm die Expression von GLUT1 unter den oben aufgeführten Bedingungen nicht ab. Des Weiteren zeigte sich im Glukose-Aufnahme Assay kein Unterschied unter Nrf2-Aktivierung bzw. Nrf2-Überexpression in beiden Zelllinien (Abbildung 16 B).

Dies unterstreicht die Hypothese, dass die Nrf2-abhängigen Stoffwechselveränderungen nicht zu einer verminderten Glukoseaufnahme und -Veratmung, sondern eher zu einer

¹⁶ GLUT1 ist ein transmembranäres Transportprotein und ist für den insulinunabhängigen Import von Glukose in die Zelle verantwortlich. Gehäuft kommt er in Zellen des ZNS und den Erythrozyten vor, ist aber in vielen anderen Zelltypen zu finden. Funktionell handelt es sich um einen Uniport, dessen Energie durch den Glukosekonzentrationsgradienten bereitgestellt wird (Rassow et al. 2008).

gesteigerten Laktataufnahme und seiner oxidativen Phosphorylierung – im Sinne eines reversen Warburg-Effektes – führen. Insofern kann Nrf2 als ein Schlüsselenzym für diese Variante der metabolischen Reprogrammierung angesehen werden.

3.5 Die Nrf2-induzierte MCT1-Expression vermittelt die Laktataufnahme in NCM460 und HCT15 Zellen

Aus den Ergebnissen der Stoffwechsel-Versuche in Kapitel 3.4 konnte der Schluss gezogen werden, dass Nrf2 einen entscheidenden Einfluss auf den Laktattransport in den prämaligen und malignen humanen Kolonepithelzellen nimmt. Auf diese aus dem Seahorse erhobenen Daten stützend, sollten im Folgenden Versuche zum zellulären Laktattransport im eigentlichen Sinne erfolgen. Die zentrale Frage in diesem Zusammenhang ist, ob die MCT Transporter durch Nrf2-Aktivierung in ihrer Funktionsweise beeinflusst werden und in welche Richtung das Laktat über welchen MCT Transporter fließt.

3.5.1 Einfluss von M1-Makrophagen auf die ¹⁴C-Laktataufnahme von NCM460 Zellen

Wie schon in Kapitel 3.3 gezeigt, sind hauptsächlich die M1-Makrophagen in der Lage, die Expression von Metabolsimusgenen in den NCM460 Zellen zu beeinflussen. Als Nächstes sollte analysiert werden, ob die Kokultur mit polarisierten Makrophagen die zelluläre Aufnahme von Laktat in den prämaligen NCM460 Zellen beeinflusst.

Hierzu wurden NCM460 Zellen für 48 h mit M1- bzw. M2-Makrophagen mittels der indirekten Kokultur zusammen inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von ¹⁴C-Laktat in das Kulturmedium und eine weitere Inkubation für 1 h.

In der Auswertung zeigte sich, dass die NCM460 Zellen aus der Kokultur mit M1-Makrophagen eine deutlich größere Menge Laktat aufgenommen hatten als die NCM460 Zellen aus der Monokultur (Abbildung 17). Im Gegensatz dazu steht, dass die Kokultur mit M2-Makrophagen nur geringfügig die ¹⁴C-Laktataufnahme beeinflussen konnte.

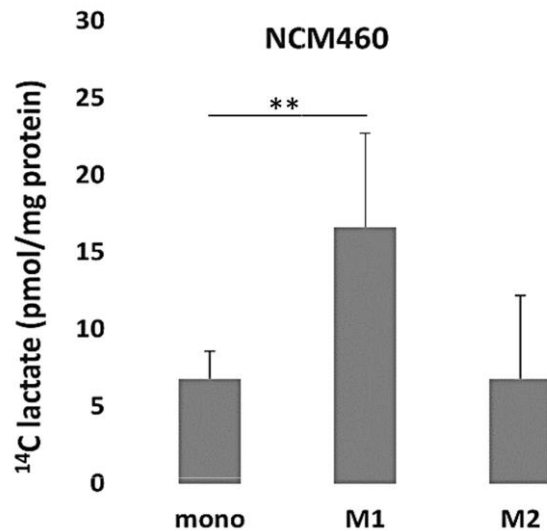


Abbildung 17: Kokultur mit M1-Makrophagen erhöht die ¹⁴C-Laktataufnahme von NCM460 Zellen. Indirekte Kokultur von NCM460 Zellen mit M1- oder M2-Makrophagen bzw. Monokultur (mono). Nach 48 h Zugabe von ¹⁴C-Laktat für 1 h und Messung der aufgenommenen Laktatmenge in den Zelllysaten, ** p<0.02.

3.5.2 Abhängigkeit der ¹⁴C-Laktataufnahme von der durch M1-Makrophagen vermittelten MCT1-Induktion in NCM460 Zellen

Schon in Kapitel 3.3 ist deutlich geworden, dass M1-Makrophagen Einfluss nehmen auf die Induktion von MCT1 in NCM460 Zellen. Nun sollte im folgenden Versuch analysiert werden, ob die ¹⁴C-Laktataufnahme der NCM460 Zellen in Kokultur mit M1-Makrophagen abhängig ist von einer Induktion von MCT1 bzw. MCT4. Hierfür wurden die NCM460 Zellen vor der 48-stündigen Kokultur mit M1-Makrophagen mit Kontroll-, MCT1- oder MCT4-siRNA transfiziert. Im Anschluss wurde, wie schon in Kapitel 3.5.1 beschrieben, die ¹⁴C-Laktataufnahme gemessen. Nach *knockdown* des MCT1 zeigten die NCM460 Zellen in der Kokultur eine deutlich verminderte ¹⁴C-Laktataufnahme als in der Kontrolle, während dieser Effekt nach MCT4 *knockdown* nicht zu beobachten war (Abbildung 18). Zum Nachweis des erfolgten *knockdowns* mittels siRNA wurden die NCM460 Zellen in einem Parallelansatz lysiert und mittels Westernblot analysiert (Abbildung 18).

Diese Ergebnisse bekräftigen die Annahme, dass die durch M1-Makrophagen gesteigerte Laktataufnahme in den NCM460 Zellen im Zusammenhang steht mit der MCT1-Induktion und geben Hinweise darauf, dass MCT1 als Laktatimporteur fungiert.

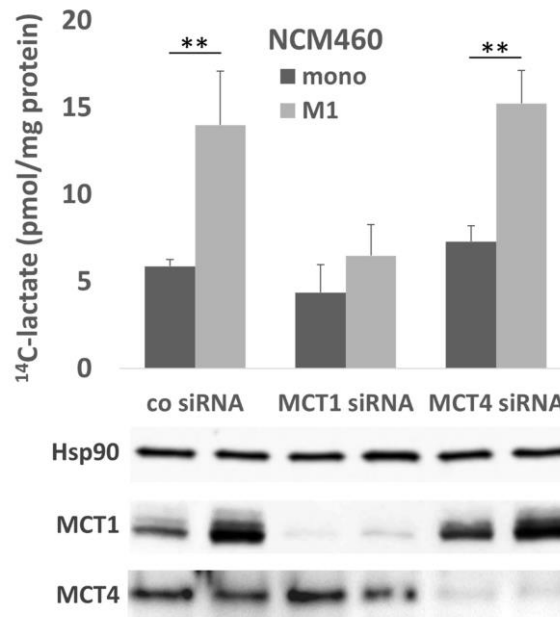


Abbildung 18: Kokultur mit M1-Makrophagen steigert über MCT1-Induktion in NCM460 Zellen deren ¹⁴C-Laktataufnahme. Indirekte Kokultur von NCM460 Zellen mit M1-Makrophagen oder Monokultur (mono), zuvor siRNA-Transfektion mit Kontroll (*co*), MCT1 bzw. MCT4 siRNA. Nach 48 h Zugabe von ¹⁴C-Laktat für 1 h und Messung der aufgenommenen Laktatmenge in den Zelllysaten; Ergebnisse zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung von sechs unabhängigen Experimenten; ** p<0.02. Westernblotanalyse von NCM460 Gesamtzelllysaten nach Transfektion und Kokultur mit M1-Makrophagen bzw. Monokultur: MCT1, MCT4; Hsp90 dient der Ladekontrolle.

3.5.3 ¹⁴C-Laktatimport in NCM460 und HCT15 Zellen ist abhängig von induziertem Nrf2 und seinem Einfluss auf die Expression von MCT1

Um die beschreibenden Ergebnisse über die Metabolismusgenexpressionsmuster aus Kapitel 3.2 auf ihre praktische Relevanz für die Stoffwechselaktivitäten der prämaligen und malignen Zelllinien zu überprüfen, wurde in den NCM460 und HCT15 Zellen abermals eine Überexpression von Nrf2 induziert, das Kulturmedium mit einer niedrigen Glukosekonzentration (0.1 g/L) versehen und im Nachgang die Laktataufnahme gemessen. Abgesehen von Nrf2 wurden beide Zelllinien noch mit MCT1 und MCT4 Plasmid-DNA transfiziert.

In beiden Zelllinien führte eine Überexpression sowohl von Nrf2 als auch von MCT1 zu einer höheren zellulären Aufnahme von ¹⁴C-Laktat (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression von MCT4 nur zu einem geringfügigen Anstieg von Laktat

in beiden Zelllinien. Zur Kontrolle der erfolgreichen Transfektion mit MCT1, MCT4, Kontroll, bzw. Nrf2 Plasmid wurden parallel Westernblots zu den zu induzierenden Proteinen angefertigt.

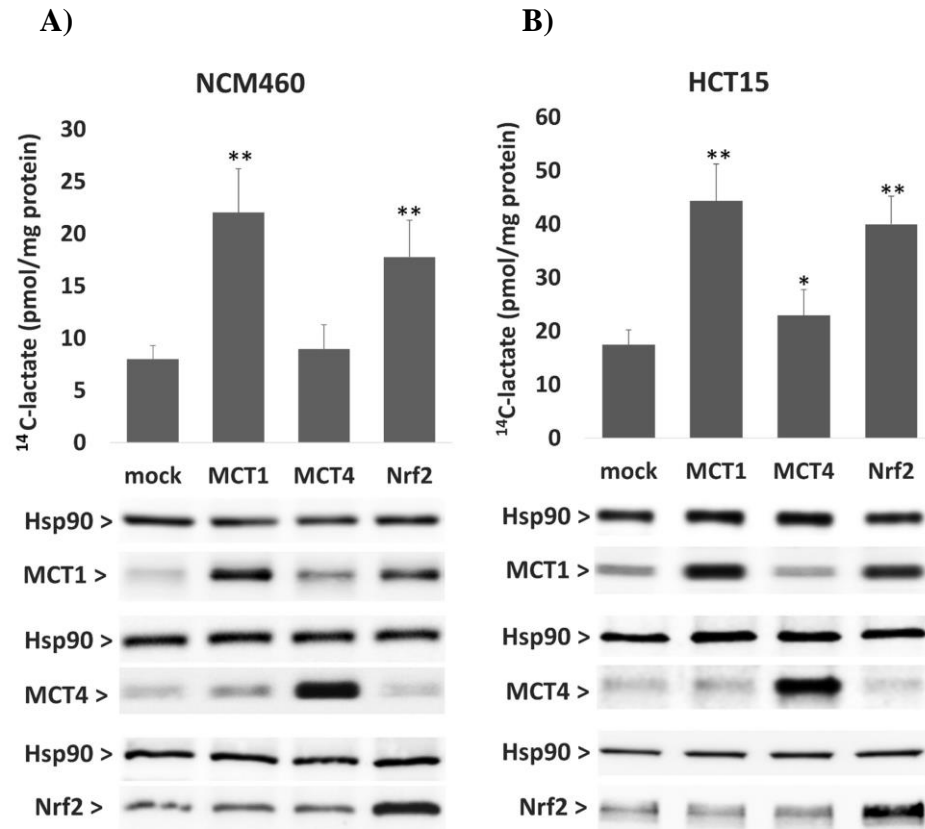


Abbildung 19: Gesteigerte ¹⁴C-Laktataufnahme in NCM460 und HCT15 Zellen nach Überexpression von Nrf2 und MCT1. A) NCM460 Zellen und B) HCT15 Zellen wurden mit Kontroll- (*mock*), MCT1, MCT4 und Nrf2 Plasmid-DNA transfiziert, das Kulturmedium im Anschluss mit ¹⁴C-Laktat versetzt und nach 1 h die zellulär aufgenommene Menge vom ¹⁴C-Laktat ausgewertet. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung aus fünf von einander unabhängigen Versuchen; * $p < 0.05$ und ** $p < 0.02$ im Vergleich zu *mock*. Es erfolgte die Kontrolle der induzierten Proteinexpression aus den Gesamtzelllysaten im Westernblot: MCT1, MCT4, Nrf2; Hsp90 als Ladekontrolle.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Laktat-*carrier* MCT1 und MCT4 auf unterschiedliche Art und Weise den Laktatfluss aus bzw. in die Zellen der Linien NCM460 und HCT15 beeinflussen, wenn diese Nrf2 überexprimieren. Insbesondere MCT1 scheint hier die Rolle des Importeurs im Laktatstoffwechsel einzunehmen.

3.6 Einfluss von Nrf2 auf den Phänotyp der Zellen

3.6.1 M1-Makrophagen vermitteln Nrf2-abhängigen Apoptoseschutz über die Induktion von MCT1 und G6PD in NCM460 Zellen

Als Nächstes wurde überprüft, ob die durch Nrf2 beeinflussten Metabolismusgene den NCM460 Zellen einen Schutz vor Apoptose verleihen. Hierfür wurden NCM460 Zellen mit Kontroll, MCT1, MCT4 und G6PD siRNA transfiziert und anschliessend für 24 h entweder mit PBMCs, M1- oder M2-Makrophagen kokultiviert. Schließlich wurde die basale Caspaseaktivität in den NCM460 Zellen gemessen. Wie aus der Abbildung 20 A) zu ersehen ist, sank die basale Caspaseaktivität in Kontroll siRNA-transfizierten NCM460 Zellen unter Kokultur mit M1-Makrophagen signifikant im Vergleich zu der Kokultur mit den PBMCs (Mo). M2-Makrophagen zeigten diesbezüglich keinen Effekt. Dieser Schutz dank der M1-Makrophagen ist offensichtlich vermittelt durch MCT1, da unter dessen *knockdown* mittels siRNA keine Apoptoseverminderung in M1-kokultivierten NCM460 Zellen mehr nachzuweisen war. Vielmehr war eine Steigerung der Caspaseaktivität gegenüber PBMC- oder M2-Kokultur zu beobachten. Einen ähnlichen Effekt auf den M1-vermittelten Apoptoseschutz in NCM460 Zellen hatte auch der *knockdown* von G6PD, wobei auch unter M2-Kokultur eine deutliche Steigerung der Apoptoserate zu verzeichnen war. Der MCT4-*knockdown* in NCM460 Zellen war hingegen ohne Auswirkungen auf den Apoptoseschutz durch die M1-Makrophagen.

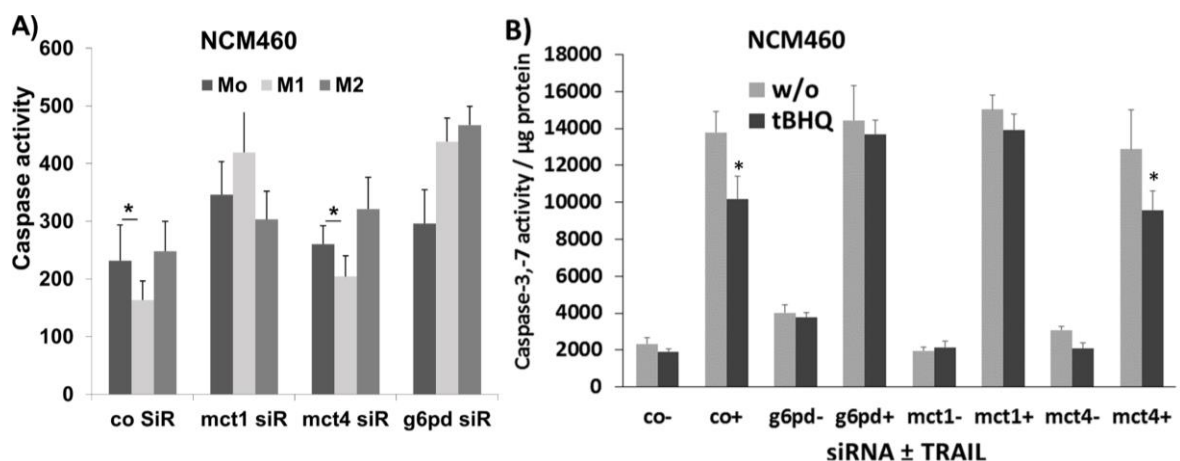


Abbildung 20: A) Basale Caspase-3,-7-Aktivität / µg Protein in NCM460 Zellen, nach Transfektion mit Kontroll, MCT1, MCT4 und G6PD siRNA und Kokultur mit entweder PBMCs (Mo), M1- oder M2-Makrophagen; 6 unabhängige Versuche. B) Zeigt die Caspase-3,-7-Aktivität / µg Protein in NCM460 Zellen nach Transfektion mit siRNA (Co = Kontroll siRNA), Behandlung mit tBHQ oder ohne (w/o) und

nach Behandlung mit TRAIL (+) oder ohne (-). Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung aus sechs bzw. vier von einander unabhängigen Versuchen; * $p < 0.05$

Der Zusammenhang zwischen Nrf2-induziertem Apoptoseschutz und der metabolischen Reprogrammierung wurde auch in tBHQ-behandelten NCM460 Zellen und nachfolgender Behandlung mit dem Todesliganden TRAIL¹⁷ untersucht. Hierfür wurden die NCM460 Zellen zunächst mit siRNA wie oben beschrieben transfiziert, danach für 24 h mit tBHQ stimuliert und zuletzt mit TRAIL (6 h) behandelt. Der Abbildung 20 B) ist zu entnehmen, dass die Nrf2-Aktivierung in Kontroll siRNA behandelten NCM460 Zellen zum Schutz vor der TRAIL-induzierten Caspaseaktivität führte. Ein solcher Effekt durch die tBHQ-Vorbehandlung war nicht mehr festzustellen, wenn die NCM460 Zellen Gegenstand eines MCT1- oder G6PD-*knockdowns* waren. Demgegenüber war der *knock-down* von MCT4 ohne Auswirkung auf den tBHQ-vermittelten Schutz vor TRAIL-induzierter Apoptose.

3.6.2 Der Nrf2- und MCT1-abhängige Laktataustausch fördert das Wachstum und das Überleben von malignen HCT15 Zellen

Ziel der folgenden Versuche war es, die Kompartimentierung von MCT1 und MCT4 zu rekapitulieren. Mittels der indirekten Kokultur sollte die Rolle von Nrf2-abhängigem Laktataustausch zwischen räumlich getrennten Zellen identischer Herkunft (HCT15 KRK-Zellen) näher beleuchtet werden. Das Zellwachstum und die Apoptose wurden gemessen.

MCT4-überexprimierende HCT15 Zellen dienten als das Laktat-sekretierende Kompartiment und wurden im Transwell ausgesät (HCT15-MCT4^{TW}). Mit Nrf2 Plasmid transfizierte HCT15 Zellen wuchsen im unteren *bottom well* (HCT15-Nrf2^{BW}) und imitierten das Laktat-importierende Kompartiment, welches nach der Kokultur den Analysen zugeführt wurde. *Mock* Plasmid (HCT15-*mock*^{TW} oder HCT15-*mock*^{BW}) und MCT1 siRNA-transfizierte *bottom well*-Zellen dienten entweder als Kontrolle oder wurden in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt. Dem MTS-Assay in Abbildung 21 ist zu entnehmen, dass die HCT15-Nrf2^{BW} Zellen nach einer 24-stündigen Exposition mit HCT15-MCT4^{TW} Zellen eine größere Zellzahl als die HCT15-*mock*^{BW}

¹⁷ TRAIL ist ein potenter endogener Aktivator des induzierten Zelltods und funktioniert als solcher, indem er die Todesrezeptoren DR4 und DR5 auf der Zelloberfläche aktiviert. TRAIL wird von Zellen des Immunsystems gebildet und induziert die Apoptose bevorzugt in malignen Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Chinnaiyan et al. 2000).

aufwiesen. Der *knockdown* der MCT1-Expression in HCT15-Nrf2^{BW} hob den steigernden Effekt der Kokultur mit HCT15-MCT4^{TW} auf die Zellzahl auf. Lediglich moderate Unterschiede in der Zellzahl wurden nach Kokultur der HCT15-Nrf2^{BW} mit HCT15-*mock*^{TW} festgestellt (siehe Abbildung 21).

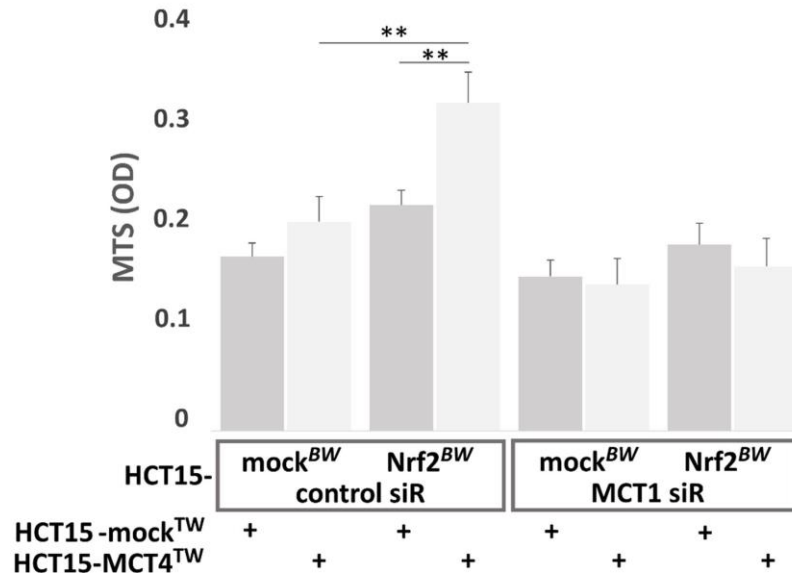


Abbildung 21: Der Nrf2- und MCT1-abhängige Laktataustausch fördert das Wachstum und das Überleben von HCT15 Zellen. HCT15 Zellen, MCT4-überexprimierend oder nicht (Transwell: HCT15-MCT4^{TW} bzw. HCT15-*mock*^{TW}), wurden indirekt mit HCT15 Zellen, Nrf2-überexprimierend oder nicht (HCT15-Nrf2^{BW} bzw. HCT15-*mock*^{BW}), im *bottom well* kokultiviert. Zuvor wurden die HCT15-Nrf2^{BW} bzw. HCT15-*mock*^{BW} mit Kontroll siRNA oder MCT1 siRNA behandelt. Zellen der *bottom wells* wurden nach Kokultur mittels MTS-Assay auf die Zellviabilität analysiert. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung aus fünf von einander unabhängigen Versuchen; **p<0.02.

In Zusammenschau der Ergebnisse aus den ¹⁴C-Laktat-Versuchen aus dem Kapitel 3.5 kann die höhere Zellzahl der HCT15-Nrf2^{BW} nach Kokultur mit HCT15-MCT4^{TW} so gedeutet werden, dass es bei den *bottom well*-Zellen zu einem Nrf2-induzierten Laktatimport über MCT1 kommt. Ebendieses Laktat wird von den Transwell-Zellen bereitgestellt und über MCT4 exportiert. Es kommt demnach zu einer metabolischen Vergesellschaftung der beiden Kompartimente, welche zum Vorteil der MCT1-überexprimierenden Zellen einen fördernden Effekt auf ihr Wachstum und Überleben hat.

Als Nächstes sollte an den HCT15 Zellen untersucht werden, ob es durch den Laktataustausch zu einem Schutz vor Apoptose nach einer Behandlung mit TRAIL kommt. Hierzu wurden die HCT15 Zellen für 24 h kokultiviert und die *bottom well*-Zellen im Anschluss für 8 h mit TRAIL behandelt oder unbehandelt gelassen.

Schließlich wurden die Caspase-3,-7-Aktivität und die Proteinexpression von PARP-1 in den *bottom well*-Zellen beurteilt. Die proteolytische Spaltung von PARP-1 (Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1) durch Caspase-3 ist ein Zwischenschritt und Indikator der Apoptose. Der Nachweis des Spaltungsprodukts von PARP-1 korreliert also mit der Apoptoseaktivität der Zellen.

Wie in Abbildung 22 zu erkennen, waren mit HCT15-MCT4^{TW} kokultivierte HCT15-*mock*^{BW} Zellen leicht geschützt vor TRAIL-induzierter Apoptose im Vergleich zur Kokultur mit HCT15-*mock*^{TW}. Nach der Kokultur mit HCT15-*mock*^{TW} zeigten HCT15-Nrf2^{BW} Zellen einen höheren Schutz vor TRAIL-induziertem Zelltod als die HCT15-*mock*^{BW}.

Interessanterweise zeigte sich der höchste Schutz vor Apoptose bei HCT15-Nrf2^{BW} Zellen, welche mit HCT15-MCT4^{TW} kokultiviert wurden. Wurde in den HCT15-Nrf2^{BW} Zellen jedoch ein MCT1-*knockdown* durchgeführt, war der schützende Effekt durch die Kokultur mit HCT15-MCT4^{TW} Zellen aufgehoben (siehe Abbildung 22).

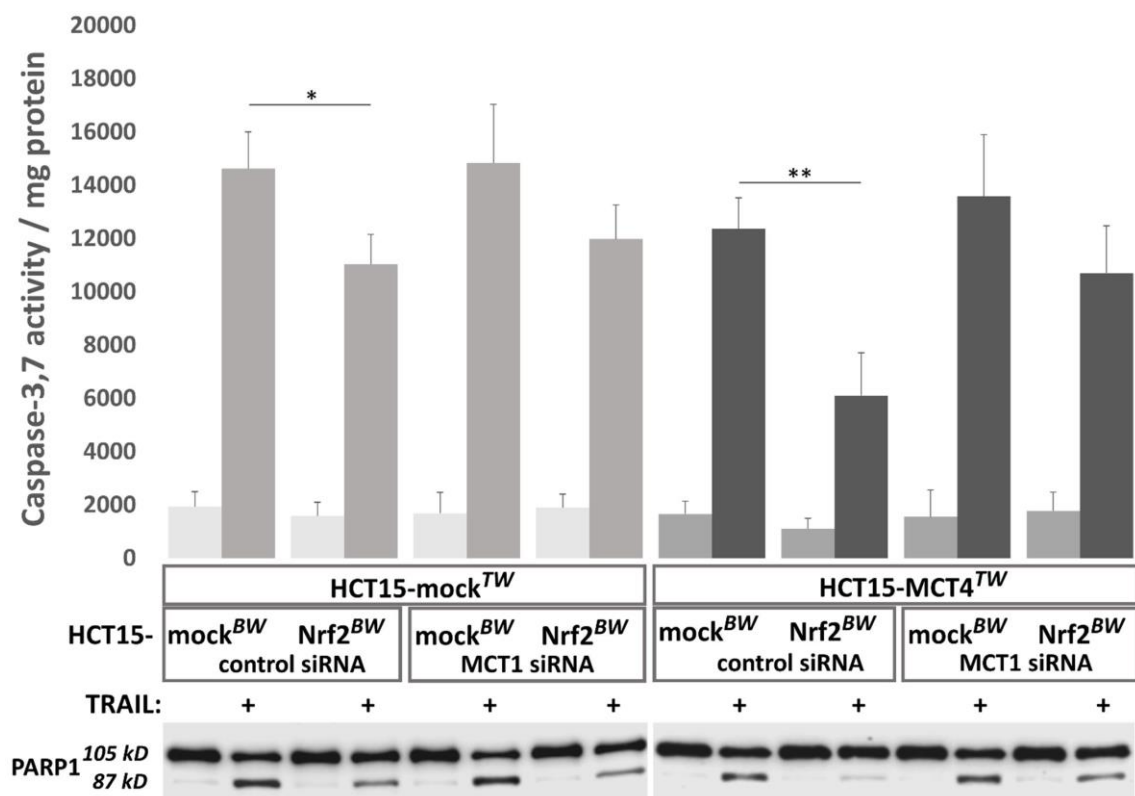


Abbildung 22: Der Nrf2- und MCT1-abhängige Laktataustausch schützt HCT15 Zellen vor TRAIL-induzierter Apoptose. Nach Kokultur mit HCT15^{TW} Zellen, MCT4-überexprimierend oder nicht, wurden HCT15 Zellen des unteren Kompartiments (HCT15-Nrf2^{BW} bzw. HCT15-*mock*^{BW} und mit oder ohne *knockdown* von MCT1 mittels siRNA für 8 h mit TRAIL (+) behandelt oder nicht. Anschließend wurde die Apoptose mittels der Caspase-3,-7-Aktivität/ μ g Protein in den HCT15^{BW} Zellen gemessen und die Proteinexpression von (gespaltenem) PARP-1 aus den Gesamtzelllysaten im

Westernblot analysiert (unteres Feld). Die gezeigten Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs unabhängigen Versuchen; * $p < 0.05$ & ** $p < 0.02$.

3.7 Unterschiedliche Lokalisation der Laktattransporter in kolorektalen Karzinomzelllinien

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf die Existenz einer durch Nrf2 herbeigeführten metabolischen Kompartimentierung zwischen Tumor- und Stromazellen, einhergehend mit einer reziproken Verteilung der Laktattransporter (MCT1 und MCT4) und Überexpression von MCT1 auf den KRK-Zellen, hin. Es stellte sich die Frage, ob es auch auf subzellulärer Ebene in KRK-Zellen zu einer differenziellen Kompartimentierung der MCT1 bzw. MCT4 Expression kommt. Um dies an den malignen KRK-Zelllinien SW403 und HT29 zu untersuchen, wurde die Methode der doppelten Immunfluoreszenzfärbung auf Deckgläsern eingesetzt (Abbildung 23).

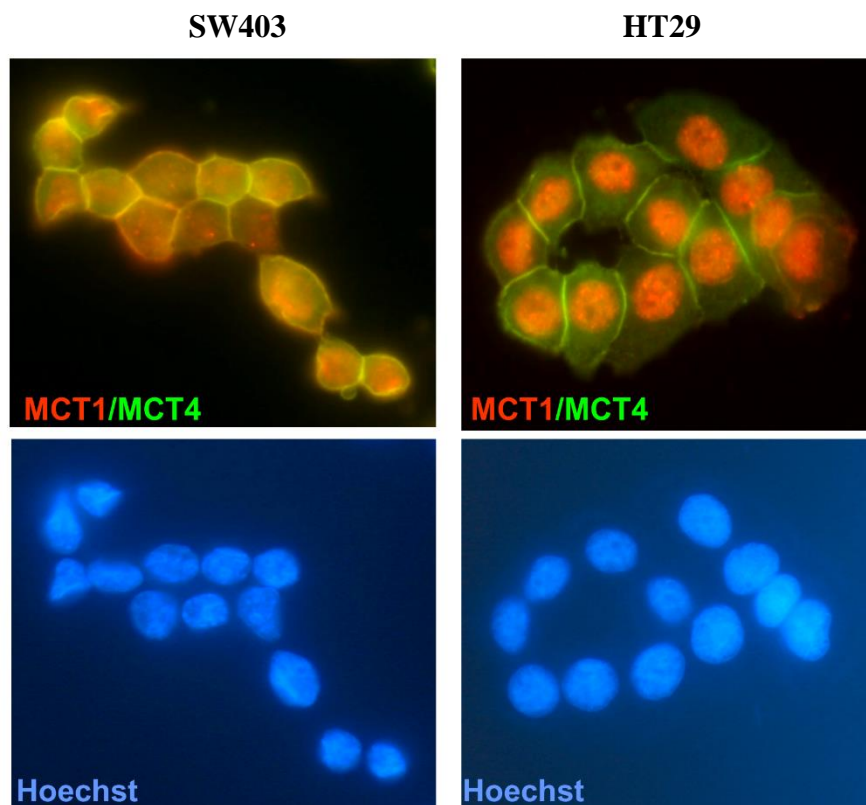


Abbildung 23: Lokalisation von MCT1 und MCT4 auf den KRK-Zelllinien SW403 und HT29. Doppelte Immunfluoreszenzfärbung von SW403 und HT29 für MCT1 (rot), MCT4 (grün) und jeweils Gegenfärbung der Zellkerne mit Hoechst (blau). 800-fache Vergrößerung.

Der Abbildung 23 ist zu entnehmen, dass die Zellen der Linie SW403 sowohl MCT1 als auch MCT4 in ausgewogenem Verhältnis auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Dies ist an der Gelbfärbung zu erkennen, die aus der Überlagerung der MCT1-Färbung in rot und MCT4 in grün resultiert. Die Zellen der Linie HT29 zeigten ebenfalls eine deutliche Expression von MCT4, jedoch kaum eine Expression von MCT1 auf ihrer Zelloberfläche. Überraschenderweise war in HT29 Zellen jedoch eine starke nukleäre Lokalisation von MCT1 (Abbildung 23) festzustellen. Eine vergleichbare nukleäre Präsenz von MCT1 war in den SW403 Zellen nicht auszumachen, wenngleich auch hier eine leichte rote Kernfärbung nachweisbar war, die auf nukleäres MCT1 hindeutet (Abbildung 23).

Um die beobachteten Expressionsmuster zu verifizieren, wurden von beiden unbehandelten Zelllinien Gesamtzelllysate und Zellkernlysate angefertigt, welche auf einem Westernblot für die Detektion von MCT1 und MCT4 aufgetragen wurden (Abbildung 24).

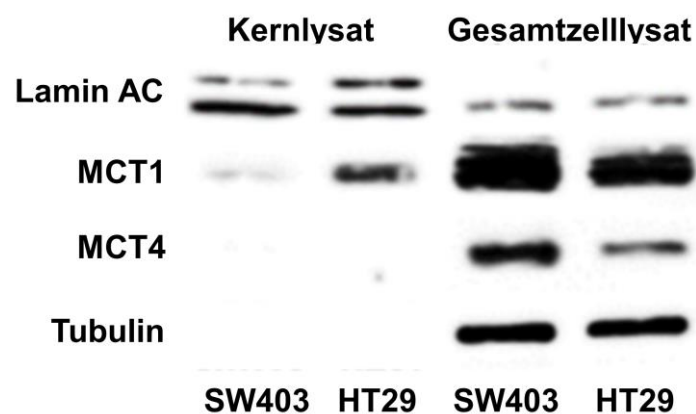


Abbildung 24: Lokalisation von MCT1 und MCT4 auf den KRC-Zelllinien SW403 und HT29. Westernblot zeigt Zellkernlysate (Kernlysate) und Gesamtzelllysate beider Zelllinien, unbehandelt. Lamin AC: Lamin A dient dem Nachweis nukleären Proteins; Tubulin dient dem Nachweis zytoplasmatischen Proteins.

Im Westernblot bestätigte sich die Erkenntnis, dass es zu einer differenziellen Verteilung von MCT1 in beiden Zelllinien kommt. Die Zellkernlysate von HT29 zeigen eine eindeutige nukleäre Expression von MCT1. Auch die Zellen der Linie SW403 scheinen eine marginale nukleäre Expression von MCT1 aufzuweisen. Eine Verunreinigung mit zytoplasmatischen Proteinen wurde mittels fehlendem Tubulinnachweis im Zellkernlysate ausgeschlossen.

Insgesamt zeigen die SW403 Zellen eine höhere Expression von beiden Laktattransportern, in beiden Zelllinien überwiegt aber MCT1, wobei das MCT1 in den HT29 Zellen eher nukleären Ursprungs ist.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am Beispiel der entzündlichen Karzinogenese des Darmes, die diesbezügliche Rolle von Nrf2 bei der Tumorentstehung näher zu beleuchten. Insbesondere die Folgen einer deregulierten Nrf2-Aktivität – in Form einer Modulation des Stoffwechsels und der metabolischen Kompartimentierung – waren hierbei von Interesse.

4.1 Bedeutung der reziproken Expression von MCT1/MCT4 als Ausdruck für Malignitäts-fördernde Kompartimentierung und reversen Warburg-Effekt

Die Literatur bietet reichlich Hinweise dafür, dass das maligne Potential des Transkriptionsfaktors Nrf2 entweder durch andere Protoonkogene gefördert wird oder Nrf2 selbst als Protoonkogen fungiert und das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen fördert (DeNicola et al. 2011; Geismann et al. 2014; Sebens et al. 2011). Im Zuge der Heraufregulation von antioxidativen und detoxifizierenden Signalwegen werden auch Stoffwechselwege aktiviert wie bspw. der Pentosephosphatweg (PPP). Dieser wiederum stellt zum einen die Grundlage für die Produktion von DNA-Bausteinen dar und sein vermehrter Umsatz ermöglicht eine rasche Zellteilung (Hayes und Dinkova-Kostova 2014; Mitsubishi et al. 2012). Zum anderen dient der PPP über die Oxidation von Glukose-6-phosphat (G-6-P) als Schlüsselreaktion zur Generierung des zellulären Antioxidans Glutathion.

Solche Reprogrammierungen im Stoffwechsel (prä-)kanzeröser Zellen finden sich auch bei kompartimentierenden Prozessen wie dem Warburg- und dem reversen Warburg-Metabolismus. Dabei erzielen der Austausch und die Wiederverwertung von bspw. Laktat – für das hypoxische Kompartiment ein Abfallprodukt aus der Glykolyse, für das aerobe Kompartiment hingegen ein wertvoller Energieträger – einen beidseitigen Überlebensvorteil und eine Ausstattung mit Malignitätsmerkmalen auf der Seite des Konsumenten (Fiaschi et al. 2012). Um diese symbiotische Beziehung eingehen zu können, wird in beiden Kompartimenten die reziproke Expression der entsprechenden Monocarboxylattransporter (MCTs) heraufreguliert. Dabei ist MCT1 in der Lage,

Laktat über die Zellmembran nach intrazellulär einzuschleusen und MCT4 hingegen, das Laktat nach extrazellulär zu befördern.

Bzgl. des KRK sind die bisherigen Erkenntnisse hinsichtlich des Expressionsmusters der verschiedenen Laktattransporter kontrovers, da die klinischen Auswirkungen der Expression von MCT1 und MCT4 in Abhängigkeit von räumlicher und zeitlicher Verteilung variieren (Lambert et al. 2002; Nakayama et al. 2012; Martins et al. 2016). Möglicherweise beruhen die unterschiedlichen Ergebnisse u. a. auf einer mangelnden Antikörperspezifität. Durchaus aber existieren Daten zu MCT1 im KRK, welche eine schlechtere klinische Prognose im Falle einer Überexpression belegen (Koukourakis et al. 2006; Ferro et al. 2016). Darüber hinaus wurde eine direkte örtliche Nähe von MCT1-positiven KRK-Zellen zu Gefäßeinbrüchen beschrieben (Pinheiro et al. 2008). Letzteres deutet zum einen darauf hin, dass MCT1-überexprimierende Zellen durch hohe Invasivität ausgezeichnet sind und zum anderen, dass sie durch die benachbarten Gefäße einer besseren Versorgung mit Sauerstoff ausgesetzt sind.

Auch zu anderen Tumorentitäten finden sich Daten hinsichtlich der Expression von Laktattransportern und ihrer klinischen Bedeutung. Wie am Beispiel vom Mammakarzinom gezeigt, korreliert das Maß der Expression von MCT4 im Tumorstroma mit der Mortalität der Patientinnen (Witkiewicz et al. 2012). In einer anderen Studie zum Prostatakarzinom konnte die Korrelation zwischen MCT1-Expression auf Tumorzellen und einer schlechten Prognose für die Patienten dargelegt werden (Pértega-Gomes et al. 2014). Demnach scheint es zu einer festgelegten Aufgabenteilung zwischen sauerstoffreichen Karzinomzellen mit überexprimiertem MCT1 auf der einen Seite und hypoxischem Stroma mit MCT4 auf der anderen Seite zu kommen. Eine andere Studie beschreibt anhand von Kopf-Hals-Tumoren aber auch die Konstellation, dass es zu drei Kompartimenten innerhalb einer Tumormasse kommt. Dabei existieren neben den zwei typischen reversen Warburg-Kompartimenten noch die hypoxischen, MCT4-positiven Karzinomzellen, welche eine niedrige Proliferationsrate aufweisen, ihr Vorkommen aber dennoch mit einem verkürzten krankheitsfreiem Überleben assoziiert ist (Curry et al. 2013). Diese Tatsache lässt sich mit der These erklären, dass die MCT4-positiven Zellen die MCT1-positiven Karzinomzellen auf eine Weise mit Laktat versorgen, die ihnen zu einer schnelleren Proliferation verhilft und somit die Malignität des gesamten Tumors potenziert wird. Wiederum beschreibt eine weitere wissenschaftliche Arbeit, dass die übermäßige Expression von MCT4 in HCC-

Zellen sowohl mit schlechtem Ansprechen auf die Therapie mit TACE¹⁸, als auch mit niedrigen Überlebensraten einhergeht (Gao et al. 2015).

Ausgehend von diesen Literaturrecherchen und Überlegungen war es Gegenstand unseres Interesses, zu untersuchen, ob es auch bei KRK und CED – als einer wesentlichen Risikokonstellation – zu einer metabolischen Kompartimentierung kommt und inwieweit hier Nrf2 die Expression von MCT1 bzw. MCT4 beeinflussen kann. Zunächst legten die immunhistochemischen Untersuchungen aufgrund der offensichtlichen Koexpression von Nrf2 und MCT1 in Geweben von KRK und CED nahe, dass sie diesbezüglich im Zusammenhang stehen. Darüber hinaus konnte eine reziproke Expression von MCT1 und MCT4 beobachtet werden, d. h. beide Transporter wurden jeweils von unterschiedlichen Zellverbänden exprimiert: Positiv für MCT1 waren die epithelialen, während positiv für MCT4, die stromalen Anteile waren. Mithilfe des Markers CD68 konnte im Gewebe von CED-Patienten der Nachweis einer Infiltration des Stromas mit Makrophagen geführt werden. Diese Einblicke ließen die Annahme zu, dass die metabolische Kompartimentierung im Sinne eines reversen Warburg-Effektes auch in der Karzinogenese des KRK stattfindet, dass das aktivierte Nrf2 mit der Überexpression von MCT1, aber nicht von MCT4 korreliert und dass Makrophagen dabei eine Rolle spielen könnten.

Die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Untersuchungen lassen sich mit den Aussagen von Witkiewicz und Pértega-Gomes insofern in Einklang bringen, als dass Karzinomzellen stets das (vermutlich sauerstoffreiche) MCT1-exprimierende Kompartiment, während die Stromazellen das (vermutlich hypoxische) MCT4-exprimierende Kompartiment darstellen. Es existiert aber noch die Hypothese der intratumoralen Heterogenität. Demnach besteht innerhalb von einer Tumormasse ein Gradient für die Sauerstoffkonzentration, abhängig von der Nähe der Zellen zur Gefäßversorgung. Die hypoxischen Tumorzellen nehmen hier vermehrt Glukose auf und führen diese einer anaeroben Verstoffwechslung zu, bei der Laktat produziert wird. Mittels des durch Hypoxie induzierten MCT4 wird das Laktat von ihnen ausgeschleust und von den normoxischen Tumorzellen über MCT1 aufgenommen und der oxidativen Phosphorylierung zur Energiegewinnung zugeführt (Abbildung 25) (Pisarsky et al. 2016).

¹⁸ Die Transarterielle Chemoembolisation (TACE) stellt ein minimalinvasives, radiologisches Verfahren zur Therapie des inoperablen HCCs bzw. von Lebermetastasen dar.

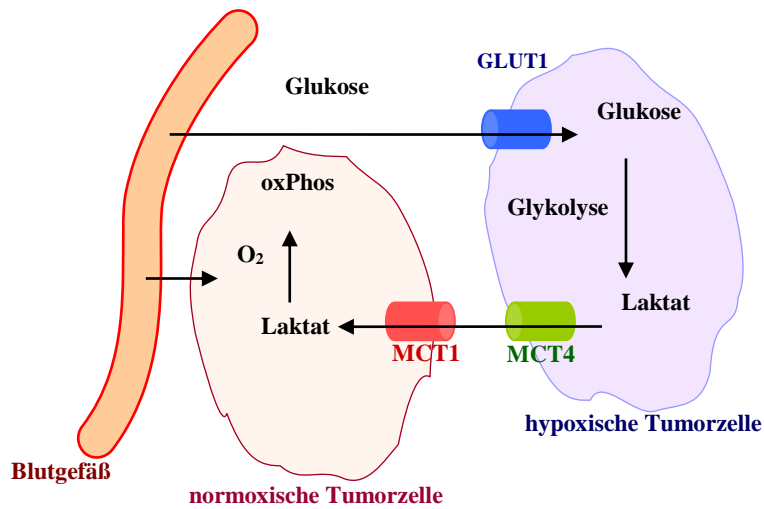


Abbildung 25: Modell zur metabolischen Kompartimentierung bei intratumoraler Heterogenität basierend auf reziproker Expression von MCT1/MCT4. Bei bestehendem Sauerstoffgradienten innerhalb der Tumormasse kommt es zur Ausbildung einer metabolischen Kompartimentierung. Demnach nehmen Tumorzellen in hypoxischen Regionen vermehrt Glukose auf und produzieren mittels der anaeroben Glykolyse Laktat, welches *via* MCT4 aus der Zelle exportiert wird. Dieses Laktat wird von den normoxischen Tumorzellen *via* MCT1 aufgenommen und dem Citratzyklus und anschließend der oxidativen Phosphorylierung zugeführt (*oxPhos*). Infolgedessen reduzieren Tumorzellen in normoxischen Regionen ihren Glukosekonsum, was in einer verlängerten Diffusionsstrecke für Glukose resultiert und für eine Konsolidierung der metabolischen Kompartimentierung und Arbeitsteilung sorgt (angepasst an Pisarsky et al. 2016).

Die Daten von Curry et al. zeigen auf, dass es sich nicht immer streng um zwei metabolische Kompartimente handeln muss, sondern dass es auch innerhalb von Tumorzellverbänden zur Aufgabenteilung kommen kann. Dies könnte bedeuten, dass Karzinomzellen unter instabilen Bedingungen in ihrem Mikromilieu, bezogen auf z. B. Sauerstoff- und Glukoseangebot, auch untereinander heterogene Eigenschaften ausbilden können. Somit wäre es möglich, dass die vorerst MCT1-exprimierenden Karzinomzellen bei Sauerstoffabfall flexibel zum glykolytischen Typ mit MCT4-Expression wechseln können. Solange ihnen von den weiterhin aerob arbeitenden Zellen das Laktat „abgenommen“ wird, profitieren beide Kompartimente von einem Überleben. Es könnte sich bei dem reversen Warburg-Effekt also eher um einen dem Wandel unterworfenen symbiotischen Prozess als um ein starres Modell handeln, bei

dem es sowohl räumlich als auch zeitlich zu variierenden Modalitäten des Metabolitenaustausches sowie seiner Auswirkungen kommen kann (Abbildung 26).

Die Daten von Gao et al. zum HCC stehen insofern in Diskrepanz zu den eigenen Ergebnissen, als dass die Überexpression von MCT4 in HCC mit einer schlechteren Prognose einhergeht, während unsere Daten die Überexpression von MCT1 mit einer erhöhten Malignität in Verbindung bringen. Ein Erklärungsansatz ist, dass Tumorzellen im eigentlichen Sinne eher dafür bekannt sind, in hohem Maße Glykolyse zu betreiben und hierbei Laktat anzusammeln. Über die diagnostischen Aspekte des HCC ist bekannt, dass es in der Kontrastmittelbildgebung irreguläre Vaskularisation aufweist, in der Sonographie variabel erscheinen mag (homogen oder inhomogen) und auch pathologisch häufig innerhalb der Tumormasse unterschiedlich konfiguriert ist. All dies sind Hinweise für teils hypoxische Bedingungen, aufgrund welcher die Tumorzellen auf eine hohe MCT4-Expression angewiesen sind, um nicht an ihrem Laktat zu übersäuern (Ke et al. 2014). Die Überexpression von MCT4 kann also als ein Adaptionsmechanismus an Hypoxie verstanden werden. Ein weiterer Erklärungsansatz für die diskrepanten Ergebnisse ist eine seit langem bekannte Tatsache, dass bei der bakteriellen Fermentation von Kohlenhydraten im Darm Buttersäure entsteht, welche einen Hauptenergieträger der Kolonozyten darstellt. Ebendiese Buttersäure wird hauptsächlich über MCT1 apikal in die Zellen aufgenommen und überdies vermag sie noch die Expression von MCT1 zu stimulieren (Borthakur et al. 2008). Demnach ist, ausgehend von den Primärzellen der unterschiedlichen Tumorentitäten, die Expression von MCT1 in Zellen des KRK eher zu erwarten, als in Zellen des HCC.

Schlussfolgernd wäre also eine mögliche Modalität, dass Tumoren des KRK größtenteils aus MCT4-überexprimierenden Karzinomzellen bestehen und nur ein kleiner Anteil der Zellen MCT1 überexprimiert, was sich in einer für größere Malignität verantwortlichen Bedingung widerspiegelt, basierend auf der metabolischen Kompartimentierung bzw. Symbiose. Hierbei könnte Nrf2 ein entscheidender Regulator sein, der die MCT1-Expression in einer Teilmenge von KRK-Zellen antreibt, welche einer MCT4-exprimierenden Umgebung gegenüberstehen. Letztere unterliegt dabei v. a. der Kontrolle durch HIF-1 α ¹⁹ (Ullah et al. 2006).

¹⁹ Der Hypoxie-induzierter Faktor 1 α (HIF-1 α) ist ein für die Zelladaptation an Sauerstoffmangel verantwortlicher Transkriptionsfaktor.

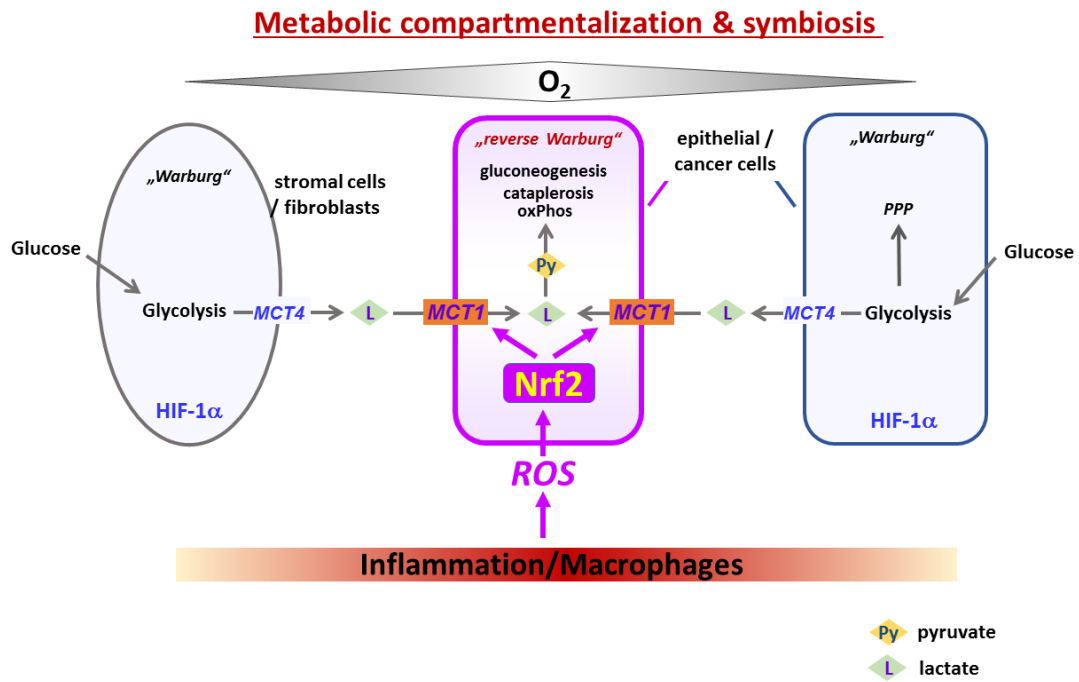


Abbildung 26: Vorgeschlagenes Modell zum durch oxidativen Stress und Nrf2-Induktion vermittelten MCT1-abhängigen Laktataustausch in KRK. Verursacht durch eine persistierende Exposition des Kolonepithels gegenüber oxidativem Stress – z. B. während einer chronischen Entzündung durch inflammatorische Makrophagen lokal freigesetzte ROS – erfahren maligne wie prä-maligne Kolonozyten Nrf2-abhängigen Zellschutz, welcher die Hochregulation von MCT1 einschließt. Die hohe MCT1-Expression befähigt diese Zellen zum Laktatimport aus der Mikroumgebung, bestimmt durch den Status der Sauerstoffversorgung sowie der HIF-1 α -Aktivierung, wobei das Laktat von den hochglykolytischen und Laktat ausschleusenden (*via* MCT4) Karzinom- und/oder Stromazellen („Warburg-Zellen“) stammt. Mittels der Laktataufnahme und dessen Umwandlung zu Pyruvat können diese MCT1-überexprimierenden Zellen die oxidative Phosphorylierung (*oxPhos*), aber auch kataplerotische Stoffwechselwege und gar die Glukoneogenese aufrecht erhalten. Als Bestandteil der Nrf2-abhängigen Zellprotektion, sowohl im KRK als auch bereits während einer CED, könnte sich somit der reverse Warburg-Effekt manifestieren (angepasst an Yoshida 2015; Nakajima und van Houten 2013).

4.2 Regulation der Expression von MCT1

Basierend auf den Befunden anhand der Immunfärbungen von KRK- und CED-Geweben, sollte zunächst v. a. untersucht werden, ob Nrf2 in (prä-)malignen Kolonepithelzellen nicht nur die Expression von Metabolismusenzymsen, sondern auch der beiden Laktattransporter beeinflusst. Dies konnte *in vitro* mithilfe von Nrf2-Aktivatoren oder einer Nrf2-Überexpression am Beispiel von prä-malignen NCM460 und malignen HCT15 Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigt werden. So vermag Nrf2 die Expression von MCT1 zu erhöhen, wie auch die von

G6PD, LDHB, NQO1, TALDO1 oder TKT, wohingegen die Expression von MCT4 durch Nrf2 inhibiert wird.

Während viele der metabolischen Gene, G6PD oder TALDO1 eingeschlossen, direkt über ihre ARE-Promoterregion durch Nrf2 induzierbar sind, existiert eine solche Promoterregion für MCT1 nicht. Dafür wurden zwei Bindungsstellen beschrieben, CREB/AP1²⁰ (Hadjiagapiou et al. 2005), welche mit dem Transkriptionsfaktor ATF3²¹ interagieren (Hai et al. 1999). Den jüngsten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zufolge (Dinges, L. A., med. Diss., noch nicht abgeschlossen), resultiert die Heraufregulation von MCT1 durch Nrf2 aus dessen Interferenz mit der supprimierenden Aktivität von ATF3. Hierbei führt die Aktivierung von Nrf2 zur Aufhebung der ATF3-bedingten transkriptionellen Hemmung des MCT1-Promotors. Hierfür ist offensichtlich die selektive Induktion der C-terminal modifizierten Spleißvariante ATF3 Δ zip2a (Hashimoto et al. 2002) verantwortlich. ATF3 Δ zip2a selbst hemmt kompetitiv die Rekrutierung von ATF3-Korepressoren an die CREB/AP1 Bindungsstellen (hier vornehmlich die proximale Bindungsstelle) im Promotor von MCT1. Aus dieser ATF3 Δ zip2a-abhängigen Derepression der MCT1-Expression resultiert so der induktive Effekt von Nrf2 (Diehl et al. 2017).

Darüber hinaus wurden noch weitere Regulationsmechanismen für die Expression der Laktattransporter beschrieben: Der zelloberflächliche Laktatrezeptor GPR81²², welcher auch in Zelllinien des KRK zu finden ist, steigert *in vitro* am Beispiel des Pankreaskarzinoms (PDAC) die Expression von MCT1 und MCT4 in Anwesenheit von Laktat. Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor erfüllt demzufolge die Funktion eines Laktatsensors. Interessanterweise korreliert ein erhöhtes GPR81-Expressionsniveau im PDAC-Gewebe mit einer erhöhten Tumorstadiumsrate und Metastasierungsneigung (Roland et al. 2014). Des Weiteren wurde von Boidot et al. beschrieben, dass eine *loss of function*-Mutation von p53²³ sowohl *in vitro* z. B. in KRK-Zellen als auch *in vivo* in Brustkrebsgewebe die MCT1-Expression und einen Laktatexport nach extrazellulär infolge gesteigerter Glykolyse verstärkt, sofern hypoxische Zustände vorherrschen. In

²⁰ *CAMP-response element-binding protein* (CREB) und AP1 sind Transkriptionsfaktoren.

²¹ *Activating transcription factor-3* (ATF3).

²² G-Protein gekoppelter Rezeptor 81.

²³ Protein 53 (p53) ist ein Tumorsuppressor, welcher als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Induktion der Apoptose und DNA-Reparatur beteiligt sind, reguliert. Aufgrund dieser Eigenschaft wird p53 als „Wächter des Genoms“ bezeichnet und seine besondere Bedeutung erklärt sich dadurch, dass es in etwa 50 % aller menschlichen Tumoren mutiert ist (Lane 1992).

Gegenwart von Sauerstoff jedoch, kommt es zum Laktatimport über MCT1 und im Zuge der oxidativen Phosphorylierung zur Zellproliferation, wenn den Zellen Glukose entzogen wird. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine MCT1-Erhöhung in p53-defizienten Tumoren ihnen die Anpassung an metabolische Erfordernisse, jeweils in Abhängigkeit der Glukoseverfügbarkeit, mittels der Forcierung entweder des Laktatimports oder -exports erlaubt (Boidot et al. 2012). Im Rahmen eigener Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch keine signifikante Veränderung der MCT1-Expression in Abhängigkeit vom p53-Status, z.B. in HCT116 KRK-Zellen, gezeigt werden (Hesse 2017).

Ein weiterer Regulationsmechanismus, der für die Expression von MCT1 in humanen und murinen pankreatischen β -Zellen identifiziert worden ist, besteht in der Wirkung der mikroRNA(miR)-29b, welche in der Lage ist, selektiv an den 3'-untranslatierten Bereich der MCT1-mRNA zu binden und somit die Translation zum Protein zu inhibieren (Pullen et al. 2011). Interessanterweise liefert eine gesonderte Studie am Beispiel der AML eine Verbindung zwischen dem posttranskriptionellem Gen-*Silencing* des MCT1 durch miR-29b einerseits und der inhibierenden Regulation von miR-29b durch Nrf2 andererseits (Shah et al. 2015). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Regulation der miRNA durch Nrf2 das Überleben leukämischer Zellen fördert. In Anbetracht dieser Daten erscheint es also möglich, dass Nrf2 eine zentrale Rolle in der Regulation der MCT1-Expression spielt und diese auf unterschiedlichen Wegen beeinflusst.

4.3 Metabolische Reprogrammierung und Laktatverwertung im Rahmen der Nrf2-Aktivierung

Anhand der zunächst durchgeführten Stoffwechselanalyse von Nrf2-induzierten NCM460 und HCT15 Zellen mittels des Seahorse Analyzers ergaben sich Hinweise darauf, dass die Nrf2-vermittelten Stoffwechselveränderungen zu einer gesteigerten Laktataufnahme und oxidativen Phosphorylierung desselben führen, während die Glukoseaufnahme davon offensichtlich nicht beeinflusst wird. In weiterführenden metabolischen Versuchen mittels 2-Desoxy-Glukose Biolumineszenz Assay bestätigte sich, dass es in den beiden Zelllinien zu keiner herabgesetzten Glukoseaufnahme nach Nrf2-Aktivierung kam. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Nrf2-abhängige Erhöhung der ^{14}C -Laktataufnahme unter wesentlicher Beteiligung von MCT1. Aufgrund dessen

und hinsichtlich der Tatsache, dass die Azidifizierungsrate abnahm, der Sauerstoffverbrauch in der Seahorse-Messung jedoch keine Änderung zeigte, kann gefolgert werden, dass die Nrf2-abhängigen Veränderungen nicht auf die Verminderung der Glukoseverstoffwechslung zurückzuführen sind, sondern eher den reversen Warburg-Effekt mit seiner charakteristischen Laktataufnahme und -verstoffwechslung widerspiegeln. Somit fördert Nrf2 als Schlüsselvermittler diese bestimmte metabolische Reprogrammierung. Teils im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse von Fiaschi et al., wonach die Interaktion zwischen CAFs²⁴ und Prostatakarzinomzellen zwar ebenfalls zu einer gesteigerten Laktataufnahme in den Karzinomzellen, aber auch zu einer Reduktion der Glukoseaufnahme und der korrespondierenden GLUT1-Expression führt (2012).

Das aufgenommene Laktat wird nach Umwandlung zu Pyruvat mittels LDHB²⁵, deren Expression ebenfalls durch Nrf2 induziert wird, der mitochondrialen Atmungskette zugeführt und zur Generierung von ATP genutzt, ganz im Sinne des reversen Warburg-Effektes. Die LDHB führt das Laktat dem wiederverwertenden Metabolismus zu, da diese Reaktion von dieser Enzymvariante thermodynamisch bevorzugt wird, während die entgegengesetzte exergone Reaktion von Pyruvat zu Laktat durch LDHA erfolgt. Somit deutet eine hohe Expression von LDHB bzw. eine hohe LDHB/LDHA *ratio* (Boidot et al. 2012) auf eine Regeneration von Pyruvat hin (Schueren et al. 2014). Unwahrscheinlich jedoch ist, dass LDHB als Malignitätsmarker dienen kann, denn eine hohe Laktatproduktion im Sinne eines klassischen Warburg-Effektes ist die Regel bei Tumoren und eine hohe Expression von LDH5 (LDHA) korreliert in vielen Fällen mit einer schlechten Prognose (Kim et al. 2014).

Die Daten aus dem Seahorse-Versuch deuten auf einen *shift* des Laktats von extra- nach intrazellulär hin. Scheinbar gering im Vergleich dazu - wenn man von einer neu aufgenommenen Laktatveratmung ausgeht - steigt die OCR an, die die mitochondriale Veratmung kennzeichnet. Von dieser Annahme ausgehend, muss das Laktat, abgesehen von der Generierung von Energie, noch andere Funktionen erfüllen. Das Substrat könnte möglicherweise zur Bereitstellung für den direkten Einfluss auf das Epigenom dienen (siehe 4.6).

²⁴ *Carcinoma-associated fibroblasts* (CAFs).

²⁵ Die Laktatdehydrogenase B (LDHB) ist die B-Untereinheit (auch als H-Untereinheit bekannt) vom Enzym LDH und katalysiert die reversible Umwandlung von Laktat zu Pyruvat (Ding et al. 2017). Eine Isoform des LDHs, die LDH1 (Herz), besteht aus 4 Untereinheiten von LDHB, wobei LDH5 (Leber, Skelettmuskel) aus 4 Untereinheiten LDHA besteht.

4.4 Einfluss von Makrophagen auf metabolische Kompartimentierung und Entwicklung von Malignitätsmerkmalen bei Karzinomzellen

Unsere immunhistologischen Untersuchungen hatten bereits deutlich auf einen Zusammenhang zwischen der Infiltration von Makrophagen in der entzündeten Darmmukosa von CED-Patienten und der Ausbildung einer reziproken Expression von MCT1 und MCT4 hingedeutet. Somit stellt die Anwesenheit von inflammatorischen Makrophagen, die mittels ihrer ROS-Produktion Nrf2-abhängig die MCT1-Expression antreiben, einen wesentlichen Faktor dar, welcher die metabolische Symbiose auf dem Boden der differenziellen MCT-Expression unterstützt. Diese Annahme konnte durch unsere Untersuchungen an prämaligen NCM460 Zellen am Modell der indirekten Kokultur mit inflammatorischen bzw. antiinflammatorischen M1- und M2-Makrophagen untermauert werden. In Anwesenheit von M1-Makrophagen konnte eine durch ROS vermittelte und von Nrf2-abhängige Induktion von den schon zuvor beschriebenen metabolischen Genen gezeigt werden – sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Die Fähigkeit von M1-Makrophagen, mittels ROS-Generierung Nrf2 zu induzieren, wurde schon von Sebens et al. (2011) beschrieben. Auch seitens der M1-Makrophagen kam es unter Kokultur mit NCM460 Zellen zu einer Zunahme der MCT4-Expression, was für die Ausbildung einer symbiotischen Wechselwirkung im Laufe der Kokultur spricht. Folglich bestätigen die Ergebnisse aus der Kokultur die schon oben beschriebene Vermutung bezüglich der Rolle der CD68-positiven Makrophagen im Stroma der Gewebeschnitte aus Patienten mit CED.

Tatsächlich konnte in den Versuchen zur ¹⁴C-Laktataufnahme belegt werden, dass hier die Kokultur mit M1-Makrophagen die Aufnahme von Laktat in den NCM460 und HCT15 Zellen unter Glukosedepriuation wesentlich erhöht hat und dass die Aufnahme über den Laktat-carrier MCT1 erfolgte. Diese Daten erhärten das Argument, dass MCT1 und MCT4 den Laktatimport respektive -export in aktivierten NCM460 und HCT15 Zellen auf eine divergente Weise antreiben.

Darüber hinaus konnte mittels Caspaseassay gezeigt werden, dass M1-Makrophagen Nrf2-abhängig einen Apoptoseschutz vor TRAIL über die Induktion von MCT1 und G6PD in NCM460 Zellen herbeiführen. Demnach trägt v. a. MCT1 wesentlich zu dieser protektiven Wirkung durch M1-Makrophagen bei, während MCT4 nicht am schützenden Effekt von M1-Makrophagen auf NCM460 Zellen beteiligt zu sein scheint. Die

promigratorische und wachstumsfördernde Wirkung von G6PD wurde schon an anderer Stelle an HeLa²⁶ Zellen beschrieben (Fang et al. 2016), sodass in der Zusammenschau unserer Ergebnisse auch G6PD eine Schlüsselrolle bei der Apoptoseprotektion zugeschrieben werden kann.

Mittels eines selektiven MCT1-Inhibitors, des 7ACC²⁷, konnte inzwischen direkt nachgewiesen werden, dass die Apoptoseresistenz von NCM460 und HCT15 Zellen vom MCT1-getriebenen Laktatimport in die Zellen abhängig ist. Die Tatsache, dass die Auswirkungen durch den *knockdown* der Metabolismogene in M1-kokultivierten NCM460 Zellen am ausgeprägtesten sind, legt die Vermutung nahe, dass die M1-Makrophagen mit ihren inflammatorischen Mediatoren, hier v. a. ROS, Nrf2-abhängige Zellantworten induzieren, in deren Verlauf auch Veränderungen im Metabolom prämaligner Zellen auftreten. Diese Verschiebungen im Stoffwechsel zum reversen Warburg-Effekt hin nehmen entsprechend Einfluss auf maligne Eigenschaften, einschließlich einer verminderten Apoptosefähigkeit.

Seit langem wird beschrieben, dass Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) in Tumorgewebe zu finden sind, was auf einen Zusammenhang zwischen der Karzinogenese und einer chronischen Entzündung schließen lässt (Virchow 1863; Bingle et al. 2002). Den TAM wurden sowohl Tumor-wachstumsfördernde als auch Tumor-destruierende Eigenschaften zugeschrieben, jeweils abhängig von den Stimuli seitens der Tumorzellen (Mantovani et al. 1992). Die meisten Studien dazu deuten darauf hin, dass TAM das Tumorstadium stimulieren und konsequenterweise mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Bingle et al. 2002). So auch die Arbeit von Oosterling et al. (2005), die anhand von einem Mausmodell zeigt, dass die Präsenz von TAM im Stroma von KKR diverse Malignitätsfaktoren impliziert und die selektive Hemmung von TAM-Funktionen daher als Strategie für neue Therapien vorgeschlagen wird. Eine gegenteilige Aussage geht aus einer Metaanalyse von Zhang et al. hervor, in der anhand von Geweben aus soliden Tumoren die Anwesenheit von TAM mit dem Überleben der Patienten verglichen wurde. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten, wirkt sich demnach die Anwesenheit von TAM im Tumorstroma positiv auf das Gesamtüberleben von KKR-Patienten aus. In dieser Studie gelang jedoch nicht der

²⁶ HeLa Zellen, benannt nach ihrer Spenderin Henrietta Lacks, sind Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, aus welchen die erste immortalisierte humane Zelllinie durch G. O. Gey in 1955 zu Forschungszwecken etabliert worden ist (Skloot 2013).

²⁷ 7-aminocarboxycoumarin (7ACC) ist ein selektiver MCT1-Inhibitor, welcher die Laktataufnahme hemmt (Draoui et al. 2014).

Nachweis eines signifikanten Einflusses auf das Überleben durch einen bestimmten – M1- oder M2-? – Phänotyp der Makrophagen (Zhang et al.2012). Grundsätzlich wurde aber sehr lange davon ausgegangen, dass vornehmlich antiinflammatorische M2-Makrophagen als TAM fungieren und so die Unterdrückung der Tumorgenese durch das Immunsystem inhibieren. Diese Ansicht wurde inzwischen vielfach revidiert und TAM sind entweder keinem M1- oder M2-Phänotyp zuordenbar oder gerade proinflammatorische, M1-ähnliche Makrophagen tragen wesentlich zur entzündlichen Karzinogenese bei (Helm et al. 2014a; Helm et al. 2014b). Somit stehen die Befunde dieser Arbeit im Einklang mit den neuen Erkenntnissen, indem v. a. M1-Makrophagen mit einer Malignitäts-fördernden Eigenschaft – hier der Induktion des reversen Warburg-Metabolismus – in Verbindung gebracht wurden.

4.5 Wachstumsvorteile durch metabolische Reprogrammierung und Kompartimentierung

In weiteren indirekten Kokultur-Versuchen mit Laktat-exportierenden (Warburg) und -importierenden (reverser Warburg) HCT15 Zellen konnte gezeigt werden, dass dieser Laktataustausch in Nrf2- und MCT1-abhängiger Weise eine Erhöhung der Apoptoseresistenz von Zellen im Laktat-aufnehmenden Kompartiment bedingt. Nrf2 sorgt aber nicht nur für eine Apoptoseresistenz, vermittelt durch Laktataufnahme über MCT1, sondern auch für höhere Proliferationsraten von HCT15 Zellen. Eine Steigerung des Wachstums infolge einer gesteigerten Laktatverstoffwechslung kann v. a. erreicht werden, indem Glukose vermehrt zur Synthese von Biomasse statt zur Energiegewinnung genutzt wird (Chartoumpakis et al. 2015), was nun ersatzweise mit Laktat als Substrat erfolgt.

Abgesehen davon zeigen die Kokultur-Ergebnisse mit den HCT15 Zellen, dass es durch differente Einflüsse auch innerhalb eines Tumorzellverbandes zu heterogenen Phänotypausprägungen derselben malignen Zellen kommen kann. Somit bestätigen diese Versuche die oben diskutierte Auffassung, dass es sich bei dem reversen Warburg-Metabolismus um mehr als nur zwei Kompartimente handeln könnte und dass nicht nur Stromazellen, sondern auch Tumorzellen das MCT4-exprimierende und Laktat-exportierende Kompartiment darstellen könnten.

Solide und v. a. bereits ausgedehnte Tumoren enthalten sowohl sauerstoffreiche als auch sauerstoffarme Anteile. Deshalb ist allein hieraus schon zu erwarten, dass sich

heterogene Populationen von Tumorzellen mit unterschiedlichen metabolischen Profilen formieren, abhängig von der Verfügbarkeit von Sauerstoff, Glukose und Laktat (Roland et al. 2014). Eine molekulare Determinante dieser Heterogenität in fortgeschrittenen Tumoren ist somit Nrf2, verbunden nicht nur mit der Adaptation an die Nutzung von Laktat als Energielieferant bei Glukoseentzug/-konkurrenz, sondern mit einer Forcierung des Überlebens und Wachstums von KRK-Zellen. Entsprechend erfahren Nrf2- bzw. MCT1-überexprimierende HCT15 Zellen im Vergleich mit HCT15 Zellen ohne Überexpression dieser Gene einen Wachstumsvorteil, wenn Glukose limitiert und Laktat verfügbar ist. Dies zeigten entsprechende MTS- und Colony Formation Assays. Der beschriebene Wachstumsvorteil bezieht sich auf eine gesteigerte Proliferation, welche im Einklang mit dem Nrf2-abhängigen Anstieg der Expression von Schlüsselenzymen des PPP, wie z. B. G6PD oder TALDO1, steht. Somit begünstigt die Aktivierung von Nrf2 die Proliferation in zweierlei Hinsicht: Indem es dazu beiträgt, dass erstens Glukose über den PPP vermehrt für die Produktion von Biomasse genutzt wird (Chartoumpakis et al. 2015) und dass zweitens alternative Energiesubstrate wie Laktat aus der Umgebung genutzt werden.

Durch den Erwerb des reversen Warburg-Metabolismus sind maligne, aber auch prä-maligne Kolonozyten somit fähig, in Zusammenarbeit mit glykolytischen Stromazellen und/oder benachbarten Tumorzellen (Warburg-Phänotyp) energieliefernde Stoffwechselprodukte wie Laktat wiederzuverwenden. Für diese reverse Warburg-Zellen resultieren vielfältige Wachstumsvorteile daraus, dass Metaboliten und Intermediärprodukte der Glykolyse (vornehmlich Laktat) aus stromalen oder benachbarten Tumorzellen zu ihnen transferiert werden (Witkiewicz et al. 2011; Pinheiro et al. 2012; Sanità et al. 2014; Witkiewicz et al. 2012; Shan et al. 2017). Nachdem Laktat durch die LDHB zu Pyruvat umgewandelt wurde, ist es imstande, in den Citratzyklus einzutreten, wo es als Substrat entweder der oxidativen Phosphorylierung (Roland et al. 2014) oder kataplerotischen Reaktionen wie der Amino- bzw. Fettsäuresynthese dient (Álvarez et al. 2016). Wenngleich von Nrf2 auch eine Glukoneogenese- und Lipogenese-hemmende Wirkung auszugehen scheint (Slocum et al. 2016), vermag die Nrf2-abhängige Steigerung der Laktataufnahme ein Substrat für die Glukoneogenese zu liefern, welche durch die aufeinander folgenden Reaktionen von LDHB, Pyruvatcarboxylase (ergibt Oxalacetat) und PEPCK/PCK²⁸

²⁸ Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK/PCK).

(ergibt Phosphoenolpyruvat) initiiert wird. In der Tat wurde am Beispiel vieler Tumoren gezeigt, dass maligne Zellen ebendiese Enzyme in hohem Maße exprimieren und auf deren Reaktionen im Hinblick auf Wachstum und Überleben, v. a. unter Glukoseentbehrung, angewiesen sind (Leithner et al. 2015; Montal et al. 2015; Vincent et al. 2015). Auch in NCM460 und HCT15 Zellen konnte die Expression von PEPCK/PCK nachgewiesen werden, jedoch blieb sie unbeeinflusst durch Nrf2 (Ergebnisse nicht gezeigt). Die vom Laktat stammenden Kohlenstoffe, eingeschleust in die Glukoneogenese, beliefern das Reservoir von Triosephosphatintermediärprodukten für die Synthese von Serin, Glycin, Glycerin-3-Phosphat oder von Hexosephosphatintermediaten für die Proteinglykosylierung (Álvarez et al. 2016). Die Glukoneogenese liefert auch Verbindungen wie Glukose-6-Phosphat (G-6-P), das in den PPP eingeschleust wird, um entweder für die Glutathionproduktion (GSH) als Lieferant von NADPH²⁹ (zur Reduktion durch die Glutathionreduktase) oder zur Generierung von Ribose-5-Phosphat zu dienen, welches einen Hauptbaustein der Nukleotidbiosynthese darstellt. Angesichts der Wirkung von Nrf2 als Schlüsselregulator bei der antioxidativen Abwehr (Hayes und Dinkova-Kostova 2014), ist das durch die Glukoneogenese bereitgestellte G-6P essentiell für die Unterhaltung des GSH, insbesondere bei einem niedrigen exogenen Glukoseangebot (Winiarska et al. 2003). Solchermaßen schlagen die Nrf2-abhängigen Effekte auf MCT1, MCT4 und G6PD eine Brücke zwischen der zellulären Adaptation an oxidativen Stress und der metabolischen Symbiose, so wie es auch im ZNS beschrieben worden ist (Bolaños 2016). Auf eine ähnliche Weise könnte Nrf2 unter entzündlichen Bedingungen, z. B. des Darmes und während der Karzinogenese des KKR, agieren. Neben der Bereitstellung von G-6-P aus Laktat als Reduktionsäquivalent zur Abwehr oxidativen Stresses, sogar in Abwesenheit von Glukose, ist der reverse Warburg-Metabolismus als Folge der Aktivierung von Nrf2 ein zentraler Aspekt seiner Onkogenität. Eine intratumorale Heterogenität tritt unseren Ergebnissen nach schon frühzeitig in Erscheinung und ist dabei unabhängig von einer ungleichmäßigen Versorgung mit Sauerstoff und/oder Glukose etc. Die ROS- und M1-Makrophagen-abhängige Induktion von Nrf2 in Kolonepithelzellen, welche besonders gegenüber Entzündung exponiert sind, begünstigt frühzeitig deren metabolische Reprogrammierung in Richtung reverser Warburg-Effekt. Das hat nicht nur direkte Auswirkungen auf die Synthese von Biomasse für Proliferation, sondern auch sehr

²⁹ NADPH ist die reduzierte bzw. protonierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphats (NADP). NADP ist ein zur Gruppe der Redoxenzyme gehörendes Coenzym, das Elektronen und Wasserstoff binden kann und an zahlreichen Redoxreaktionen der Zelle teilnimmt.

einschneidende Effekte auf die globale Genexpression infolge epigenetischer Veränderungen (siehe Kapitel 4.6).

4.6 Einfluss von Metaboliten auf das Epigenom

Intermediäre Produkte des Metabolismus wie Laktat können noch auf eine weitere, ganz fundamentale Weise den Erwerb von malignen Eigenschaften fördern, indem sie Einfluss auf die Chromatinorganisation und somit die epigenetische Kontrolle der Zelle nehmen (Li und Li 2015, 2015; Folmes und Terzic 2016; Menendez et al. 2016; Wong et al. 2017). Wie inzwischen gezeigt wurde, ist Laktat z.B. ein direkter HDAC³⁰ (Histon-Deacetylase) -Inhibitor, des Weiteren wird die Histon-Acetylierung³¹ wesentlich von der Verfügbarkeit von Acetyl-CoA kontrolliert, das hierfür der oxidativen Phosphorylierung entzogen werden muss. Durch die Laktataufnahme könnte dieses Acetyl-CoA-Reservoir aufrechterhalten werden, wie auch andere Metabolitkonstellationen – z.B. NAD/NADH³² –, welche die SIRT-1/-6 Histon-Deacetylasen³³ kontrollieren. Aus den hieraus resultierenden epigenetischen Veränderungen wird die globale Genexpression wesentlich determiniert, was im Kontext mit bestimmten Onkogenen zur Manifestation maligner Eigenschaften beiträgt (Li und Li 2015). Insbesondere die herabgesetzte Barriere für die Entwicklung zur Stammzelle (Reprogrammierungsbarriere), durch ein verändertes Epigenom aufgrund von Akkumulation bestimmter Metabolite, ist in den Fokus des Interesses gerückt (Menendez et al. 2016). In diesem Sinne wurde die Stammzellfähigkeit von Karzinomen, assoziiert mit malignen Merkmalen wie Therapieresistenz und Metastasierung, im Zusammenhang mit epigenetischen Veränderungen und ihrer Verbindung mit dem zellulären Metabolismus beschrieben (Yoshida 2015). In ähnlicher Weise können Nrf2-bedingte metabolische Veränderungen eine Reprogrammierung zur Stammzelle begünstigen, was das onkogene Potential von Nrf2 eindringlich unterstreicht (Hawkins et al. 2016).

³⁰ Histon-Deacetylasen sorgen für eine Herunterregulation der DNA-Transkription mittels einer Erhöhung der Affinität von Histonen gegenüber DNA.

³¹ Histon-Acetylierung führt zur Öffnung der Chromatin-Struktur, was das Binden von Transkriptionsfaktoren erlaubt und so die Transkription begünstigt.

³² Nicotinamidadenindinukleotid gehört ebenfalls zu den Redoxenzymen wie das NADPH.

³³ SIRT-1/-6 sind Sirtuine, die zu einer Familie multifunktionaler Enzyme aus der Gruppe der Histon-Deacetylasen gehören.

4.7 Rolle von Nrf2 in der Karzinogenese

Unter Berücksichtigung seiner multiplen Effekte auf den Zellschutz, unterstützt Nrf2 nicht nur die Anpassung von Kolonepithelzellen an oxidativen Stress, wie er in einer inflammatorischen oder tumorösen Mikroumgebung auftritt, sondern trägt auch essenziell zu metabolischen Veränderungen bei.

Betrachtet man das komplexe Gefüge eines Tumors als ein Ökosystem, welches zusammengesetzt ist aus unterschiedlichen Zellen (Tumorzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Immunzellen) mit metabolisch stark voneinander abweichender Prägung, könnte Nrf2 daher dazu beitragen, dass sich stresstolerante Zellen, welche darüber hinaus noch dazu befähigt werden, eine metabolische Symbiose mit benachbarten Zellen auszuprägen, durchsetzen. Dies beinhaltet die Fähigkeit der Zellen bestimmter Tumoranteile, zu überleben, z. B. indem effektiv einem letalen ATP-Mangel vorgebeugt wird. Am Beispiel des Brustkrebses wurde mittels genetischer und histologischer Untersuchung nachgewiesen, dass Nrf2 innerhalb der Tumormasse selektiv in solchen Karzinomzellen zu finden ist, welche eine erhöhte mitochondriale Biogenese und MCT1-Expression aufweisen (Sotgia et al. 2012). Außerdem trägt ein durch Nrf2 organisierter Stoffwechsel zur Stammzellreprogrammierung der Tumorzellen bei, was noch aggressivere und hochmetastatische Tumoren hervorbringt. Bzgl. des KRK wurde berichtet, dass eine hohe Expression von Nrf2 im Tumorgewebe mit einer schlechten Prognose für die Patienten einhergeht (Hu et al. 2013; Ji et al. 2014).

Unter der Annahme von Nrf2 als einer Hauptdeterminante (neben bspw. HIF-1 α) der metabolischen Adaptation und Kompartimentierung/Symbiose in Tumoren, wie des KRK, sollten sich nicht nur neuartige Einblicke in die Interaktionen zwischen Tumor/Wirt und tumoröse Plastizität/Heterogenität ergeben, sondern auch in den Prozess der „Arbeitsteilung“ als neuem *Hallmark of Cancer*.

4.8 Identität von nukleärem MCT1

Ungeachtet der eindeutigen Rolle von MCT1 bei der Ausprägung des reversen Warburg-Metabolismus und seiner Verbindung mit malignen Eigenschaften war ein weiterer bemerkenswerter Befund, dass MCT1 in der KRK-Zelllinie HT29 eindeutig im Zellkern lokalisiert ist. Da dies inzwischen auch für weitere Tumorzelllinien, z.B. die

PDAC Zelllinie Panc1³⁴ gezeigt wurde (Ammar 2016), scheint eine solche atypische Lokalisation durchaus von Relevanz zu sein. Dies wird weiterhin durch Befunde untermauert, dass bereits in Hodgkin-Lymphomen (Hartmann et al. 2012) und in Weichteilsarkomen (Pinheiro et al. 2014) eine nukleäre MCT1-Expression nachzuweisen ist, bei letzteren verbunden mit einem niedrigen Tumor Grading, fehlender Metastasierung und insgesamt einer besseren Prognose (Pinheiro et al. 2014). Da eine Expression von MCT1 im Zellkern primär nicht mit seiner klassischen Funktion als Transmembrantransporter vereinbar scheint, könnte von MCT1 eine zusätzliche, noch nicht beschriebene Rolle ausgehen. Gleichwohl könnte MCT1 aber dennoch auch am Transport von Metaboliten in den Zellkern beteiligt sein, wenngleich das Ausmaß der Kernpore einen ungehinderten und freien Austausch von z.B. Laktat zwischen Zytoplasma und Zellkern nahelegt.

Eine interessante Studie von Janssen et al. konnte zeigen, dass in der frühen Embryogenese der Maus nukleäres MCT1 zumindest vorübergehend in der Präimplantationsphase an der Reifung beteiligt zu sein scheint (Jansen et al. 2006). *In vitro* kultivierte murine Blastozysten weisen eine nukleäre Lokalisation des MCT1 auf, die sich in Anwesenheit von Glukose im Laufe der weiteren Entwicklung verliert und MCT1 dafür an die Zelloberfläche tritt (Jansen et al. 2006). Demnach könnte das Auftauchen von nukleärem MCT1 bzw. dessen Expression an der Oberfläche in Karzinomzellen als eine Art Reminiszenz der Embryogenese und dementsprechend als Ausdruck eines metastatischen und Stammzellpotentials, welches die Tumorzellen innehaben, aufgefasst werden.

Der Mechanismus, wodurch das ausgewiesene Oberflächenprotein MCT1 im Zellkern exprimiert werden kann, ist vollkommen unklar. Da solche Mechanismen aber bereits für andere Oberflächenproteine mit fakultativer Kernlokalisierung gezeigt wurden, sollten auch bzgl. MCT1 Erkenntnisse zu gewinnen sein. Ewing et al. beschrieb die Interaktion von MCT1 mit AP1S1 (*clathrin-associated/assembly/adaptor protein, small 1*), welches den Mechanismus der Clathrin-abhängigen Endozytose unterstützt (2007). Da für andere Membranproteine wie bspw. dem EGFR die Endozytose und endosomale Sortierung für den Transport in den Nukleus verantwortlich gemacht wurde (Wang et al. 2010), könnte MCT1 ebenfalls auf diesem Wege in den Zellkern gelangen. Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang beschrieben, dass u. a. EGFR an der transkriptionellen Regulation, Zellproliferation, DNA-Reparatur sowie Radio- und Chemoresistenz

³⁴ Zelllinie des humanen epitheloiden Pankreaskarzinoms.

beteiligt ist. Demnach erscheint es möglich, dass MCT1 – anderen Membranproteinen ähnlich – in den Nukleus transferiert wird, um nicht in erster Linie die Funktion des Laktattransportes zu erfüllen, sondern anderweitige Prozesse im Zellkern, z.B. die Chromatinorganisation und Genexpression, zu modulieren.

Einen Einfluss auf die Lokalisation von MCT1 könnten auch spezifische Sortierungssignale unter Kontrolle von CD147 nehmen (Castorino et al. 2011). Anhand von Panc1 Zellen konnte gezeigt werden, dass die nukleäre Expression von MCT1 im Zusammenhang mit der Erniedrigung der basalen Expressionsrate des CD147 steht (Ammar 2016).

4.9 Ansätze für antineoplastische Therapie

Während des letzten Jahrzehnts rückten die antineoplastischen Wirkstoffe, welche den Metabolismus von Krebszellen beeinflussen, in den Mittelpunkt des Interesses. Vor dem Hintergrund, dass ein deregulierter zellulärer Metabolismus als ein Hauptmerkmal von Krebszellen verstanden wird (Hanahan und Weinberg 2011), sollen hier gezielt, selektiv gegen neoplastische Zellen wirkende Therapeutika identifiziert werden. Dies stellt jedoch eine Herausforderung dar, da auch schnell proliferierende Zellen von den meisten Wirkstoffen beeinträchtigt werden. Der Onkometabolismus zeichnet sich dadurch aus, dass die sich im Tumor befindlichen Stromazellen von den Tumorzellen insofern moduliert werden, als dass sie ihren eigenen Bedürfnissen gerecht werden. Bspw. sind MCT1-exprimierende Brustkrebszellen in der Lage, die MCT4-Expression in angrenzenden Fibroblasten zu stimulieren, sodass es zur Ausbildung eines Laktattransfersystems bzw. einer Symbiose kommt (Whitaker-Menezes et al. 2011). Auch in der vorliegenden Arbeit kommt zum Ausdruck, dass sich Tumorstromazellen und Tumorzellen (ggf. unterschiedlichen Phänotyps) gegenseitig in ihrem Stoffwechsel beeinflussen und es hierüber zur Konsolidierung von Malignitätsmerkmalen kommt. Insofern könnten Krebspatienten in diesem Zusammenhang von Wirkstoffen, welche diese metabolische Kopplung unterbrechen, profitieren.

Verschiedene Ansätze zeigten sich dabei unterschiedlich Erfolg versprechend. Zum einen wurde die mitochondriale Respiration als therapeutisches Ziel vorgeschlagen (Fulda et al. 2010), wobei Metformin als ein Hemmer des mitochondrialen Komplex I fungiert (El-Mir et al. 2000) und den Weg in klinische Studien an Krebspatienten gefunden hat (Galluzzi et al. 2013). Hingegen konnten die präklinischen Ergebnisse zu

den meisten HIF1 α -Inhibitoren nicht überzeugen (Wilson und Hay 2011). Wie schon eingangs beschrieben, wird die Ausschaltung des Glykoproteins CD147 und die konsequente Inhibition von MCT1/MCT4 in einigen Tumoren mit antineoplastischen Effekten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Verbindung gebracht (Schneiderhan et al. 2009; Hao et al. 2012). Nachteilig daran ist, dass MCT4 auch in hochglykolytischen Muskelzellen vorkommendes Transportprotein ist, welches die Zellen vor einer Laktatazidose schützt (Pértega-Gomes et al. 2014).

Als selektiver und somit effektiver und erfolgreicher hat sich die Hemmung von MCT1 z. B. mittels AZD3965 erwiesen. *In vivo* zeigte sich am Beispiel von KRK und Lungenkarzinom eine gesteigerte Glykolyse auf dem Boden eines verhinderten Laktataustausches durch die Anwedung von MCT1-Inhibitoren. In Kombination mit Radiotherapie konnte das Tumorwachstum signifikant gebremst werden (Bola et al. 2014; Sonveaux et al. 2008). Geht man von dem reversen Warburg-Metabolismus aus, trifft dieser Effekt besonders die von Glukose abhängigen (glykolytischen), hypoxischen Zellen, welche sich nun mit den MCT1-gehemmten (nun Laktat refraktären) Zellen in einer Kompetition um Glukose befinden. Wie an Glioblastomzellen gezeigt, kann der selektive MCT1-Inhibitor AR-C117977 hierüber gezielt zytotoxisch wirken und weist darüber hinaus am Tiermodell keine signifikanten Nebenwirkungen auf (Takada et al. 2016).

Begleitet von der Annahme, dass MCT1 einen bidirektionalen Transport von Laktat bewerkstelligen kann, konnte bei Lymphomzellen, welche MCT4 in geringen Mengen exprimieren, die Unterdrückung des Wachstums durch intrazelluläre Laktatakkumulation mittels MCT1-Hemmung durch AZD3965 erzielt werden. Zusätzlicher Einsatz von einem Hemmer des mitochondrialen Komplex I (Metformin) führte zu erhöhten Zelltotraten (Noble et al. 2017). Auch anhand von KRK-Zellen konnte gezeigt werden, dass hier der Verlust von MCT4 zu einer Sensibilisierung der Zellen für AZD3965 führt und ein zusätzlicher *knock out* von CD147 eine Laktatakkumulation hervorruft, welche die Zellen dazu bewegt, den Metabolismus in Richtung oxidative Phosphorylierung umzustellen. Innerhalb dieser Konstellation führt der Einsatz eines Inhibitors des mitochondrialen Komplex I (Phenformin) zu einem fatalen Stoffwechseleinbruch und zum Zelltod (Marchiq et al. 2015). Nach solch

überzeugenden Ergebnissen wird der MCT1-Inhibitor AZD3965 derzeit in einer klinischen Phase I Studie an Patienten mit soliden Tumoren getestet³⁵.

Zum anderen wurde bei der Resistenzentwicklung gegenüber antiangiogenetischen Multikinase-Inhibitoren die Hemmung der Glykolyse als zusätzliche Therapieoption vorgeschlagen. Demnach kommt es bei der Langzeitanwendung von bspw. Nintedanib nicht aufgrund von Revaskularisation zu Resistenzen, sondern durch Anpassung des Stoffwechsels der Tumorzellen an die hypoxischen Bedingungen und durch Ausbildung von metabolischen Symbiosen, welche auf der Basis von Laktattransfersystemen zum Überleben der Zellen beitragen können. Insofern wird eine Kombinationstherapie mit 3PO³⁶, einem Inhibitor des Glykolyse-Aktivators PFKFB3 empfohlen, welche durch die Hemmung der glykolytischen Aktivität in den MCT4-exprimierenden Zellen zu einer Störung der metabolischen Kopplung und Überwindung der Resistenzentwicklung führt (Pisarsky et al. 2016). Die Applikation von MCT1-Inhibitoren könnte gleichfalls zur Remission unter antiangiogenetischer Therapie führen. 7ACC erscheint hier besonders interessant zu sein, blockiert dieser Inhibitor ausschließlich den Import von Laktat durch MCT1. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten zu 7ACC belegen dessen Effizienz bzgl. der Inhibition des Wachstums von KRK-Zellen und deren Resistenz gegenüber Apoptose. In der Studie von Draoui et al. wurde ebenfalls eine hohe Wirksamkeit von 7ACC in der Behandlung von Tumoren postuliert (Draoui et al. 2014).

Abgesehen von den am Stoffwechsel beteiligten Enzymen und Transportern ist auch die Hemmung von Nrf2 als interessanter Wirkmechanismus von neuartigen antineoplastischen Wirkstoffen in den Blickpunkt gerückt. Dabei wurde eine in Kaffeebohnen und Kaffee vorkommende Verbindung namens Trigonellin als wirksamer Nrf2-Inhibitor beschrieben (Boettler et al. 2011). In HCC-Zellen führte die Behandlung mit Trigonellin zu einer Migrationshemmung der malignen Zellen über die Interferenz mit dem Raf/ERK/Nrf2 *pathway* (Liao et al. 2015). Des Weiteren konnte am Beispiel von Pankreaskarzinomzellen der Nachweis einer Trigonellin-vermittelten Hemmung von Nrf2-abhängiger Apoptoseprotektion *in vitro* und *in vivo* geführt werden (Arlt et al. 2013). Unter Berücksichtigung dieser Daten mag Trigonellin ein wirksames Mittel in der Kombinationstherapie von Krebserkrankungen oder in der Chemoprävention im

³⁵ ClinicalTrials.gov: „A phase I Trial of AZD3965 in Patients With Advanced Cancer“, unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01791595> (abgerufen am 13.09.2017).

³⁶ 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO) inhibiert den Glykolyse-Aktivator Phosphofruktokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3).

Rahmen der Karzinogenese sein. Wie auch bei anderen Nrf2-Inhibitoren wie Brusatol, Luteolin, Triptolide oder PIK-75 (Geismann et al. 2014), sind inzwischen erste klinische Studien angelaufen (Catanzaro et al. 2017) oder befinden sich in Planung.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (KRK) mit 64.000 Neuerkrankungen pro Jahr ist die dritthäufigste maligne Tumorerkrankung in Deutschland. Ein Risikofaktor sind dabei chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), wobei durch die persistierende Entzündung genetische Alterationen sowie andere im Kolonepithel stattfindende molekulare Ereignisse induziert werden, die die Karzinogenese begünstigen. Dies beinhaltet auch die Adaptation des entzündeten Kolonepithels an oxidativen Stress. Da der antioxidative Transkriptionsfaktor *Nuclear factor E2-related factor-2* (Nrf2) die Schlüsselfunktion in der Zellantwort gegenüber oxidativem Stress übernimmt, kommt Nrf2 im Zusammenhang mit der entzündlichen Karzinogenese eine bedeutsame Rolle zu. Nrf2 wurde in vielen Karzinomen dereguliert vorgefunden, was außer auf genetische Einflüsse auch auf eine inadäquate Anpassung an den persistierenden entzündlichen (oxidativen) Stress zurückzuführen ist. Eine kürzlich beschriebene Funktion von Nrf2 ist neben der antioxidativen Protektion die metabolische Reprogrammierung von Tumorzellen. Dies manifestiert sich möglicherweise gerade in soliden Tumoren wie dem KRK und ihrer stark ausgeprägten Heterogenität, wobei sich Tumorsubpopulationen in ihrem metabolischen Phänotyp charakteristisch voneinander unterscheiden. Im Einzelnen kommt es zur Ausprägung eines Warburg- und reversen Warburg-Phänotyps, also der unterschiedlichen Verstoffwechslung von Glukose und Laktat. Ein wesentliches Merkmal ist entsprechend eine differenzielle Verteilung der Laktat-transportierenden Monocarboxylattransporter 1 und -4 (MCT1 und MCT4). In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, welche Rolle Nrf2 bei der Prägung des Stoffwechsels von prämaligen und malignen Kolonepithelzellen in Richtung reverser Warburg-Phänotyp spielt.

Zunächst durchgeführte immunhistochemische Untersuchungen von menschlichen KRK-Geweben zeigten eine reziproke Expression von MCT1 und MCT4 in Karzinom- bzw. Stromazellen, begleitet von einer starken epithelialen Nrf2-Aktivierung. In kolorektalem Gewebe von CED-Patienten waren MCT1 und Nrf2 ebenfalls im epithelialen Kompartiment koexprimiert, dies in enger Verbindung mit entzündlichen Infiltraten, v. a. Makrophagen. Unter Verwendung der prämaligen

Kolonepithelzelllinie NCM460 und der KRK-Zelllinie HCT15 wurde nachfolgend ein induzierender Einfluss einer Nrf2-Aktivierung – z.B. mittels tBHQ- oder SFN-Behandlung – sowie einer Nrf2-Überexpression auf die Expression der Metabolismogene TALDO1, TKT, LDHB und G6PD nachgewiesen. Mittels Westernblot und *real-time* PCR konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Nrf2-Aktivierung bzw. -Überexpression in beiden Zelllinien auch die Expression von MCT1 deutlich steigert, von MCT4 hingegen reduziert. Weiterhin wurde mittels indirekter Kokultur-Versuche auch ein induzierender Einfluss von *in vitro*-generierten, inflammatorischen M1-Makrophagen auf die Expression von TALDO1, TKT, LDHB, G6PD und MCT1 in NCM460 Zellen nachgewiesen, wohingegen in diesen die MCT4-Expression durch M1-Makrophagen unterdrückt wurde. Im Gegensatz dazu, hatten antiinflammatorische M2-Makrophagen keinen solchen Einfluss auf die Expression dieser Gene. Durch Einsatz einer Nrf2 siRNA in NCM460 Zellen oder die Applikation des Sauerstoffradikalfängers Tiron waren die Effekte durch die Kokultur mit den M1-Makrophagen aufgehoben, was die Bedeutung des durch M1-Makrophagen verursachten oxidativen Stresses ebenso zeigt wie die Rolle von Nrf2 bei nachfolgender epithelialer Adaptation.

Anschließend konnte nachgewiesen werden, dass NCM460 und HCT15 Zellen in Abhängigkeit von der Nrf2-induzierten MCT1-Expression eine gesteigerte Laktataufnahme zeigen, wohingegen die Glukoseaufnahme und die mitochondriale Aktivität unverändert blieben. Dies steht im Einklang mit einem reversen Warburg-Metabolismus dieser Zellen. Als eine wichtige Konsequenz dieser Nrf2-induzierten, MCT1-vermittelten Laktataufnahme, erlangten NCM460 und HCT15 Zellen eine Protektion gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose, verbunden mit einer gesteigerten Expression antiapoptotischer Gene der Bcl2- und cIAP-Familie. Ferner beeinflusste der durch Nrf2 und MCT1 determinierte reverse Warburg-Stoffwechsel das klonale Wachstum von HCT15 Zellen, was direkt vom Austausch von Laktat mit MCT4-exprimierenden/Laktat-exportierenden Warburg-Zellen abhängig war. Ein weiterer interessanter Befund war außerdem, dass die Überexpression von MCT1 und sein Einfluss auf den Phänotyp von Tumorzellen möglicherweise nicht ausschließlich auf seiner Rolle als Laktatimporteureur auf der Zelloberfläche beruht. Immunfluoreszenzfärbungen und Westernblot-Analysen wiesen so eine nukleäre Lokalisation von MCT1 in der KRK-Zelllinie HT29 nach, was mittlerweile auch bei

anderen Zelllinien der Fall ist. Eine mögliche Verbindung mit nukleärem MCT1 und der Metastasierung wird gegenwärtig diskutiert.

Insgesamt belegen die erhobenen Befunde, dass Nrf2 bereits in prämaligen Epithelzellen des Kolons unter Exposition gegenüber inflammatorischen M1-Makrophagen wesentlich zu metabolischen Veränderungen beiträgt, begleitet von verändertem Wachstum und Überleben der Zellen. Neben der Bereitstellung von G-6-P aus Laktat als Mittel zum Zellschutz vor oxidativem Stress sogar in Abwesenheit von Glukose, ist der sich nach Nrf2-Aktivierung einstellende reverse Warburg-Phänotyp ein wesentlicher Bestandteil der Onkogenität von Nrf2. Insbesondere der Einfluss von Nrf2 auf die Ausprägung einer Arbeitsteilung, beruhend auf einer reziproken Expression von MCT1 und MCT4 und die daraus resultierende Laktataufnahme in die Karzinomzellen eröffnen diesen nicht nur die Möglichkeit der oxidativen Verstoffwechslung des Laktats zur Energiegewinnung, sondern auch die gleichzeitige Verstoffwechslung von Glukose zu Biosynthesezwecken. Des Weiteren könnten Metaboliten wie Laktat auf epigenetischer Ebene Einfluss auf die globale Genexpression nehmen oder sogar eine Reprogrammierung in Richtung Stammzelle fördern. Den reversen Warburg-Effekt begünstigend, tragen diese Nrf2-abhängigen Alterationen zur malignen Transformation des Kolonepithels bei, sodass Nrf2 hiernach als ein bedeutsamer Risikofaktor für die kolorektale Karzinogenese einzustufen ist.

5.2 Summary

Colorectal cancer (CRC) is the third most frequent malignant tumor in Germany and with 64.000 new cases arising per year, it is of growing importance in science. Risk factors like inflammatory bowel diseases can favor carcinogenesis by permanent inflammation involving certain genetic alterations and other molecular events taking place in the colonic epithelium. Since the antioxidant transcription factor nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) acts mainly as the key regulator for cellular response to oxidative stress, it plays a major role in this context of malignant transformation. Nrf2 has been found to be deregulated in many cancers, partly due to an inadequate adaptation to permanent inflammatory (oxidative) stress. Malignant tumors, such as colorectal cancer, are heterogeneous diseases characterized by distinct metabolic phenotypes. These include Warburg and reverse Warburg phenotypes depending on differential distribution of the lactate carrier proteins monocarboxylate transporter-4 and -1 (MCT4 and MCT1).

Here, we elucidated the role of Nrf2 in shaping the metabolism toward a reverse Warburg phenotype in malignant and premalignant colonic epithelial cells.

Immunohistochemistry of human CRC tissues revealed reciprocal expression of MCT1 and MCT4 in carcinoma and stroma cells, respectively, accompanied by strong epithelial Nrf2 activation. In colorectal tissue from inflammatory bowel disease patients, MCT1 and Nrf2 were coexpressed as well, relating to CD68 positive inflammatory infiltrates. Nrf2 activation by tBHQ/SFN or Nrf2 overexpression in NCM460 and HCT115 cells induced the expression of TALDO1, TKT, NQO1, LDHB, G6PD and MCT1, whereas the expression of MCT4 declined. By examining the characteristic interleukine expression pattern in real-time PCR, we have proven the correct polarization of the macrophages towards a proinflammatory M1- and an anti-inflammatory M2-type. Indirect coculture of human NCM460 colonocytes with M1- but not M2-macrophages induced MCT1 as well as G6PD, LDHB and TALDO1 expression, whereas MCT4 expression decreased. The M1-macrophages, in turn, showed an increased expression of MCT4 after coculture with NCM460. Nrf2 knockdown or reactive oxygen species (ROS) scavenging by Tiron blocked these coculture effects in NCM460 cells. Likewise, Nrf2 knockdown inhibited similar effects of tBHQ/SFN-mediated Nrf2 activation on NCM460 and HCT15 CRC cells. M1 coculture or Nrf2 activation/overexpression greatly altered the lactate uptake but not glucose uptake and mitochondrial activities in these cells, reflecting the reverse Warburg phenotype. Depending on MCT1-mediated lactate uptake, Nrf2 conferred protection from TRAIL-induced apoptosis in NCM460 and HCT15 cells. Moreover, metabolism-dependent growth of HCT15 cells was induced by Nrf2-dependent activation of MCT1-driven lactate exchange. Immunofluorescent double staining and westernblot of nuclear protein extracts unveiled a nuclear localization of MCT1 in HT29 CRC cells, whose meaning remains obscure.

These findings indicate that Nrf2 has an impact on the metabolism already in premalignant colonic epithelial cells exposed to inflammatory M1-macrophages, an effect accompanied by growth and survival alterations. Besides providing G-6-P from lactate as measure to protect against oxidative stress even in the absence of free glucose, the reverse Warburg metabolism upon Nrf2-activation is an essential part of Nrf2 oncogenicity. In particular the impact of Nrf2 on the establishment of a division of labour accompanied by a differential expression of MCT1/MCT4 and the resulting lactate uptake in cancer cells, not only allows them to fuel their oxidative phosphorylation yielding energy supply, but also enables them to save up glucose for biomass production. Further-

more, metabolites like lactate may have epigenetic effects on the global gene expression or even promote reprogramming towards stemness. Favoring the reverse Warburg effect, these Nrf2-dependent alterations add to malignant transformation of the colonic epithelium, so that Nrf2 is supposed to be classified as significant risk factor in the carcinogenesis of CRC.

Literaturverzeichnis

- Ali, M. M.; Roe, S. M.; Vaughan, C. K.; Meyer, P.; Panaretou, B.; Piper, P. W.; Prodromou C.; Pearl L. H. (2006): Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440 (7087), S. 1013–1017. DOI: 10.1038/nature04716.
- Álvarez, Z.; Hyroššová, P.; Perales, J. C.; Alcántara, S. (2016): Neuronal Progenitor Maintenance Requires Lactate Metabolism and PEPCK-M-Directed Cataplerosis. *Cerebral cortex* 26 (3), S. 1046–1058. DOI: 10.1093/cercor/bhu281.
- Ammar, N. (2016): Impact of the expression and localization of the Monocarboxylate Transporters (MCT)-1 and -4 on the phenotype of pancreatic cancer cells. Masterarbeit im Studiengang *Medical Life Sciences*, Kiel.
- Arlt, A.; Bauer, I.; Schafmayer, C.; Tepel, J.; Mürköster, S. S.; Brosch, M.; Röder, C.; Kalthoff, H.; Hampe, J.; Moyer, M. P.; Fölsch, U. R.; Schäfer, H. (2009): Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene* 28 (45), S. 3983–3996. DOI: 10.1038/onc.2009.264.
- Arlt, A.; Sebens, S.; Krebs, S.; Geismann, C.; Grossmann, M.; Kruse, M.-L. ; Schreiber, S.; Schäfer, H. (2013): Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. *Oncogene* 32 (40), S. 4825–4835. DOI: 10.1038/onc.2012.493.
- Aslund, F.; Berndt, K. D.; Holmgren, A. (1997): Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *The Journal of biological chemistry* 272 (49), S. 30780–30786.
- Bingle, L.; Brown, N. J.; Lewis, C. E. (2002): The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of pathology* 196 (3), S. 254–265. DOI: 10.1002/path.1027.
- Boettler, U.; Sommerfeld, K.; Volz, N.; Pahlke, G.; Teller, N.; Somoza, V.; Lang, R.; Hofmann, T.; Marko, D. (2011): Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *The Journal of nutritional biochemistry* 22 (5), S. 426–440. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.03.011.
- Boidot, R.; Végran, F.; Meulle, A.; Le Breton, A.; Dessy, C.; Sonveaux, P.; Lizard-Nacol, S.; Feron, O. (2012): Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer research* 72 (4), S. 939–948. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2474.
- Bola, B. M.; Chadwick, A. L.; Michopoulos, F.; Blount, K. G.; Telfer, B. A.; Williams, K. J.; Smith, P. D.; Critchlow, S. E.; Stratford, I. J. (2014): Inhibition of monocarboxylate transporter-

- 1 (MCT1) by AZD3965 enhances radiosensitivity by reducing lactate transport. *Molecular cancer therapeutics* 13 (12), S. 2805–2816. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-1091.
- Bolaños, J. P. (2016): Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *Journal of neurochemistry* 139 Suppl 2, S. 115–125. DOI: 10.1111/jnc.13486.
- Borthakur, A.; Saksena, S.; Gill, R. K.; Alrefai, W. A.; Ramaswamy, K.; Dudeja, P. K. (2008): Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *Journal of cellular biochemistry* 103 (5), S. 1452–1463. DOI: 10.1002/jcb.21532.
- Castorino, J. J.; Deborde, S.; Deora, A.; Schreiner, R.; Gallagher-Colombo, S. M.; Rodriguez-Boulan, E.; Philp, N. J. (2011): Basolateral sorting signals regulating tissue-specific polarity of heteromeric monocarboxylate transporters in epithelia. *Traffic* 12 (4), S. 483–498. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2010.01155.x.
- Catanzaro, E.; Calcabrini, C.; Turrini, E.; Sestili, P.; Fimognari, C. (2017): Nrf2: a potential therapeutic target for naturally occurring anticancer drugs? *Expert opinion on therapeutic targets* 21 (8), S. 781–793. DOI: 10.1080/14728222.2017.1351549.
- Chartoumpakis, D. V.; Wakabayashi, N.; Kensler, T. W. (2015): Keap1/Nrf2 pathway in the frontiers of cancer and non-cancer cell metabolism. *Biochemical Society transactions* 43 (4), S. 639–644. DOI: 10.1042/BST20150049.
- Chen, N.; Yi, X.; Abushahin, N.; Pang, S.; Zhang, D.; Kong, B.; Zheng, W. (2010): Nrf2 expression in endometrial serous carcinomas and its precancers. *International journal of clinical and experimental pathology* 4 (1), S. 85–96.
- Chinnaiyan, A. M.; Prasad, U.; Shankar, S.; Hamstra, D. A.; Shanaiah, M.; Chenevert, T. L.; Ross, B. D.; Rehemtulla, A. (2000): Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (4), S. 1754–1759. DOI: 10.1073/pnas.030545097.
- Chistiakov, D. A.; Killingsworth, M. C.; Myasoedova, V. A.; Orekhov, A. N.; Bobryshev, Y. V. (2017): CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 97 (1), S. 4–13. DOI: 10.1038/labinvest.2016.116.
- Cho, H.-Y.; Reddy, S. P.; Kleeberger, S. R. (2006): Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 8 (1-2), S. 76–87. DOI: 10.1089/ars.2006.8.76.
- Cornblatt, B. S.; Ye, L.; Dinkova-Kostova, A. T.; Erb, M.; Fahey, J. W.; Singh, N. K.; Chen, M. S.; Stierer, T.; Garrett-Mayer, E.; Argani, P.; Davidson, N. E.; Talalay, P.; Kensler, T. W.; Visvanathan, K. (2007): Preclinical and clinical evaluation of sulforaphane for chemoprevention in the breast. *Carcinogenesis* 28 (7), S. 1485–1490. DOI: 10.1093/carcin/bgm049.
- Covarrubias, A.; Byles, V.; Horng, T. (2013): ROS sets the stage for macrophage differentiation. *Cell research* 23 (8), S. 984–985. DOI: 10.1038/cr.2013.88.
- Cullinan, S. B.; Gordan, J. D.; Jin, J.; Harper, J. W.; Diehl, J. A. (2004): The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a

- Cul3-Keap1 ligase. *Molecular and cellular biology* 24 (19), S. 8477–8486. DOI: 10.1128/MCB.24.19.8477-8486.2004.
- Curry, J. M.; Tuluc, M.; Whitaker-Menezes, D.; Ames, J. A.; Anantharaman, A.; Butera, A.; Leiby, B.; Cognetti, D. M.; Sotgia, F.; Lisanti, M. P.; Martinez-Outschoorn, U. E. (2013): Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence: MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer. *Cell cycle* 12 (9), S. 1371–1384. DOI: 10.4161/cc.24092.
- DeNicola, G. M.; Karreth, F. A.; Humpton, T. J.; Gopinathan, A.; Wei, C.; Frese, K.; Mangal, D.; Yu, K. H.; Yeo, C. J.; Calhoun, E. S.; Scrimieri, F.; Winter, J. M.; Hruban, R. H.; Iacobuzio-Donahue, C.; Kern, S. E.; Blair, I. A.; Tuveson, D. A. (2011): Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475 (7354), S. 106–109. DOI: 10.1038/nature10189.
- Dhup, S.; Dadhich, R. K.; Porporato, P. E.; Sonveaux, P. (2012): Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Current pharmaceutical design* 18 (10), S. 1319–1330.
- Diehl, K.; Dinges, L.-A.; Helm, O.; Ammar, N.; Plundrich, D.; Arlt, A.; Röcken, C.; Sebens, S.; Schäfer, H. (2017): Nuclear factor E2-related factor-2 has a differential impact on MCT1 and MCT4 lactate carrier expression in colonic epithelial cells: a condition favoring metabolic symbiosis between colorectal cancer and stromal cells. *Oncogene*. DOI: 10.1038/onc.2017.299.
- Ding, J.; Karp, J. E.; Emadi, A. (2017): Elevated lactate dehydrogenase (LDH) can be a marker of immune suppression in cancer: Interplay between hematologic and solid neoplastic clones and their microenvironments. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. DOI: 10.3233/CBM-160336.
- Dorner, D.; Gotzmann, J.; Foisner, R. (2007): Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2alpha, Rb, and BAF, in transcriptional regulation. *The FEBS journal* 274 (6), S. 1362–1373.
- Draoui, N.; Schicke, O.; Seront, E.; Bouzin, C.; Sonveaux, P.; Riant, O.; Feron, O. (2014): Anti-tumor activity of 7-aminocarboxycoumarin derivatives, a new class of potent inhibitors of lactate influx but not efflux. *Molecular cancer therapeutics* 13 (6), S. 1410–1418. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0653.
- Eftekharzadeh, B.; Maghsoudi, N.; Khodaghali, F. (2010): Stabilization of transcription factor Nrf2 by tBHQ prevents oxidative stress-induced amyloid β formation in NT2N neurons. *Biochimie* 92 (3), S. 245–253. DOI: 10.1016/j.biochi.2009.12.001.
- Egner, P. A.; Chen, J. G.; Wang, J. B.; Wu, Y.; Sun, Y.; Lu, J. H.; Zhu, J.; Zhang, Y. H.; Chen, Y. S.; Friesen, M. D.; Jacobson, L. P.; Muñoz, A.; Ng, D.; Qian, G. S.; Zhu, Y. R.; Chen, T. Y.; Botting, N. P.; Zhang, Q.; Fahey, J. W.; Talalay, P.; Groopman, J. D.; Kensler, T. W. (2011): Bioavailability of Sulforaphane from two broccoli sprout beverages: results of a short-term, cross-over clinical trial in Qidong, China. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* 4 (3), S. 384–395. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0296.

- El-Mir, M. Y.; Nogueira, V.; Fontaine, E.; Avéret, N.; Rigoulet, M.; Leverve, X. (2000): Dime-thylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *The Journal of biological chemistry* 275 (1), S. 223–228.
- Ewing, R. M.; Chu, P.; Elisma, F.; Li, H.; Taylor, P.; Climie, S.; McBroom-Cerajewski, L.; Robinson, M. D.; O'Connor, L.; Li, M.; Taylor, R.; Dharsee, M.; Ho, Y.; Heilbut, A.; Moore, L.; Zhang, S.; Ornatsky, O.; Bukhman, Y. V.; Ethier, M.; Sheng, Y.; Vasilescu, J.; Abu-Farha, M.; Lambert, J. P.; Duetzel, H. S.; Stewart, I. I.; Kuehl, B.; Hogue, K.; Colwill, K.; Gladwish, K.; Muskat, B.; Kinach, R.; Adams, S. L.; Moran, M. F.; Morin, G. B.; Topaloglou, T.; Figeys, D. (2007): Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Molecular systems biology* 3, S. 89. DOI: 10.1038/msb4100134.
- Fang, Z.; Jiang, C.; Feng, Y.; Chen, R.; Lin, X.; Zhang, Z.; Han, L.; Chen, X.; Li, H.; Guo, Y.; Jiang, W. (2016): Effects of G6PD activity inhibition on the viability, ROS generation and me-chanical properties of cervical cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1863 (9), S. 2245–2254. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2016.05.016.
- Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F. (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* 136 (5), S. E359-86. DOI: 10.1002/ijc.29210.
- Ferro, S.; Azevedo-Silva, J.; Casal, M.; Côte-Real, M.; Baltazar, F.; Preto, A. (2016): Charac-terization of acetate transport in colorectal cancer cells and potential therapeutic implications. *Oncotarget*. DOI: 10.18632/oncotarget.12156.
- Fiaschi, T.; Marini, A.; Giannoni, E.; Taddei, M. L.; Gandellini, P.; De Donatis, A.; Lanciotti, M.; Serni, S.; Cirri, P.; Chiarugi, P. (2012): Reciprocal metabolic reprogramming through lac-tate shuttle coordinately influences tumor-stroma interplay. *Cancer research* 72 (19), S. 5130–5140. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1949.
- Findeisen, P.; Mühlhausen, S.; Dempewolf, S.; Hertzog, J.; Zietlow, A.; Carlomagno, T.; Kollmar, M. (2014): Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome biology and evolution* 6 (9), S. 2274–2288. DOI: 10.1093/gbe/evu187.
- Folmes, C. D.; Terzic, A. (2016): Energy metabolism in the acquisition and maintenance of stemness. *Seminars in cell & developmental biology* 52, S. 68–75. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.02.010.
- Fulda, S.; Galluzzi, L.; Kroemer, G. (2010): Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery* 9 (6), S. 447–464. DOI: 10.1038/nrd3137.
- Galluzzi, L.; Kepp, O.; Vander Heiden M. G.; Kroemer, G. (2013): Metabolic targets for cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery* 12 (11), S. 829–846. DOI: 10.1038/nrd4145.
- Gañán-Gómez, I.; Wei, Y.; Yang, H.; Boyano-Adánez, M. C.; García-Manero, G. (2013): On-cogenic functions of the transcription factor Nrf2. *Free radical biology & medicine* 65, S. 750–764. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.041.

- Gao, H.-J.; Zhao, M.-C.; Zhang, Y.-J.; Zhou, D.-S.; Xu, L.; Li, G.-B.; Chen, M. S.; Liu, J. (2015): Monocarboxylate transporter 4 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and is associated with cell proliferation and migration. *Journal of cancer research and clinical oncology* 141 (7), S. 1151–1162. DOI: 10.1007/s00432-014-1888-8.
- Geismann, C.; Arlt, A.; Sebens, S.; Schäfer, H. (2014): Cytoprotection "gone astray": Nrf2 and its role in cancer. *OncoTargets and therapy* 7, S. 1497–1518. DOI: 10.2147/OTT.S36624.
- Guerrero-Beltrán, C. E.; Calderón-Oliver, M.; Pedraza-Chaverri, J.; Chirino, Y. I. (2012): Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Experimental and toxicologic pathology* 64 (5), S. 503–508. DOI: 10.1016/j.etp.2010.11.005.
- Hadjiagapiou, C.; Borthakur, A.; Dahdal, R. Y.; Gill, R. K.; Malakooti, J.; Ramaswamy, K.; Dudeja, P. K. (2005): Role of USF1 and USF2 as potential repressor proteins for human intestinal monocarboxylate transporter 1 promoter. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 288 (6), S. G1118-26. DOI: 10.1152/ajpgi.00312.2004.
- Hai, T.; Wolfgang, C. D.; Marsee, D. K.; Allen, A. E.; Sivaprasad, U. (1999): ATF3 and stress responses. *Gene expression* 7 (4-6), S. 321–335.
- Halestrap, A. P.; Meredith, D. (2004): The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 447 (5), S. 619–628. DOI: 10.1007/s00424-003-1067-2.
- Ham, M.; Lee, J.-W.; Choi, A. H.; Jang, H.; Choi, G.; Park, J.; Kozuka, C.; Sears, D. D.; Masuzaki, H.; Kim, J. B. (2013): Macrophage glucose-6-phosphate dehydrogenase stimulates proinflammatory responses with oxidative stress. *Molecular and cellular biology* 33 (12), S. 2425–2435. DOI: 10.1128/MCB.01260-12.
- Hanahan, D.; Weinberg, R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hao, J.; Madigan, M. C.; Khatri, A.; Power, C. A.; Hung, T.-T.; Beretov, J.; Chang, L.; Xiao, W.; Cozzi, P. J.; Graham, P. H.; Kearsley, J. H.; Li, Y. (2012): In vitro and in vivo prostate cancer metastasis and chemoresistance can be modulated by expression of either CD44 or CD147. *PloS one* 7 (8), S. e40716. DOI: 10.1371/journal.pone.0040716.
- Hartmann, S.; Agostinelli, C.; Diener, J.; Döring, C.; Fanti, S.; Zinzani, P. L.; Gallamini, A.; Bergmann, L.; Pileri, S.; Hansmann, M. L. (2012): GLUT1 expression patterns in different Hodgkin lymphoma subtypes and progressively transformed germinal centers. *BMC cancer* 12, S. 586. DOI: 10.1186/1471-2407-12-586.
- Hashimoto, Y.; Zhang, C.; Kawauchi, J.; Imoto, I.; Adachi, M. T.; Inazawa, J.; Amagasa, T.; Hai, T.; Kitajima S. (2002): An alternatively spliced isoform of transcriptional repressor ATF3 and its induction by stress stimuli. *Nucleic acids research* 30 (11), S. 2398–2406.
- Hawkins, K. E.; Joy, S.; Delhove, J. M.; Kotiadis, V. N.; Fernandez, E.; Fitzpatrick, L. M.; Whiteford, J. R.; King, P. J.; Bolanos, J. P.; Duchon, M. R.; Waddington, S. N.; McKay, T. R. (2016): NRF2 Orchestrates the Metabolic Shift during Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming. *Cell reports* 14 (8), S. 1883–1891. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.02.003.

- Hayes, J. D.; Ashford, M. L. (2012): Nrf2 orchestrates fuel partitioning for cell proliferation. *Cell metabolism* 16 (2), S. 139–141. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.07.009.
- Hayes, J. D.; Dinkova-Kostova, A. T. (2014): The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in biochemical sciences* 39 (4), S. 199–218. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.02.002.
- Hayes, J. D.; McMahon, M.; Chowdhry, S.; Dinkova-Kostova, A. T. (2010): Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxidants & redox signaling* 13 (11), S. 1713–1748. DOI: 10.1089/ars.2010.3221.
- Heiss, E.; Herhaus, C.; Klimo, K.; Bartsch, H.; Gerhauser, C. (2001): Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 276 (34), S. 32008–32015. DOI: 10.1074/jbc.M104794200.
- Helm, O.; Held-Feindt, J.; Grage-Griebenow, E.; Reiling, N.; Ungefroren, H.; Vogel, I.; Krüger, U.; Becker, T.; Ebsen, M.; Röcken, C.; Kabelitz, D.; Schäfer, H.; Sebens, S. (2014a): Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *International journal of cancer* 135 (4), S. 843–861. DOI: 10.1002/ijc.28736.
- Helm, O.; Held-Feindt, J.; Schäfer, H.; Sebens, S. (2014b): M1 and M2: there is no "good" and "bad"-How macrophages promote malignancy-associated features in tumorigenesis. *Oncoimmunology* 3 (7), S. e946818. DOI: 10.4161/21624011.2014.946818.
- Hesse, L. (2017): Einfluss des p53-Status auf die Expression und Funktion von Splicingvarianten des Transkriptionsfaktors ATF3. Masterarbeit im Studiengang Biologie, Kiel.
- Hu, T.; Yao, Y.; Yu, S.; Guo, H.; Han, L.; Wang, W.; Tian, T.; Hao, Y.; Liu, Z.; Nan, K.; Wang, S. (2013): Clinicopathologic significance of CXCR4 and Nrf2 in colorectal cancer. *Journal of biomedical research* 27 (4), S. 283–290. DOI: 10.7555/JBR.27.20130069.
- Huang, P.; Chang, S.; Jiang, X.; Su, J.; Dong, C.; Liu, X.; Yuan, Z.; Zhang, Z.; Liao H. (2015): RNA interference targeting CD147 inhibits the proliferation, invasiveness, and metastatic activity of thyroid carcinoma cells by down-regulating glycolysis. *International journal of clinical and experimental pathology* 8 (1), S. 309–318.
- Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Engel, J. D.; Yamamoto, M. (1999): Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* 13 (1), S. 76–86.
- Jansen, S.; Esmailpour, T.; Pantaleon, M.; Kaye, P. L. (2006): Glucose affects monocarboxylate cotransporter (MCT) 1 expression during mouse preimplantation development. *Reproduction (Cambridge, England)* 131 (3), S. 469–479. DOI: 10.1530/rep.1.00953.
- Ji, L.; Wei, Y.; Jiang, T.; Wang, S. (2014): Correlation of Nrf2, NQO1, MRP1, cmyc and p53 in colorectal cancer and their relationships to clinicopathologic features and survival. *International journal of clinical and experimental pathology* 7 (3), S. 1124–1131.
- Katoh, Y.; Iida, K.; Kang, M.-I.; Kobayashi, A.; Mizukami, M.; Tong, K. I.; McMahon, M.; Hayes, J. D.; Itoh, K.; Yamamoto, M. (2005): Evolutionary conserved N-terminal domain of

- Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Archives of biochemistry and biophysics* 433 (2), S. 342–350. DOI: 10.1016/j.abb.2004.10.012.
- Ke, X.; Chen, Y.; Wang, P.; Xing, J.; Chen, Z. (2014): Upregulation of CD147 protects hepatocellular carcinoma cell from apoptosis through glycolytic switch via HIF-1 and MCT-4 under hypoxia. *Hepatology international* 8 (3), S. 405–414. DOI: 10.1007/s12072-014-9536-6.
- Kehrer, J. P. (2000): The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149 (1), S. 43–50.
- Kensler, T. W.; Egner, P. A.; Agyeman, A. S.; Visvanathan, K.; Groopman, J. D.; Chen, J.-G.; Chen, T. Y.; Fahey, J. W.; Talalay, P. (2013): Keap1-nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane. *Topics in current chemistry* 329, S. 163–177. DOI: 10.1007/128_2012_339.
- Kim, H. S.; Lee, H. E.; Yang, H.-K.; Kim, W. H. (2014): High lactate dehydrogenase 5 expression correlates with high tumoral and stromal vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* 81 (2), S. 78–85. DOI: 10.1159/000357017.
- Kirk, P.; Wilson, M. C.; Heddle, C.; Brown, M. H.; Barclay, A. N.; Halestrap, A. P. (2000): CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *The EMBO journal* 19 (15), S. 3896–3904. DOI: 10.1093/emboj/19.15.3896.
- Koppenol, W. H.; Bounds, P. L.; Dang, C. V. (2011): Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature reviews. Cancer* 11 (5), S. 325–337. DOI: 10.1038/nrc3038.
- Koukourakis, M. I.; Giatromanolaki, A.; Harris, A. L.; Sivridis, E. (2006): Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer research* 66 (2), S. 632–637. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3260.
- Kruk, J.; Aboul-Enein, H. Y. (2017): Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Carcinogenesis: Implications of Oxidative Stress on the Progression and Development of Several Cancer Types. *Mini reviews in medicinal chemistry* 17 (11), S. 904–919. DOI: 10.2174/1389557517666170228115324.
- Kumar, V.; Kumar, S.; Hassan, M.; Wu, H.; Thimmulappa, R. K.; Kumar, A.; Sharma, S. K.; Parmar, V. S.; Biswal, S.; Malhotra, S. V. (2011): Novel chalcone derivatives as potent Nrf2 activators in mice and human lung epithelial cells. *Journal of medicinal chemistry* 54 (12), S. 4147–4159. DOI: 10.1021/jm2002348.
- Lambert, D. W.; Wood, I. S.; Ellis, A.; Shirazi-Beechey, S. P. (2002): Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy. *British journal of cancer* 86 (8), S. 1262–1269. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600264.
- Lane, D. P. (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358 (6381), S. 15–16. DOI: 10.1038/358015a0.

- Ledenev, A. N.; Konstantinov, A. A.; Popova, E.; Ruuge, E. K. (1986): A simple assay of the superoxide generation rate with Tiron as an EPR-visible radical scavenger. *Biochemistry international* 13 (2), S. 391–396.
- Lee, M.; Yoon, J.-H. (2015): Metabolic interplay between glycolysis and mitochondrial oxidation: The reverse Warburg effect and its therapeutic implication. *World journal of biological chemistry* 6 (3), S. 148–161. DOI: 10.4331/wjbc.v6.i3.148.
- Lee, S.; Lim, S.; Ham, O.; Lee, S.-Y.; Lee, C.Y.; Park, J.-H.; Lee, J.; Seo, H. H.; Yun, I.; Han, S. M.; Cha, M. J.; Choi, E.; Hwang, K. C. (2015): ROS-mediated bidirectional regulation of miRNA results in distinct pathologic heart conditions. *Biochemical and biophysical research communications* 465 (3), S. 349–355. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.160.
- Leithner, K.; Hrzenjak, A.; Trötz Müller, M.; Moustafa, T.; Köfeler, H. C.; Wohlkoenig, C.; Stacher, E.; Lindenmann, J.; Harris, A. L.; Olschewski, A.; Olschewski, H. (2015): PCK2 activation mediates an adaptive response to glucose depletion in lung cancer. *Oncogene* 34 (8), S. 1044–1050. DOI: 10.1038/onc.2014.47.
- Li, J.; Johnson, D.; Calkins, M.; Wright, L.; Svendsen, C.; Johnson, J. (2005): Stabilization of Nrf2 by tBHQ confers protection against oxidative stress-induced cell death in human neural stem cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 83 (2), S. 313–328. DOI: 10.1093/toxsci/kfi027.
- Li, L.; Li, W. (2015): Epithelial-mesenchymal transition in human cancer: comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. *Pharmacology & therapeutics* 150, S. 33–46. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.01.004.
- Liao, J. C.; Lee, K. T.; You, B. J.; Lee, C. L.; Chang, W. T.; Wu, Y. C.; Lee, H.-Z. (2015): Raf/ERK/Nrf2 signaling pathway and MMP-7 expression involvement in the trigonelline-mediated inhibition of hepatocarcinoma cell migration. *Food & nutrition research* 59, S. 29884.
- Mahaffey, C. M.; Zhang, H.; Rinna, A.; Holland, W.; Mack, P. C.; Forman, H. J. (2009): Multi-drug-resistant protein-3 gene regulation by the transcription factor Nrf2 in human bronchial epithelial and non-small-cell lung carcinoma. *Free radical biology & medicine* 46 (12), S. 1650–1657. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.023.
- Maher, J. M.; Dieter, M. Z.; Aleksunes, L. M.; Slitt, A. L.; Guo, G.; Tanaka, Y.; Scheffer, G. L.; Chan, J. Y.; Manautou, J. E.; Chen, Y.; Dalton, T. P.; Yamamoto, M.; Klaassen, C. D. (2007): Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 46 (5), S. 1597–1610. DOI: 10.1002/hep.21831.
- Mantovani, A.; Bottazzi, B.; Colotta, F.; Sozzani, S.; Ruco, L. (1992): The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology Today* 13 (7), S. 265–270. DOI: 10.1016/0167-5699(92)90008-U.
- Marchiq, I.; Le Floch, R.; Roux, D.; Simon, M.-P.; Pouyssegur, J. (2015): Genetic disruption of lactate/H⁺ symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor

cells to phenformin. *Cancer research* 75 (1), S. 171–180. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2260.

Martins, S. F.; Amorim, R.; Viana-Pereira, M.; Pinheiro, C.; Costa, R. F.; Silva, P.; Couto, C.; Alves, S.; Fernandes, S.; Vilaça, S.; Falcão, J.; Marques, H.; Pardal, F.; Rodrigues, M.; Preto, A.; Reis, R. M.; Longatto-Filho, A.; Baltazar, F. (2016): Significance of glycolytic metabolism-related protein expression in colorectal cancer, lymph node and hepatic metastasis. *BMC cancer* 16, S. 535. DOI: 10.1186/s12885-016-2566-9.

McCullagh, K. J.; Poole, R. C.; Halestrap, A. P.; O'Brien, M.; Bonen, A. (1996): Role of the lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. *The American journal of physiology* 271 (1 Pt 1), S. E143-50.

Menendez, J. A.; Corominas-Faja, B.; Cuyàs, E.; García, M. G.; Fernández-Arroyo, S.; Fernández, A. F.; Joven, J.; Fraga, M. F.; Alarcón, T. (2016): Oncometabolic Nuclear Reprogramming of Cancer Stemness. *Stem cell reports* 6 (3), S. 273–283. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.12.012.

Mengual, R.; El Abida, K.; Mouaffak, N.; Rieu, M.; Beaudry, M. (2003): Pyruvate shuttle in muscle cells: high-affinity pyruvate transport sites insensitive to trans-lactate efflux. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 285 (6), S. E1196-204. DOI: 10.1152/ajpendo.00034.2003.

Mitsuishi, Y.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. (2012): The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Frontiers in oncology* 2, S. 200. DOI: 10.3389/fonc.2012.00200.

Moi, P.; Chan, K.; Asunis, I.; Cao, A.; Kan, Y. W. (1994): Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (21), S. 9926–9930.

Montal, E. D.; Dewi, R.; Bhalla, K.; Ou, L.; Hwang, B. J.; Ropell, A. E.; Gordon, C.; Liu, W. J.; DeBerardinis, R. J.; Sudderth, J.; Twaddell, W.; Boros, L. G.; Shroyer, K. R.; Duraisamy, S.; Drapkin, R.; Powers, R. S.; Rohde, J. M.; Boxer, M. B.; Wong, K. K.; Girnun, G. D. (2015): PEPCCK Coordinates the Regulation of Central Carbon Metabolism to Promote Cancer Cell Growth. *Molecular cell* 60 (4), S. 571–583. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.09.025.

Nakajima, E. C.; van Houten, B. (2013): Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. *Molecular carcinogenesis* 52 (5), S. 329–337. DOI: 10.1002/mc.21863.

Nakayama, Y.; Torigoe, T.; Inoue, Y.; Minagawa, N.; Izumi, H.; Kohno, K.; Yamaguchi, K. (2012): Prognostic significance of monocarboxylate transporter 4 expression in patients with colorectal cancer. *Experimental and therapeutic medicine* 3 (1), S. 25–30. DOI: 10.3892/etm.2011.361.

Nguyen, T.; Nioi, P.; Pickett, C. B. (2009): The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* 284 (20), S. 13291–13295. DOI: 10.1074/jbc.R900010200.

- Noble, R. A.; Bell, N.; Blair, H.; Sikka, A.; Thomas, H.; Phillips, N.; Nakjang, S.; Miwa, S.; Crossland, R.; Rand, V.; Televantou, D.; Long, A.; Keun, H. C.; Bacon, C. M.; Bomken, S.; Critchlow, S. E.; Wedge, S. R. (2017): Inhibition of monocarboxylate transporter 1 by AZD3965 as a novel therapeutic approach for diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Haematologica* 102 (7), S. 1247–1257. DOI: 10.3324/haematol.2016.163030.
- Oosterling, S. J.; van der Bij, G. J.; Meijer, G. A.; Tuk, C. W.; van Garderen, E.; van Rooijen, N.; Meijer, S.; van der Sijp, J. R.; Beelen, R. H.; van Egmond, M. (2005): Macrophages direct tumour histology and clinical outcome in a colon cancer model. *The Journal of pathology* 207 (2), S. 147–155. DOI: 10.1002/path.1830.
- Pellerin, L.; Pellegrini, G.; Bittar, P. G.; Charnay, Y.; Bouras, C.; Martin, J. L.; Stella, N.; Magistretti, P. J. (1998): Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Developmental neuroscience* 20 (4-5), S. 291–299.
- Pértiga-Gomes, N.; Vizcaíno, J. R.; Attig, J.; Jurmeister, S.; Lopes, C.; Baltazar, F. (2014): A lactate shuttle system between tumour and stromal cells is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC cancer* 14, S. 352. DOI: 10.1186/1471-2407-14-352.
- Petrelli, A.; Perra, A.; Cora, D.; Sulas, P.; Menegon, S.; Manca, C.; Migliore, C.; Kowalik, M. A.; Ledda-Columbano, G. M.; Giordano, S.; Columbano, A. (2014): MicroRNA/gene profiling unveils early molecular changes and nuclear factor erythroid related factor 2 (NRF2) activation in a rat model recapitulating human hepatocellular carcinoma (HCC). *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (1), S. 228–241. DOI: 10.1002/hep.26616.
- Pinheiro, C.; Longatto-Filho, A.; Azevedo-Silva, J.; Casal, M.; Schmitt, F. C.; Baltazar, F. (2012): Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 44 (1), S. 127–139. DOI: 10.1007/s10863-012-9428-1.
- Pinheiro, C.; Longatto-Filho, A.; Scapulatempo, C.; Ferreira, L.; Martins, S.; Pellerin, L.; Rodrigues, M.; Alves, V. A.; Schmitt, F.; Baltazar, F. (2008): Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 452 (2), S. 139–146. DOI: 10.1007/s00428-007-0558-5.
- Pinheiro, C.; Penna, V.; Morais-Santos, F.; Abrahão-Machado, L. F.; Ribeiro, G.; Curcelli, E. C.; Olivieri, M. V.; Morini, S.; Valença, I.; Ribeiro, D.; Schmitt, F. C.; Reis, R. M.; Baltazar, F. (2014): Characterization of monocarboxylate transporters (MCTs) expression in soft tissue sarcomas: distinct prognostic impact of MCT1 sub-cellular localization. *Journal of translational medicine* 12, S. 118. DOI: 10.1186/1479-5876-12-118.
- Pisarsky, L.; Bill, R.; Fagiani, E.; Dimeloe, S.; Goosen, R. W.; Hagmann, J.; Hess, C.; Christofori, G. (2016): Targeting Metabolic Symbiosis to Overcome Resistance to Anti-angiogenic Therapy. *Cell reports* 15 (6), S. 1161–1174. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.04.028.
- Polański, R.; Hodgkinson, C. L.; Fusi, A.; Nonaka, D.; Priest, L.; Kelly, P.; Trapani, F.; Bishop, P. W.; White, A.; Critchlow, S. E.; Smith, P. D.; Blackhall, F.; Dive, C.; Morrow, C. J. (2014): Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (4), S. 926–937. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2270.

- Poli, G.; Leonarduzzi, G.; Biasi, F.; Chiarpotto, E. (2004): Oxidative stress and cell signalling. *Current medicinal chemistry* 11 (9), S. 1163–1182.
- Pullen, T. J.; da Silva Xavier, G.; Kelsey, G.; Rutter, G. A. (2011): miR-29a and miR-29b contribute to pancreatic beta-cell-specific silencing of monocarboxylate transporter 1 (Mct1). *Molecular and cellular biology* 31 (15), S. 3182–3194. DOI: 10.1128/MCB.01433-10.
- Ramos-Gomez, M.; Dolan, P. M.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W. (2003): Interactive effects of nrf2 genotype and oltipraz on benzoapyrene-DNA adducts and tumor yield in mice. *Carcinogenesis* 24 (3), S. 461–467.
- Rassow, J.; Hauser, K.; Netzker, R.; Deutzmann, R. (2008): Biochemie. 2. Aufl., Thieme, Stuttgart.
- Roessner, A.; Kuester, D.; Malfertheiner, P.; Schneider-Stock, R. (2008): Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathology, research and practice* 204 (7), S. 511–524. DOI: 10.1016/j.prp.2008.04.011.
- Roland, C. L.; Arumugam, T.; Deng, D.; Liu, S. H.; Philip, B.; Gomez, S.; Burns, W. R.; Ramachandran, V.; Wang, H.; Cruz-Monserrate, Z.; Logsdon, C. D. (2014): Cell surface lactate receptor GPR81 is crucial for cancer cell survival. *Cancer research* 74 (18), S. 5301–5310. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0319.
- Sanità, P.; Capulli, M.; Teti, A.; Galatioto, G. P.; Vicentini, C.; Chiarugi, P.; Bologna, M.; Angelucci, A. (2014): Tumor-stroma metabolic relationship based on lactate shuttle can sustain prostate cancer progression. *BMC cancer* 14, S. 154. DOI: 10.1186/1471-2407-14-154.
- Scharl, M.; Biedermann, L.; Rogler, G. (2014): Das Kolitis-assozierte kolorektale Karzinom: Epidemiologie, Pathogenese und Früherkennung. *Praxis* 103 (3), S. 149–154. DOI: 10.1024/1661-8157/a001548.
- Schmidt, R. F.; Lang, F. (2007): Physiologie des Menschen. Springer, Heidelberg. Skloot, R. (2013): Die Unsterblichkeit der Henrietta Lacks. Goldmann Verlag, München.
- Schneiderhan, W.; Scheler, M.; Holzmann, K.-H.; Marx, M.; Gschwend, J. E.; Bucholz, M.; Gress, T. M.; Seufferlein, T.; Adler, G.; Oswald, F. (2009): CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. *Gut* 58 (10), S. 1391–1398. DOI: 10.1136/gut.2009.181412.
- Schueren, F.; Lingner, T.; George, R.; Hofhuis, J.; Dickel, C.; Gärtner, J.; Thoms, S. (2014): Peroxisomal lactate dehydrogenase is generated by translational readthrough in mammals. *eLife* 3, S. e03640. DOI: 10.7554/eLife.03640.
- Sebens, S.; Bauer, I.; Geismann, C.; Grage-Griebenow, E.; Ehlers, S.; Kruse, M.-L.; Arlt, A.; Schäfer, H. (2011): Inflammatory macrophages induce Nrf2 transcription factor-dependent proteasome activity in colonic NCM460 cells and thereby confer anti-apoptotic protection. *The Journal of biological chemistry* 286 (47), S. 40911–40921. DOI: 10.1074/jbc.M111.274902.
- Seril, D. N. (2003): Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis. Studies in humans and animal models. *Carcinogenesis* 24 (3), S. 353–362. DOI: 10.1093/carcin/24.3.353.

- Shah, N. M.; Zaitseva, L.; Bowles, K. M.; MacEwan, D. J.; Rushworth, S. A. (2015): NRF2-driven miR-125B1 and miR-29B1 transcriptional regulation controls a novel anti-apoptotic miRNA regulatory network for AML survival. *Cell death and differentiation* 22 (4), S. 654–664. DOI: 10.1038/cdd.2014.152.
- Shan, T.; Chen, S.; Chen, X.; Lin, W. R.; Li, W.; Ma, J.; Wu, T.; Cui, X.; Ji, H.; Li, Y.; Kang, Y. (2017): Cancer-associated fibroblasts enhance pancreatic cancer cell invasion by remodeling the metabolic conversion mechanism. *Oncology reports* 37 (4), S. 1971–1979. DOI: 10.3892/or.2017.5479.
- Slocum, S. L.; Skoko, J. J.; Wakabayashi, N.; Aja, S.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W.; Char-toumpakis, D. V. (2016): Keap1/Nrf2 pathway activation leads to a repressed hepatic gluconeogenic and lipogenic program in mice on a high-fat diet. *Archives of biochemistry and biophysics* 591, S. 57–65. DOI: 10.1016/j.abb.2015.11.040.
- Sonveaux, P.; Végran, F.; Schroeder, T.; Wergin, M. C.; Verrax, J.; Rabbani, Z. N.; De Saedeleer, C. J.; Kennedy, K. M.; Diepart, C.; Jordan, B. F.; Kelley, M. J.; Gallez, B.; Wahl, M. L.; Feron, O.; Dewhirst, M. W. (2008): Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of clinical investigation* 118 (12), S. 3930–3942. DOI: 10.1172/JCI36843.
- Sotgia, F.; Whitaker-Menezes, D.; Martinez-Outschoorn, U. E.; Salem, A. F.; Tsirigos, A.; Lamb, R.; Sneddon, S.; Hult, J.; Howell, A.; Lisanti, M. P. (2012): Mitochondria "fuel" breast cancer metabolism: fifteen markers of mitochondrial biogenesis label epithelial cancer cells, but are excluded from adjacent stromal cells. *Cell cycle* 11 (23), S. 4390–4401. DOI: 10.4161/cc.22777.
- Sporn, M. B.; Liby, K. T. (2012): NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nature reviews. Cancer* 12 (8), S. 564–571. DOI: 10.1038/nrc3278.
- Taguchi, K.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. (2011): Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 16 (2), S. 123–140. DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x.
- Takada, T.; Takata, K.; Ashihara, E. (2016): Inhibition of monocarboxylate transporter 1 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells. *The journal of physiological sciences : JPS* 66 (5), S. 387–396. DOI: 10.1007/s12576-016-0435-6.
- Ullah, M. S.; Davies, A. J.; Halestrap, A. P. (2006): The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 281 (14), S. 9030–9037. DOI: 10.1074/jbc.M511397200.
- Vander Heiden, M. G.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. (2009): Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324 (5930), S. 1029–1033. DOI: 10.1126/science.1160809.
- Vincent, E. E.; Sergushichev, A.; Griss, T.; Gingras, M.-C.; Samborska, B.; Ntimbane, T.; Coelho, P. P.; Blagih, J.; Raissi, T. C.; Choinière, L.; Bridon, G.; Loginicheva, E.; Flynn, B. R.; Thomas, E. C.; Tavaré, J. M.; Avizonis, D.; Pause, A.; Elder, D. J.; Artyomov, M. N.; Jones,

- R. G. (2015): Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Regulates Metabolic Adaptation and Enables Glucose-Independent Tumor Growth. *Molecular cell* 60 (2), S. 195–207. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.08.013.
- Virchow, R. (1863): Aetologie der neoplastischen Geschwulste/ Pathogenie der neoplastischen Geschwulste. Die Krankhaften Geschwulste. Verlag von August Hirshwald, Berlin.
- Vogelstein, B.; Fearon, E. R.; Hamilton, S. R. ; Kern, S. E.; Preisinger, A. C.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A. M.; Bos, J. L. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319(9): S. 525-32. DOI: 10.1056/NEJM198809013190901.
- Wang, X. J.; Li, Y.; Luo, L.; Wang, H.; Chi, Z.; Xin, A.; Li, X.; Wu, J.; Tang, X. (2014): Oxaliplatin activates the Keap1/Nrf2 antioxidant system conferring protection against the cytotoxicity of anticancer drugs. *Free radical biology & medicine* 70, S. 68–77. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.010.
- Wang, Y.-N.; Yamaguchi, H.; Hsu, J.-M.; Hung, M.-C. (2010): Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene* 29 (28), S. 3997–4006. DOI: 10.1038/onc.2010.157.
- Warburg, O. (1924): Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem. Zeitschr.* 152, 309-344.
- Weitz, J.; Koch, M.; Debus, J.; Höhler, T.; Galle, P. R.; Büchler, M. W. (2005): Colorectal cancer. *Lancet* 365 (9454), S. 153–165. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)17706-X.
- Whitaker-Menezes, D.; Martinez-Outschoorn, U. E.; Lin, Z.; Ertel, A.; Flomenberg, N.; Witkiewicz, A. K.; Birbe, R. C.; Howell, A.; Pavlides, S.; Gandara, R.; Pestell, R. G.; Sotgia, F.; Philp, N. J.; Lisanti, M. P. (2011): Evidence for a stromal-epithelial "lactate shuttle" in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell cycle* 10 (11), S. 1772–1783. DOI: 10.4161/cc.10.11.15659.
- Wilson, M. C.; Meredith, D.; Fox, J. E.; Manoharan, C.; Davies, A. J.; Halestrap, A. P. (2005): Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *The Journal of biological chemistry* 280 (29), S. 27213–27221. DOI: 10.1074/jbc.M411950200.
- Wilson, W. R.; Hay, M. P. (2011): Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 11 (6), S. 393–410. DOI: 10.1038/nrc3064.
- Winiarska, K.; Drozak, J.; Wegrzynowicz, M.; Jagielski, A. K.; Bryła, J. (2003): Relationship between gluconeogenesis and glutathione redox state in rabbit kidney-cortex tubules. *Metabolism: clinical and experimental* 52 (6), S. 739–746.
- Witkiewicz, A. K.; Kline, J.; Queenan, M.; Brody, J. R.; Tsigos, A.; Bilal, E.; Pavlides, S.; Ertel, A.; Sotgia, F.; Lisanti, M. P. (2011): Molecular profiling of a lethal tumor microenvironment, as defined by stromal caveolin-1 status in breast cancers. *Cell cycle* 10 (11), S. 1794–1809. DOI: 10.4161/cc.10.11.15675.
- Witkiewicz, A. K.; Whitaker-Menezes, D.; Dasgupta, A.; Philp, N. J.; Lin, Z.; Gandara, R.; Sneddon, S.; Martinez-Outschoorn, U. E.; Sotgia, F.; Lisanti, M. P. (2012): Using the "reverse

Warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell cycle* 11 (6), S. 1108–1117. DOI: 10.4161/cc.11.6.19530.

Wong, C. C.; Qian, Y.; Yu, J. (2017): Interplay between epigenetics and metabolism in oncogenesis: mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene* 36 (24), S. 3359–3374. DOI: 10.1038/onc.2016.485.

Xu, C.; Huang, M.-T.; Shen, G.; Yuan, X.; Lin, W.; Khor, T. O.; Conney, A. H.; Kong, A. N. (2006): Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumorigenesis in C57BL/6 mice by sulforaphane is mediated by nuclear factor E2-related factor 2. *Cancer research* 66 (16), S. 8293–8296. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0300.

Yamamoto, T.; Suzuki, T.; Kobayashi, A.; Wakabayashi, J.; Maher, J.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. (2008): Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Molecular and cellular biology* 28 (8), S. 2758–2770. DOI: 10.1128/MCB.01704-07.

Yashiro, M. (2015): Molecular Alterations of Colorectal Cancer with Inflammatory Bowel Disease. *Digestive diseases and sciences* 60 (8), S. 2251–2263. DOI: 10.1007/s10620-015-3646-4.

Yoshida, G. J. (2015): Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 34, S. 111. DOI: 10.1186/s13046-015-0221-y.

Zhang, Y.; Sime, W.; Juhas, M.; Sjolander, A. (2013): Crosstalk between colon cancer cells and macrophages via inflammatory mediators and CD47 promotes tumour cell migration. *European journal of cancer* 49 (15), S. 3320–3334. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.06.005.

Danksagung

Mein größter Dank gebührt Herrn Professor Dr. rer. nat. Heiner Schäfer für seinen enormen Beitrag zum erfolgreichen Gelingen der Forschungsarbeit und der Verfassung dieser Dissertation. Seine unermüdliche Begeisterung und Neugier für hochkomplexe Zusammenhänge haben mich von Anfang an mitgerissen und stets motiviert. Auf seine gewissenhafte und exzellente Betreuung war jederzeit Verlass und mit seiner positiven und humorvollen Art war für eine angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor gesorgt. Nur unter seiner meisterhaften Anleitung, seinem zielstrebigem Engagement und der kritischen Begutachtung meiner Dissertation konnte diese realisiert werden. Für die ausgezeichnete Unterstützung möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schreiber, Direktor der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Dr. Janka Held-Feindt aus dem Institut für Neurochirurgie sowie Prof. Dr. Ansgar W. Lohse für die Übernahme und Erstellung des Zweit- bzw. Drittgutachtens.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schäfer sowie den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Arlt und Prof. Zeißig möchte ich einen großen Dank aussprechen. Ein besonderer Dank und meine tiefste Anerkennung gelten Maike Witt-Ramdohr und Iris Kosmol, die mich auf eine hilfsbereite, geduldige sowie sorgfältige Art und Weise in die Methodik des wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt haben. Sie standen mir zu etlichen praktisch-technischen Fragen stets mit kompetentem Rat zur Seite. Weiterhin bedanke ich mich bei Maike Großmann und Frauke Grohmann für ihre Hilfestellungen bei labortechnischen Fragen und Schwierigkeiten. Frau Dr. rer. nat. Claudia Geismann möchte ich für ihre fachlichen Hinweise und Ratschläge insbesondere bzgl. der schriftlichen Form der Dissertation danken. Ein großer Dank geht an Florian Deisinger für die kollegiale Unterstützung in brenzligen Augenblicken, die motivierenden Gespräche und die vielen Hilfestellungen, v a. zum Erstellen von Grafiken. Bei ihm und bei My-Lan Kha sowie Lisa Hesse möchte ich mich vielfach für die schöne gemeinsame Zeit im Labor und außerhalb dessen bedanken.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. med. Christoph Röcken vom Institut für Pathologie für die Bereitstellung der histologischen Schnitte und die Evaluation derer.

Ebensfalls möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Ole Helm für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei den Kokultur-Versuchen mit Makrophagen danken.

Mein besonderer Dank geht an die Deutsche Krebshilfe e.V., die mir im Rahmen eines Promotionsstipendiums der Mildred-Scheel-Stiftung die einzigartige Möglichkeit geboten hat, mich für insgesamt acht Monate voll und ganz auf die Forschungsarbeit konzentrieren zu können.

Des Weiteren danke ich der Research Training Group 1743, bei der ich als assoziierte Doktorandin an Konferenzen, Symposien sowie Trainingskursen aktiv teilnehmen durfte, was meinen Erfahrungsschatz im Bereich Darstellung und Vermittlung von wissenschaftlichen Zusammenhängen beträchtlich erweitert hat.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Großeltern, bin ich zu tiefstem Dank verpflichtet für all ihre Inspiration, Motivation, Unterstützung und erbrachten Opfer, welche mir ein wertvolles Studium und einen erfolgreichen beruflichen Werdegang ermöglicht haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Einfluss des Transkriptionsfaktors Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) auf die metabolische Reprogrammierung kolorektaler Zellen während der entzündlichen Karzinogenese des Darmes“ abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung meines Doktorvaters und der Betreuung im Labor für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Ich versichere, dass in dieser Arbeit keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden. Die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel in der jeweils gültigen Fassung war mir dabei bekannt und die Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft wurden eingehalten.

Weiterhin bestätige ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe und die Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat.

Kiel, den 3. Dezember 2018

Kristina Diehl, Verfasserin