

Untersuchungen zur Regulation des Glucosestoffwechsels in Glioblastomen und dessen Beeinflussung durch Carnosin

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. med.

an der medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

Eingereicht von:

Dipl. Chem. Henry Oppermann

geboren am 10.05.1988 in Leipzig

Angefertigt:

Universität Leipzig

Universitätsklinikum, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie und

Medizinische Fakultät, Institut für Biochemie

Betreuer:

Prof. Dr. Jürgen Meixensberger

Prof. Dr. Frank Gaunitz

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 21.04.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Kurzreferat und Bibliographische Beschreibung	2
2 Abkürzungsverzeichnis.....	3
3 Einleitung	5
3.1 Glioblastoma multiforme	5
3.2 Glucosestoffwechsel	6
3.2.1 Glykolyse.....	6
3.2.2 Glykolyse in Tumorzellen.....	8
3.3 Pyruvatdehydrogenase Komplex	9
3.3.1 Funktion des Pyruvatdehydrogenase Komplexes	9
3.3.2 Regulation der Pyruvatdehydrogenase.....	10
3.3.3 Bedeutung der Pyruvatdehydrogenase für Tumorzellen	12
3.4 Carnosin	13
3.4.1. Metabolismus von Carnosin und dessen Derivate	13
3.4.2 Physiologische Effekte von Carnosin.....	15
3.4.3 Carnosin und Krebs.....	15
4 Zielstellung der Arbeit.....	17
5 Publikation.....	18
6 Weiterführende Arbeiten (noch unveröffentlichte Daten)	30
6.1 Mögliche Beeinflussung des FOXO1 / PGC-1 α Signalweges.....	30
6.2 Mögliche Regulation durch Histonacetylierung.....	32
6.3 PDK Proteinexpressionen unter dem Einfluss von Carnosin	34
7 Zusammenfassung der Arbeit	36
8 Literaturverzeichnis	40
9 Anhang.....	46
9.1 Ergänzendes Material	46
9.2 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	50
9.3 Lebenslauf	51
9.4 Veröffentlichungen	52
9.5 Danksagungen.....	54

1 Kurzreferat und Bibliographische Beschreibung

Untersuchungen zur Regulation des Glucosestoffwechsels in Glioblastomen und dessen Beeinflussung durch Carnosin

Universität Leipzig 2014: Dissertation

54 S., 101 Lit., 7 Abb., 5 Anlagen

Referat:

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der am häufigsten vorkommende maligne Hirntumor mit äußerst ungünstiger Prognose für die betroffenen Patienten. Typisch für die Tumore ist eine hohe Aktivität der Glykolyse zur Generierung von ATP und zur Bereitstellung von Makromolekülen für die Zellproliferation, während die oxidative Phosphorylierung auch in Gegenwart von Sauerstoff praktisch keine Bedeutung für die Generation von ATP hat, was auch als Warburg Effekt bekannt ist. Das natürlich vorkommende Carnosin (β -Alanyl-L-Histidin) wirkt sich antiproliferativ auf Tumorzellen aus, was mit einer Inhibition der glykolytischen ATP Produktion einhergeht. Der Mechanismus der Inhibition ist weitgehend unverstanden und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Im Rahmen der durchgeführten Arbeit wurde der Einfluss von Carnosin auf die mRNA Expressionen von für die Glykolyse relevanten Genen untersucht, wobei eine starke Induktion der Pyruvatdehydrogenase Kinase (PDK) 4 in drei GBM Zelllinien beobachtet wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass L-Histidin den gleichen Effekt wie Carnosin zeigt, nicht jedoch β -Alanin, L-Alanin oder L-Alanyl-L-Histidin. Da Tumorzellen die intrazelluläre Gewebescarnosinase aber kaum die extrazelluläre Serumcarnosinase exprimieren, liegt die Vermutung nahe, dass die antineoplastische Wirkung des Carnosins auf die enzymatische Spaltung von Carnosin und die daraus resultierende Freisetzung von L-Histidin zurückzuführen ist. In weiteren Untersuchungen wurden Hinweise erbracht, dass Carnosin durch eine Beeinflussung von Histon-Deacetylasen, die endogene PDK4 mRNA Expression steigern könnte. Zusätzlich wurden die Proteinexpressionen der PDK1 und 4 unter dem Einfluss von Carnosin untersucht.

2 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALDO	Aldolase
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CN	Carnosinase
CMT	Carnosin-N-Methyltransferase
CoA	Coenzym A
CS	Carnosin-Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermale Wachstumsfaktor
EGFR	EGF Rezeptor
ENO	Enolase
ERR	<i>estrogen-related receptor</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FOXO	<i>forkhead box</i> Protein O
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma multiforme
GIP	Glucose-6-phosphat- Isomerase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDC	Histidindecarboxylase
HIF-1 α	Hypoxie induzierter Faktor 1 α
HK	Hexokinase
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase

LDH	Lactatdehydrogenase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
PDC	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase Kinase
PDP	Pyruvatdehydrogenase Phosphatase
PFK	Phosphofruktokinase
PGK	Phosphoglyceratkinase
PGM	Phosphoglyceratmutase
PK	Pyruvatkinase
PKM2	Pyruvatkinase des Muskeltyps 2
PPAR	Proliferator-aktivierter Rezeptor
PGC-1 α	Proliferator-aktivierter Rezeptor Coaktivator 1 α
PPP	Pentosephosphatweg
PTEN	phosphatase and tensin homolog
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
TPI	Triosephosphat-Isomerase
TPP	Thiaminpyrophosphat
TSA	Trichostatin A
WHO	world health organization

3 Einleitung

3.1 Glioblastoma multiforme

Die Tumore des zentralen Nervensystems werden von der *world health organization* (WHO) in vier Grade unterteilt. Das am häufigsten vorkommende Gliom im Erwachsenenalter ist das Glioblastoma multiforme (GBM), welches aufgrund seiner hohen Malignität und Invasivität als Grad IV Tumor eingestuft wird [1]. Aus pathologischer Sicht zeichnet sich das GBM durch hohe Zelldichte, hohe Proliferation, nukleäre Atypie, Angiogenese und Nekrosen aus [2]. Weiterhin können aufgrund ihres Ursprungs primäre und sekundäre Glioblastome unterschieden werden. Das sekundäre GBM entsteht aus Tumoren des zweiten und/oder dritten Grades, wohingegen das vorwiegend auftretende primäre GBM keine maligne Vorstufe hat. Neben dem klinischen Verlauf sind vor allem histologische Eigenschaften und molekulare Marker für die Diagnostik ausschlaggebend (eine Übersicht bietet [3]). Typisch für primäre Glioblastome ist eine Überexpression des *epidermal growth factor receptor* (EGFR), Mutationen im *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) und der komplette Verlust der Heterozygotie des zehnten Chromosoms [4, 5]. Sekundäre Glioblastome besitzen dagegen Mutationen des Tumorsuppressors p53 und der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) 1/2 und den Verlust der Heterozygotie des 19. Chromosoms [6]. Interessanterweise kommen IDH 1/2 Mutationen nicht in primären Glioblastomen vor [7], wodurch sich sekundäre Glioblastome zweifelsfrei identifizieren lassen. Neben den Identifikationsmarkern unterscheidet sich die klinische Prognose von Patienten mit primären und sekundären Glioblastomen signifikant voneinander. Patienten mit sekundären Glioblastomen besitzen ein mittleres Gesamtüberleben von 7,8 Monaten, wogegen dieses bei primären Glioblastomen nur 4,7 Monate beträgt [5]. Bei zusätzlicher chirurgischer Entfernung des Tumors und Radiotherapie, erhöht sich das mittlere Gesamtüberleben auf 27,1 Monate (sekundäres GBM) bzw. 11,3 Monate (primäres GBM) [7].

Der Ursprung der Glioblastome konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Einerseits wird vermutet, dass Gliome von ausdifferenzierten Astrozyten oder Oligodendrozyten abstammen und durch diverse genetische Veränderungen die Proliferation initiiert, die Induktion von Apoptose überwunden und verschiedene Signalwege reaktiviert werden [8]. Andererseits besteht die Hypothese, dass Neuronale Stammzellen der Ursprung von Gliomen sind (eine Übersicht bietet [9]). Die Theorie begründet sich daraus, dass innerhalb von GBM Gewebe Populationen mit Stammzellencharakter gefunden werden [10]. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass durch eine erhöhte Konzentration von epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) oder *platelet-derived growth factor* (PDGF) [11] oder

durch die künstliche Überexpression der entsprechenden Rezeptoren in neuronalen Stammzellen hoch invasive GBM-ähnliche Gewebe entstehen. [5].

Durch die hohe Invasivität und folgende Rezidiv-Bildung der GBM wird die Therapie besonders erschwert. Auch die zusätzlich zu chirurgischer Entfernung und Radiotherapie erfolgende Behandlung mit Temozolomid erhöht die mittlere Lebenserwartung laut einer Studie von Stupp *et al.* nur von 12,1 auf 14,6 Monate [12]. Daher ist die Entwicklung von neuen Therapieansätzen von höchstem klinischem Interesse. Ein Ansatz bietet der veränderte Stoffwechsel in Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen, welcher als Warburg Effekt bekannt ist.

3.2 Glucosestoffwechsel

Der wichtigste katabole Metabolismus, welcher in den meisten Zellen vorkommt, ist die Glykolyse. Innerhalb dieses Stoffwechselweges wird ein Molekül Glucose unter der Aufwendung von zwei Adenosintriphosphat (ATP) und zwei Nicotinamidadenindinukleotiden (NAD^+) zu zwei Molekülen Pyruvat, vier ATP und zwei NADH/H^+ umgesetzt (siehe Abbildung 1). Im Folgenden soll die Glykolyse kurz vorgestellt und ihre Bedeutung für Tumorzellen erläutert werden.

3.2.1 Glykolyse

Die Glykolyse ist im Zytoplasma der Zelle lokalisiert und produziert ATP ohne die Beteiligung von molekularem Sauerstoff, welcher für die ATP Gewinnung durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien essentiell ist. Daher ist die Glykolyse für Erythrozyten, die keine Mitochondrien besitzen oder Zellen unter anaeroben Bedingungen der zentrale Weg zur Synthese von ATP aus Glucose. Prinzipiell kann man den Stoffwechselweg in drei Phasen unterteilen. Die erste Phase ist der energieverbrauchende Abschnitt, wobei zuerst Glucose durch die Hexokinase unter Aufwendung eines ATP zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert wird. Danach erfolgt eine Isomerisierung durch die Glucose-6-phosphat-Isomerase zu Fructose-6-phosphat und eine erneute Phosphorylierung zu Fructose-1,6-bisphosphat mittels ATP und der Phosphofruktokinase. In der zweiten Phase erfolgt die Spaltung der Hexose in zwei Triosen mittels der Aldolase. Da Dihydroxyacetonphosphat im nächsten Schritt nicht weiter verarbeitet werden kann, muss

zunächst eine Isomerisierung zu dem ebenfalls gebildeten Glycerinaldehyd-3-phosphat erfolgen.

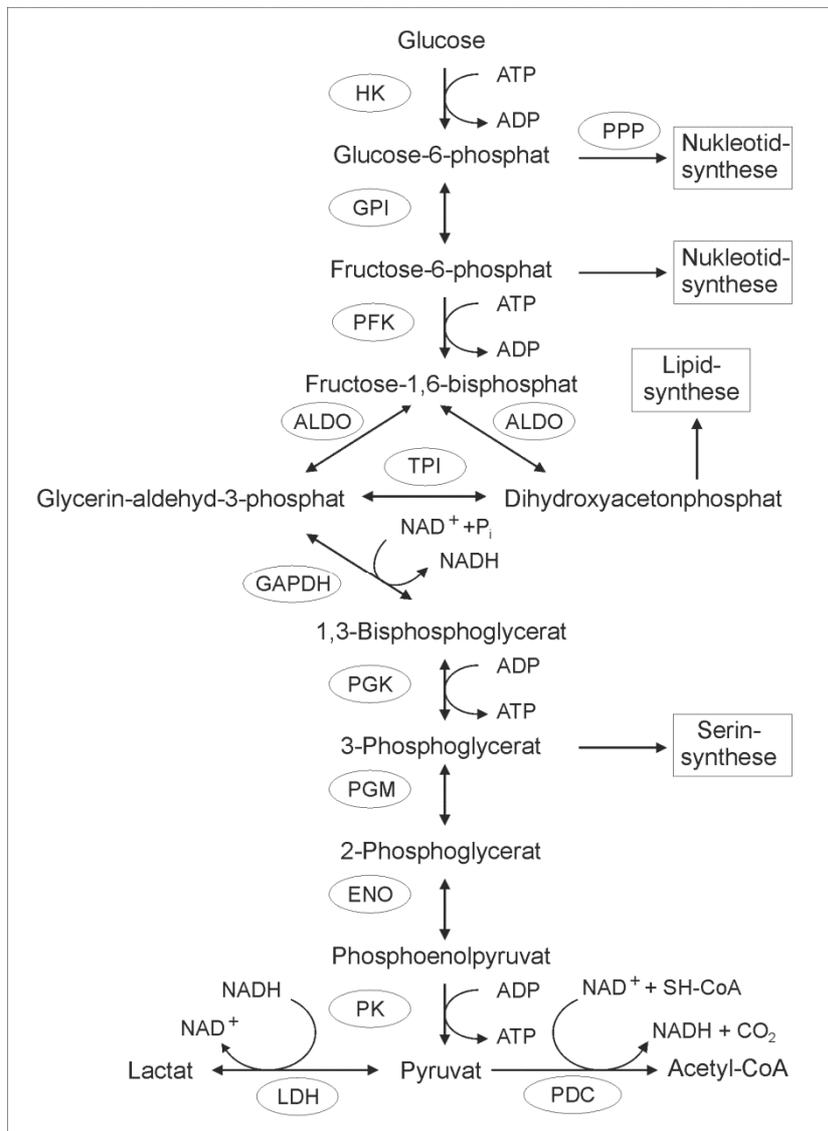


Abbildung 1:
Verstoffwechslung der Glucose in der Glykolyse.

Durch die Glykolyse wird ein Molekül Glucose unter der Aufwendung von zwei ATP und zwei NAD^+ zu zwei Molekülen Pyruvat, vier ATP und zwei NADH verstoffwechselt. Zur näheren Erläuterung: siehe Text.

(Abkürzungen:
 HK = Hexokinase; PPP = Pentosephosphatweg;
 GPI = Glucose-6-phosphat-Isomerase; PFK = Phosphofruktokinase;
 ALDO = Aldolase; TPI = Triosephosphat-Isomerase;
 GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; PGK = Phosphoglyceratkinase;
 PGM = Phosphoglyceratmutase; ENO = Enolase;
 PK = Pyruvatkinase; LDH = Lactatdehydrogenase; PDC = Pyruvatdehydrogenase-komplex (Mitochondrium);
 CoA = Coenzym A)

Die letzte Phase ist die Energierückgewinnung, wobei die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase eine zentrale Rolle spielt. In diesem Schritt wird das zuvor gesplante (oder isomerisierte) Aldehyd, mittels der Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ , zu einer Carbonsäure oxidiert, wobei der Energiegewinn dazu dient, anorganisches Phosphat an den Zucker zu binden. Im Folgenden wird 1,3-Bisphosphoglycerat durch die Phosphoglyceratkinase dephosphoryliert, um ein ATP zu gewinnen (bilanziell zwei je Molekül Glucose), worauf mittels der Phosphoglyceratmutase 2-Phosphoglycerat gebildet wird, um mittels Dehydratisierung durch die Enolase Phosphoenolpyruvat zu erhalten. Im letzten Reaktionsschritt der Glykolyse erfolgt durch die Pyruvatkinase der irreversible Transfer von Phosphat von Phosphoenolpyruvat auf ADP, unter der Bildung von Pyruvat und ATP, wodurch bilanziell wieder zwei ATP pro Molekül Glucose gewonnen werden. Unter aeroben Bedingungen erfolgt im Anschluss der Glykolyse die Speisung des Citratzyklus durch die

Oxidation von Pyruvat im Pyruvatdehydrogenase Komplex im Mitochondrium (siehe 3.3 Pyruvatdehydrogenase Komplex). Da in der Glykolyse pro Molekül Glucose zwei NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert werden, muss NADH reoxidiert werden, damit die Glykolyse nicht zum Erliegen kommt. Unter aeroben Bedingungen erfolgt dieser Vorgang mittels der oxidativen Phosphorylierung unter der Bildung von ATP im Mitochondrium, wohingegen unter anaeroben Bedingungen Pyruvat zu L-Lactat reversibel reduziert wird, um NAD^+ zu generieren.

Neben der Gewinnung von ATP und Reduktionsäquivalenten können Intermediate der Glykolyse auch zur Synthese von Verbindungen verwendet werden, welche zum Aufbau von Biomasse benötigt werden (eine Übersicht bietet [13]). Dazu kann Glucose-6-phosphat in den Pentosephosphatweg eingehen, um Ribose-5-phosphat für die Synthese von Nukleotiden, Coenzymen und Aminosäuren bereit zu stellen. Zusätzlich wird durch den Stoffwechselweg NADPH generiert, welches für die Lipidsynthese benötigt wird. Dihydroxyacetonphosphat dient als Grundlage für Glycerolipide, die zum Aufbau von Zellmembranen benötigt werden. Weiterhin ist es möglich, 3-Phosphoglycerat zur Synthese der Aminosäure Serin zu nutzen, welche Verwendung zum Aufbau von Lipiden und anderen Aminosäuren findet.

3.2.2 Glykolyse in Tumorzellen

Im letzten Jahrhundert beobachtete Otto Warburg, dass Tumorzellen in Anwesenheit von Sauerstoff bei der Verstoffwechslung von Glucose Lactat statt CO_2 bilden. Da dieser Prozess in normalen Zellen nur unter anaeroben Bedingungen abläuft, bezeichnet man diesen nach ihm benannten Effekt auch aerobe Glykolyse [14]. Während Otto Warburg vermutete, dass die Beobachtung auf Defekte des Mitochondriums zurückzuführen sind, ist diese Theorie heute nicht mehr aufrecht zu erhalten, da verschiedene Mechanismen eine Rolle zu spielen scheinen [15]. Zwar scheinen Tumorzellen die oxydative Phosphorylierung nicht zur ATP Generierung zu nutzen [16], jedoch dient die Glykolyse in Tumorzellen nicht einzig allein zur Generierung von ATP [13]. Vielmehr werden die Intermediate der Glykolyse dazu genutzt, um Verbindungen für die Zellteilung zu synthetisieren (siehe 3.2.1 Glykolyse). Es sind bereits verschiedene Wege bekannt, wie Tumorzellen den glykolytischen Fluss steigern können, um die Konzentration der Glykolyseintermediate zu erhöhen. Da es den Rahmen dieser Arbeit übersteigt, auf alle bekannten Möglichkeiten einzugehen, sind nur 3 dieser Fälle hier kurz erwähnt.

Eine erhöhte Aktivität des *mammalian target of rapamycin* (mTOR) in Tumorzellen resultiert unter anderem in einer gesteigerten Expression des Isoenzym der Pyruvatkinase des Muskeltyps 2 (PKM2). Die PKM2 weist eine deutlich geringere Enzymaktivität als die in normalen Zellen exprimierte Variante 1 auf [17], was dazu führt, dass die Intermediate der Glykolyse aufgestaut und zur Biomassesynthese benutzt werden können. Das restliche gebildete Pyruvat wird zu Lactat reduziert, um NAD^+ zu regenerieren [18]. Durch eine Überaktivität von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) und unter dem Einfluss von Hypoxie können die Transkriptionsfaktoren c-MYC und der Hypoxie induzierte Faktor 1 α (HIF-1 α) zur erhöhten Transkription von Glucosetransportern und Enzymen der Glykolyse führen, welche die Aktivität des Stoffwechselweges stark erhöhen [19]. Eine weitere Beeinflussung der Glykolyse erfolgt durch die Pyruvatdehydrogenase Kinasen (PDKs), welche durch reversible Phosphorylierung den Pyruvatdehydrogenase Komplex (PDC) inhibieren. Eine Überexpression der PDKs führt zur Blockierung des PDCs und somit zur bevorzugten Reaktion von Pyruvat zu Lactat, sowie zur Akkumulation von Glykolyse Intermediaten, kurz den Warburg Effekt [20].

3.3 Pyruvatdehydrogenase Komplex

Der PDC ist ein Multienzymkomplex und verbindet die Glykolyse mit dem Citratzyklus und der Lipidsynthese, indem er Pyruvat irreversibel oxidativ decarboxyliert. In Säugetieren nimmt der PDC eine Schlüsselposition ein, da er den Fortlauf von Pyruvat bestimmt und dadurch die Glykolyse während Hunger- und Nahrungsaufnahmephasen reguliert.

3.3.1 Funktion des Pyruvatdehydrogenase Komplexes

Der PDC setzt sich aus einer vielfachen Kombination von drei verschiedenen Enzymen zusammen: der Pyruvatdehydrogenase (PDH, E_1), der Dihydrolipoyl-Transacetylase (E_2) und der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E_3). Da diese drei Enzyme im Komplex sehr nah beieinander liegen, verläuft die Bildung von Acetyl-CoA, CO_2 und NADH/H^+ aus Pyruvat und NAD^+ sequenziell und schnell. In der E_1 Untereinheit wird zunächst Pyruvat gebunden und mittels einer Reaktion mit Thiaminpyrophosphat (TPP) zu Hydroxyethyl-TPP irreversibel decarboxyliert. Danach erfolgt die reduktive Acetylierung des E_2 zugehörigen Lipoamids unter Bildung von S-Acetyldihydroliponamid und der Regeneration von TPP. In der E_2 Untereinheit erfolgt nun der Transfer der Pyruvat-stämmigen Acetyl-Gruppe auf SH-CoA unter der Bildung von Acetyl-CoA und Dihydrolipoamid. Um Lipoamid wieder bereit zu

stellen, wird Dihydrolipoamid durch in der E₃ Untereinheit gebundenes Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) oxidiert, wobei FAD zu FADH₂ wird. Im letzten Schritt wird in der E₃ Untereinheit FADH₂ wieder zu FAD oxidiert und NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert [21].

3.3.2 Regulation der Pyruvatdehydrogenase

Aufgrund seiner Bedeutsamkeit für den Glucosestoffwechsel und die Lipidsynthese, wird die Aktivität des PDCs umfangreich reguliert. Zum einen wird der Komplex allosterisch durch ATP, Acetyl-CoA, NADH und freie Fettsäuren inhibiert, wobei erhöhte Konzentrationen von Adenosinmonophosphat (AMP), SH-CoA, NAD⁺, und Calcium zur gesteigerten Aktivität führen [22] (siehe Abbildung 2).

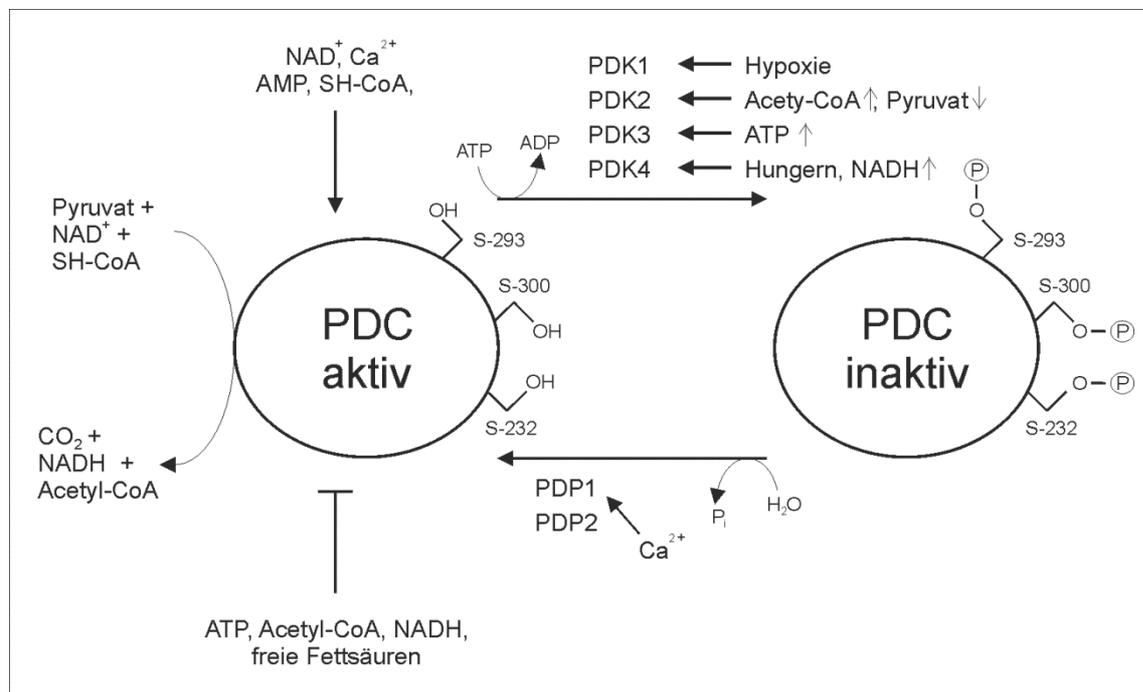


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Regulation des Pyruvatdehydrogenase Komplexes (PDC) (gestaltet nach [22, 23])

Der PDC verbindet die Glykolyse mit dem Citratzyklus und ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Innerhalb des Multienzymkomplexes wird Pyruvat unter der Aufwendung von NAD⁺ zu Acetyl-CoA, CO₂ und NADH umgesetzt. Die Inhibition des PDCs erfolgt durch Phosphorylierung über Pyruvatdehydrogenase Kinasen (PDK) und seine Reaktivierung über Dephosphorylierung durch Pyruvatdehydrogenase Phosphatasen (PDP). ⊥ : Inhibition; ← : Aktivierung

Die maßgebliche Regulation des PDCs erfolgt durch Phosphorylierungen an drei Serinresten der PDH durch die PDKs. Die Phosphorylierungen können andererseits durch Pyruvatdehydrogenase Phosphatase (PDP) wieder aufgehoben werden. Die Serinreste der PDH befinden sich im humanen Protein an den Positionen S-293 (Position 1), S-300 (Position 2) und S-232 (Position 3), wobei bereits die Phosphorylierung an einer der drei

Positionen zur Inhibition des PDCs führt. Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass die Position 1 eine besondere Rolle zu spielen scheint, da diese Einfluss auf die Bindung von Pyruvat und damit auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt hat. Durch die Bindung der PDKs und PDPs an die E₂ Untereinheit, sind die regulierenden Enzyme ein Teil des PDCs [24]. Die in Säugetieren vorkommenden Isoenzyme der PDK werden gewebsspezifisch exprimiert, wobei sich die PDK1 im Herzen, PDK2 in fast allen Geweben, PDK3 im Hoden und PDK4 in Herz- und Skelettmuskel befinden [25]. Weiterhin werden die Serinreste der PDH von den Isoenzymen mit unterschiedlichen Aktivitäten phosphoryliert, wobei Position 1 am schnellsten modifiziert wird (Aktivität der Isoenzyme: PDK2 > PDK4 > PDK1 > PDK3), gefolgt von der Position 2 (Aktivität der Isoenzyme: PDK3 > PDK4 > PDK2 > PDK1). Die Phosphorylierung der Position 3 erfolgt mit der langsamsten Kinetik und kann nur von der PDK1 durchgeführt werden. Dagegen existieren nur 2 Isoenzyme der PDP in Säugetieren, die alle drei Serinreste mit der gleichen Geschwindigkeit dephosphorylieren [23].

Wie der PDC können auch die Enzymaktivitäten der PDKs durch die Konzentrationen von Metaboliten reguliert werden. So erfolgt eine Inhibition durch erhöhte Mengen an Pyruvat, NAD⁺ und ADP und eine Aktivierung durch NADH, Acetyl-CoA und ATP. Jedoch ist die Sensitivität der Isoenzyme gegenüber den Metaboliten unterschiedlich, was eine anpassungsfähige Regulation ermöglicht. Hierbei ist die PDK2 am sensitivsten gegenüber Pyruvat und Acetyl-CoA, PDK4 gegenüber NADH und PDK3 gegenüber ATP (eine Übersicht bietet: [26]).

Ein wichtiger Mechanismus für die Langzeitregulation des PDCs ist die Isoenzym spezifisch gesteuerte Genexpression der PDKs. Die transkriptionale Aktivität der PDK1 steigert sich zum einen durch Hypoxie, mittels HIF-1 α , zum anderen aber auch durch den Faktor c-MYC [27] und durch den WNT-Signaltransduktionsweg [28]. Die Expressionssteigerung des PDK4 Gens kann vor allem beim Fasten beobachtet werden, was primär durch die Aktivierung von *forkhead box* Proteinen O (FOXO), Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) und PPAR Coaktivator 1 α (PGC-1 α) erfolgt und durch die Zugabe von Insulin wieder reduziert wird [29]. Weiterhin können Glucocorticoide wie Dexamethason oder Retinsäuren die Promotoraktivität des PDK4 Gens positiv beeinflussen. Lee *et al.* beobachteten erhöhte PDK4 mRNA Mengen unter Hypoxie, was auf eine HIF-1 α vermittelte Steigerung des *estrogen-related receptor* (ERR) γ zurückzuführen war [30]. Zusätzlich ist die Regulation der PDK4 stark von dem Acetylierungsstatus der Histone abhängig [31]. Im Gegensatz zur Kontrolle der PDK4 Genexpression, ist über die PDK2 und 3 wenig bekannt. Bisher konnte eine insulinabhängige Regulation der Isoform 2 nachgewiesen werden [32] und eine HIF-1 α

bedingte erhöhte PDK3 Promotoraktivität [33]. Weiterhin werden die Isoformen 2 und 3 ebenfalls durch PPAR aktiviert [34].

3.3.3 Bedeutung der Pyruvatdehydrogenase für Tumorzellen

Da der Pyruvatdehydrogenase Komplex wesentlich die Weiterverarbeitung von Pyruvat steuert, ist der Multienzymkomplex für Tumorzellen von großer Bedeutung. Die Inhibition der PDH verhindert den Eintritt des Pyruvats in den Citratzyklus und führt zu dessen Reduktion zu Lactat, was in fast allen Tumoren zu beobachten ist (siehe 3.2.2 Glykolyse in Tumorzellen). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivität des PDCs in Tumorzellen stark reduziert ist, was auf eine überhöhte Expression von PDKs zurückzuführen ist. Weiterhin führt die Inhibition der PDKs zu verringertem Tumorwachstum, Lactatsekretion und Reaktivierung der oxidativen Phosphorylierung [20, 35, 36]. Aufgrund dieser Beobachtungen werden die PDKs als tumorspezifisches Target immer interessanter [37]. Mc Fate *et al.* zeigten, dass es durch die Abschaltung des PDK1 Genes in Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereiches nicht nur zu einer Verschiebung des Metabolismus von der aeroben Glykolyse (Warburg Effekt) zur oxidativen Phosphorylierung kommt, sondern dass auch der Transkriptionsfaktor HIF-1 α destabilisiert wird [35]. Da die PDK1 durch stabilisiertes HIF-1 α verstärkt exprimiert wird, führt die Inhibition des PDCs zu einem Kreislauf, welcher den Metabolismus immer mehr zur aeroben Glykolyse wechseln lässt. Weiterhin kann die Aktivität des PDCs in Tumorzellen durch die direkte Phosphorylierung der PDH durch RTKs (Vergleichbarer Prozess der PDKs) [38] und die Inhibition der PDPs [39] verringert werden. Interessanterweise kommt die Desregulierung des PDCs auch bei Krankheiten wie Glukoseintolleranz und Alzheimer vor [40].

Trotz der oft beobachteten Inhibition des PDCs in Tumorzellen, ist meist noch eine Restaktivität vorhanden. Marin-Valencia *et al.* zeigten, dass Glioblastomzellen den PDC nutzen, um Glutamin über den Citratzyklus zu synthetisieren [41]. Glutamin wird von Tumorzellen verwendet, um andere Aminosäuren zu synthetisieren und NADPH zu generieren [42, 43]. Andererseits wird durch den PDC Citrat gebildet, aus dem nach dem Transport in das Cytosol durch die ATP-Citrat-Lyase cytosolisches Acetyl-CoA gebildet werden kann, das zum einem in die Lipidsynthese eingeht und zum anderen für den epigenetischen Regulationsmechanismus der Acetylierung von Histonen genutzt wird [44]. Somit bietet ein aktiver PDC durch die Bereitstellung von Glutamin (Aminosäuresynthese) und Acetyl-CoA (Lipidsynthese und Acetylierung) Vorteile für Tumorzellen. Grassian *et al.* zeigten, dass die künstliche Überexpression der PDK4 in MCF-10A Zellen (immortalisierte

Epithelzellen) zur Inhibierung des PDCs und des Zellwachstums führt [45]. Außerdem präsentierte diese Arbeitsgruppe in der gleichen Arbeit eine Auswertung von Microarray Daten, welche zeigten, dass die PDK4 in Tumoren im Vergleich zu deren Ursprungsgewebe herunter reguliert ist. An dieser Stelle ist auch interessant, dass Arbeiten von Zachar *et al.* zeigten, dass eine Inhibition des PDCs durch das Liponsäureanalogon CPI-613 ebenfalls zu einem verringerten Wachstum und zur Apoptose von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* führt [46].

3.4 Carnosin

Das natürlich vorkommende Dipeptid L-Carnosin (β -Alanyl-L-Histidin) wurde erstmals von Gulewitsch und Amiradžibi vor mehr als einem Jahrhundert isoliert [47]. Im Menschen findet man die höchsten Konzentrationen an Carnosin im Skelettmuskel mit $21,3 \pm 4,2$ mmol pro kg Trockenmasse bei Männern und mit $17,5 \pm 4,8$ mmol pro kg Trockenmasse bei Frauen [48]. Weiterhin konnte das Dipeptid im Gehirn nachgewiesen werden, wobei hier die Konzentration des Analogons Homocarnosin überwiegt [49]. Im Laufe der Zeit wurden weitere Varianten des Carnosins in den Skelettmuskeln verschiedener Tierarten gefunden, wobei den größten Teil die methylierten Analoge Anserin und Ophidin ausmachen (eine Übersicht bietet [50]).

3.4.1. Metabolismus von Carnosin und dessen Derivate

L-Carnosin wird aus β -Alanin und L-Histidin unter der Aufwendung von ATP mittels der Carnosin-Synthase (CS; EC 6.3.2.11) gebildet, welche eine breite Substratspezifität besitzt. Demnach kann die CS verschiedene Dipeptide formen, welche aus Derivaten von β -Alanin und L-Histidin bestehen, wozu die Produkte Homocarnosin und Anserin gehören [51] (siehe Abbildung 3). Das Enzym wird in verschiedenen Geweben exprimiert, kommt aber zum größten Teil im Skelett- und Herzmuskel sowie verschiedenen Hirnarealen vor [52, 50]. Hoffmann *et al.* beobachteten, dass sich Oligodendrozyten und Astrozyten voneinander unterscheiden [53]. Während Oligodendrozyten Carnosin synthetisieren, nehmen Astrozyten das gebildete Carnosin auf. Auch Anserin und Ophidin können mittels der CS gebildet werden, jedoch ist für deren Synthese die Carnosin-N-Methyltransferase (CMT; EC 2.1.1.22) das physiologisch bedeutsamere Enzym [54]. Die CMT katalysiert den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin auf den Imidazolring des Carnosins, wobei durch die Methylierung des 1-Stickstoffs Anserin und des 3-Stickstoffs Ophidin entsteht (siehe

Abbildung 3) [55]. Jedoch konnte das Enzym noch nicht im Menschen nachgewiesen werden, was sich mit dem Fehlen von methylierten Carnosinderivaten deckt [50].

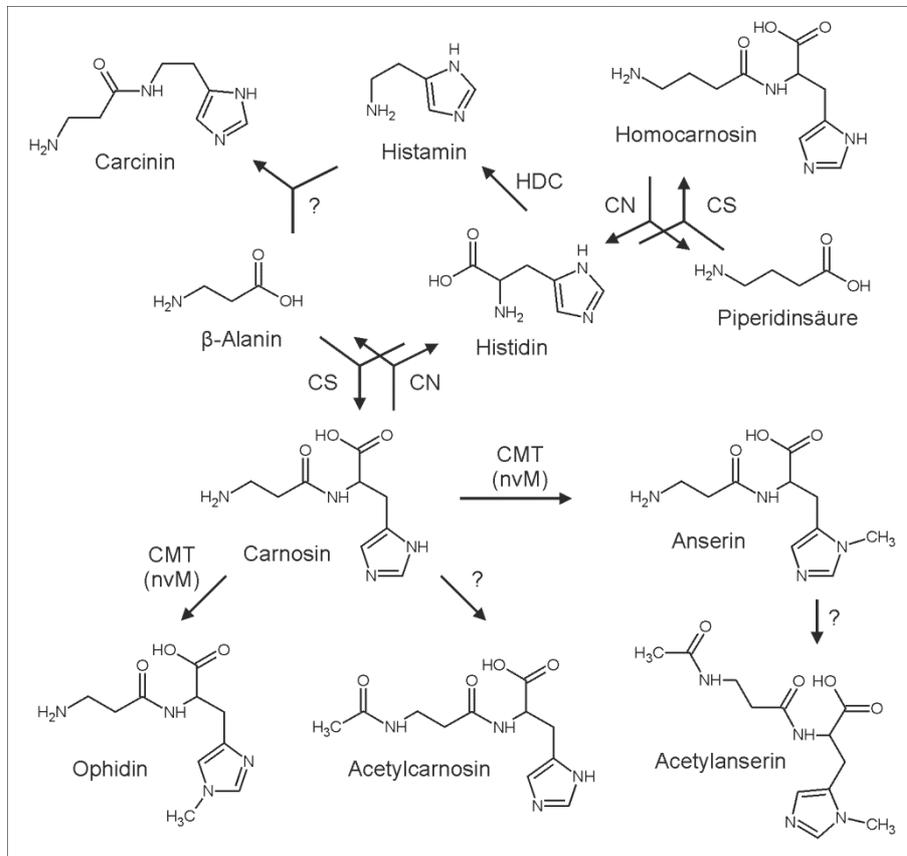


Abbildung 3:
Metabolismus von Carnosin (gestaltet nach [50])

Carnosin und Homocarnosin werden durch die Carnosin-Synthase (CS) aus Histidin und β -Alanin bzw. Piperidinsäure gebildet. Beide Dipeptide werden durch die Carnosinase (CN) wieder gespalten.

(Abkürzungen: HDC = Histidindecarboxylase; CMT = Carnosin-N-Methyltransferase; nvM = nicht vorkommend im Menschen; ? = kaum verstandener Prozess)

Der Abbau von Carnosin und dessen Derivaten erfolgt durch Carnosinasen (CN). Diese kommen als extrazelluläre Serumcarnosinase (CN1; EC3.4.13.20) und als cytosolische Gewebescarnosinase (CN2; 3.4.13.18) vor. Die Synthese der CN1 erfolgt im Gehirn, wo sie in die Zerebrospinalflüssigkeit abgegeben wird und hierüber in den Blutkreislauf gelangt [56]. Die CN2 liegt intrazellulär vor und wird ubiquitär exprimiert, wobei die höchste Aktivität in der Niere zu finden ist [57]. Weiterhin unterscheiden sich die Carnosinasen in ihrer spezifischen Hydrolyse gegenüber histidinhaltigen Dipeptiden. Teufel *et al.* [58] zeigten, dass die CN1 mit geringer Aktivität gegenüber L-Alanyl-L-Histidin und Homocarnosin fast ausschließlich nur Carnosin spaltet. Im Kontrast dazu hydrolysiert CN2 mehrere verschiedene histidinhaltige Dipeptide, jedoch nicht Homocarnosin, weshalb sie auch „cytosolische unspezifische Dipeptidase“ genannt wird [58].

3.4.2 Physiologische Effekte von Carnosin

Seit seiner Entdeckung vor gut 100 Jahren, wurden viele physiologische Effekte des Carnosins beschrieben, jedoch ist die biologische Rolle von Carnosin umstritten. Da die Beobachtungen keine eindeutigen Zusammenhänge liefern, wird nicht ausgeschlossen, dass das Dipeptid mehrere Funktionen besitzt [59]. Bereits 1938 wurde vermutet, dass Carnosin eine wesentliche Rolle beim Puffern des pH-Wertes im Muskel spielt [60]. Weiterhin konnten Carnosin mehrere protektive Eigenschaften zugewiesen werden. Das Dipeptid ist zum einen Fänger von reaktiven Sauerstoffspezies [61] und zum anderen schützt es vor Schwermetallen als Chelator [62]. Zusätzlich bewahrt es vor Hypochloriden, reaktiven Stickstoffspezies und Lipidoxidation [63]. Da Piperidinsäure (auch GABA), ein inhibitorischer Neurotransmitter, zur Synthese von Homocarnosin Verwendung findet, wurde vermutet, dass auch Carnosin als Neurotransmitter fungieren könnte [64]. Zwar konnte noch kein Rezeptor identifiziert werden, an den Carnosin bindet, um diese These zu bestätigen, jedoch schützt die Anwesenheit von Carnosin im zentralen Nervensystem vor Excitotoxizität [65]. Werden Proteine bei der Synthese nicht richtig gefaltet oder durch Modifikationen beschädigt, handelt es sich um Proteotoxizität, welche mit altersverbundenen Krankheiten wie Alzheimer in Verbindung gebracht wird. Carnosin wirkt sich protektiv auf Proteine aus, indem es vor Schäden schützt, die durch Glykation durch Zuckermoleküle [66], Methylglyoxal [67] und β -Amyloptide [68] verursacht werden. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde Carnosin bereits zur möglichen Verwendung als Medikament bei Alzheimer in Betracht gezogen [69]. Weiterhin wurde der Einsatz des Dipeptids, unter der Durchführung von ersten klinischen Studien, bei mehreren Krankheiten für möglich gehalten, worunter Parkinson [70], Autismus-Spektrum-Störung [71], Katarakt [72], Schizophrenie [73] und das Golfkriegssyndrom [74] gehören. In einer weiteren klinischen Arbeit zeigten Sakae *et al.*, dass die Verabreichung von Carnosin zu einer signifikanten Steigerung bei der Heilung von Geschwüren führt [75]. In Bezug auf Diabetes konnten ebenfalls günstige Effekte mit Carnosin im Mausmodell gezeigt werden [76]. Eine weitere Einsatzmöglichkeit von Carnosin bezieht sich auf seine altershemmende Wirkung [77], wobei noch nicht geklärt werden konnte, ob dies auf Carnosins protektive Eigenschaften zurückzuführen ist [78].

3.4.3 Carnosin und Krebs

Die erste experimentelle Arbeit über die antineoplastische Wirkung von Carnosin präsentierten Nagai und Suda im Jahr 1986 [79]. Die Autoren implantierten Sarcoma-180 Tumorzellen subkutan in Mäuse und verabreichten den Tieren jeden zweiten Tag Carnosin

(50 mg pro kg Körpergewicht). In diesem Experiment war das Tumorwachstum in den mit Carnosin behandelten Mäusen deutlich verringert, verglichen mit den mit Salzlösung behandelten Tieren. Da diese Arbeit in Japanisch veröffentlicht wurde, folgte erst 10 Jahre später die erneute Präsentation des antineoplastischen Effekts. Holliday und McFarland zeigten in einem Co-Kultur-Modell, dass Carnosin selektiv das Wachstum von HeLa-Zellen (Gebärmutterhalskrebszellen) inhibiert [80]. Inspiriert von der Arbeit von Holliday und McFarland untersuchten Renner *et al.* [81] den Einfluss von Carnosin auf das Wachstum von Zellen, welche aus humanen GBMs isoliert wurden. Als sich zeigte, dass das Dipeptid in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit die Proliferation der untersuchten Zellen inhibierte, reproduzierte die gleiche Arbeitsgruppe die Ergebnisse von Nagai und Suda in einem Her2/neu Mausmodell *in vivo* [82]. Horii *et al.* zeigten in einem weiteren Mausmodell, dass das Wachstum von transplantierten Darmkrebszellen durch Carnosin reduziert wird [83], wenn die Tiere, im Gegensatz zu Renner *et al.* und Nagai und Suda, welche eine Carnosinlösung injizierten, das Dipeptid durch das Trinkwasser erhielten. Weiterhin wurde der antineoplastische Effekt von Carnosin in weiteren Zelltypen bestätigt [84–86] und die mögliche Verwendung des Dipeptids als anti-Tumormedikament in Betracht gezogen [87]. In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, auf welche Art und Weise Carnosin das Tumorwachstum verringert. Renner *et al.* zeigten, dass Carnosin die glykolytische ATP Produktion inhibiert [16], was durch Iovine *et al.* bestätigt wurde [86]. Durch eine Proteomik-Studie mittels 2D-Gelelektrophorese konnte die veränderte Expression von 31 verschiedenen Proteinen unter dem Einfluss von Carnosin beobachtet werden. Die durch massenspektrometische Studien identifizierte Proteine wiesen auf eine Beeinflussung des HIF-1 α Signaltransduktionsweges hin [88]. Daraufhin demonstrierten unterschiedliche Arbeitsgruppen, dass Carnosin die Expression von HIF-1 α verringern [89, 90], aber auch steigern kann [91]. Zhang *et al.* präsentierten in ihrer Arbeit einen ähnlichen inhibitorischen Effekt auf mTOR, wie der Inhibitor Rapamycin [92]. Trotz der gewonnenen Erkenntnisse konnte der genaue Mechanismus der antiproliferativen Wirkung von Carnosin jedoch bislang nicht entschlüsselt werden, was weitere experimentelle Aufwendungen erfordert [93].

4 Zielstellung der Arbeit

Das GBM ist der am häufigsten vorkommende Hirntumor mit sehr hoher Malignität, welcher sich durch eine hohe Proliferation, Invasivität und Nekrosen auszeichnet. Ebenfalls typisch für das GBM und andere Tumore ist seine hohe glykolytische Aktivität. Da Tumorzellen ihr ATP und auch Bausteine für die Proliferation durch die Glykolyse gewinnen, ist die Beeinflussung dieses Stoffwechselweges für Therapieansätze von höchstem Interesse. Das Dipeptid Carnosin, welches erstmals vor knapp 100 Jahren isoliert wurde, hemmt die Proliferation von Tumorzellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Carnosin die glykolytische ATP Produktion inhibiert, wodurch sich Carnosin als Medikament gegen Tumore eignen könnte. Jedoch ist die Art und Weise, wie das Dipeptid die Glykolyse in Tumorzellen hemmt, kaum verstanden.

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der molekularen Veränderungen von mit Carnosin behandelten Tumorzellen, mit dem Fernziel, Hinweise auf die primären molekularen Angriffspunkte und die an der antiproliferativen Wirkung beteiligten Mechanismen zu erhalten. Gleichzeitig sollte die Frage nach der Spezifität des Carnosins gestellt werden.

Ausgehend von der Beobachtung, dass Carnosin einen Einfluss auf die glykolytische ATP-Produktion hat, sollte zunächst geklärt werden, ob es unter dem Einfluss von Carnosin zu einer veränderten Expression glykolytisch relevanter Gene kommt. Zu diesem Zweck sollten drei Zelllinien, die aus humanen Glioblastomen gewonnen wurden, mittels qRT-PCR untersucht werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob die beobachteten Expressionsänderungen sowie antineoplastische Wirkungen auch unter dem Einfluss von L-Histidin und β -Alanin, den zwei Komponenten des Carnosins, oder Carnosin-ähnlicher Moleküle zu beobachten sind. In Zusammenhang mit dieser Fragestellung sollte zudem geklärt werden, ob Carnosin-spaltende Enzyme an der Wirkung des Carnosins beteiligt sein könnten.

5 Publikation

Titel: The antineoplastic effect of carnosine is accompanied by induction of PDK4 and can be mimicked by L-histidine

Autoren: Letzien, Ulrike*; Oppermann, Henry*; Meixensberger, Jürgen; Gaunitz, Frank
*Letzien U. und Oppermann H. waren gleichermaßen an der Arbeit beteiligt.

Journal: Amino Acids; Jahrgang 46; Heftnummer 4; Seiten 1009–1019

Impact-Faktor: 3,914 (2014)

Eingegangen: 29. Oktober 2013

Akzeptiert: 1. Januar 2014

Publiziert: 8. Januar 2014

Referenzen: 30

Zitiert: 1

Sprache: Englisch

Verlag : Springer-Verlag GmbH

PubMed ID: 24398899

ISSN: 0939-4451

DOI: 10.1007/s00726-014-1664-8

Ergänzendes Material unter: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00726-014-1664-8>
und 9.1 Ergänzendes Material

The antineoplastic effect of carnosine is accompanied by induction of PDK4 and can be mimicked by L-histidine

Ulrike Letzien · Henry Oppermann ·
Jürgen Meixensberger · Frank Gaunitz

Received: 29 October 2013 / Accepted: 1 January 2014
© Springer-Verlag Wien 2014

Abstract Carnosine (β -alanyl-L-histidine) is a naturally occurring dipeptide that shows antineoplastic effects in cell culture as well as in animal experiments. Since its mode of action and the targets at the molecular level have not yet been elucidated, we performed qRT-PCR experiments with RNA isolated from glioblastoma cell lines treated with carnosine, β -alanine, L-alanine, L-histidine and the dipeptide L-alanine-L-histidine. The experiments identified a strong induction of expression of the gene encoding pyruvate dehydrogenase 4 (PDK4) under the influence of carnosine and L-histidine, but not by the other substances employed. In addition, inhibition of cell viability was only detected in cells treated with carnosine and L-histidine, with the latter showing a significantly stronger effect than carnosine. Since the tumor cells expressed the tissue form of carnosinase (CN2) but almost no serum carnosinase (CN1), we conclude that cleavage by CN2 is a prerequisite for the antineoplastic effect of carnosine. In addition, enhanced expression of PDK4 under the influence of

carnosine/L-histidine opens a new perspective for the interpretation of the ergogenic potential of dietary β -alanine supplementation and adds a new contribution to a growing body of evidence that single amino acids can regulate key metabolic pathways important in health and disease.

Keywords Carnosine · L-Histidine · PDK4 · Glioblastoma · Cancer

Introduction

Carnosine (β -alanyl-L-histidine) was discovered more than a century ago as an abundant dipeptide in meat (Gulewitsch and Amiradzibi 1900). Since its discovery many different physiological functions have been attributed to carnosine, such as pH-buffering, metal-ion chelation and anti-oxidant capacity, and several in vitro and in vivo studies reported its function as an inhibitor of the formation of advanced glycation end-products (AGEs) and advanced lipoxidation end-products (ALEs) [for a recent review on the literature on carnosine's physiological functions see Boldyrev et al. (2013)]. Although, many physiological observations have been made and there is good experimental evidence for carnosine's ability to scavenge reactive oxygen species or its buffering capacities, there are many open questions on how carnosine exhibits its manifold functions at the molecular level. That is especially the case for its anti-neoplastic activity in mice that was already demonstrated in 1986 by Nagai and Suda (1986) and confirmed by Renner et al. (2010b) and Horii et al. (2012). The anti-neoplastic effect which has also been demonstrated in cell culture experiments (Holliday and McFarland 1996; Renner et al. 2008) has mainly been attributed to an influence

U. Letzien and H. Oppermann contributed equally to the work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00726-014-1664-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

U. Letzien · H. Oppermann · J. Meixensberger · F. Gaunitz (✉)
Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum
Leipzig AöR, Liebigstraße 20, 04103 Leipzig, Germany
e-mail: frank.gaunitz@medizin.uni-leipzig.de

U. Letzien
e-mail: Ulrike.Letzien@medizin.uni-leipzig.de

H. Oppermann
e-mail: Henry.Oppermann@medizin.uni-leipzig.de

J. Meixensberger
e-mail: Juergen.Meixensberger@medizin.uni-leipzig.de

on metabolic flux through glycolysis and reduced ATP and ROS concentration (Renner et al. 2010a; Iovine et al. 2011). However, neither the mechanisms responsible for the effect nor the molecular targets have been unequivocally identified. Therefore, we investigated whether carnosine influences the expression of genes involved in the metabolism of glucose with different qRT-PCR approaches using cells from three different cell lines derived from human glioblastoma. In addition, we analyzed whether the observed effects on gene expression and cell viability can be mimicked by the amino acids L-histidine, β -alanine and L-alanine or by the dipeptide L-alanine-L-histidine.

Materials and methods

Reagents

If not stated otherwise all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) or from Merck (Darmstadt, Germany). L-Histidine, β -alanine, L-alanine and carnosine were purchased from Sigma-Aldrich and L-alanine-L-his from Bachem (Bubendorf, Switzerland).

Cell culture

All cells were cultivated in DMEM (4.5 g/l glucose, without pyruvate; Gibco, life technologies, Darmstadt, Germany) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS gold, PAA, Cölbe, Germany), 2 mM glutamax (Gibco), 50 μ g/ml streptomycin and 30 μ g/ml penicillin at 37 °C and 5 % CO₂ in humidified air in an incubator.

The human GBM cell lines T98G and U87 were originally obtained from the ATCC (Manassas, USA) and the line LN405 from the German collection of microorganisms and cell cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). All cells were genotyped (Genolytic GmbH, Leipzig, Germany) and their identity during the experiments confirmed.

qRT-PCR

For the isolation of RNA, 10⁶ cells were seeded in 10-mm cell culture dishes (TPP, Trasadingen, Switzerland) with 10 ml of medium. Cells received fresh medium containing the individual supplements after 24 h and were cultivated for an additional period of time (for concentrations and incubation times see individual experiments). Then, total RNA was extracted using the RNeasy plus mini kit (Qiagen, Hilden; Germany) according to the manufacturer's recommendations and the RNA was stored at -80 °C until reverse transcription (RT), which was performed with 500 ng RNA and random primers, using the

ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's recommendations. qRT-PCR was performed on a Rotor-Gene 3000 system (Qiagen) employing SYBR Green (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Thermo Scientific, Germany). Data analysis was performed using the rotor-gene 6 software (Version 6.1/Build 93; Corbett Research). Sequences of forward and reverse primers used for expression analysis were analyzed using the NCBI/Primer-BLAST algorithms for potential mispriming sites, splice variants, melting temperatures and self-complementarity. Primers were finally purchased from Biomers (Ulm, Germany) (cartridge grade and MALDI analyzed). Further information on the primers employed and the amplicons produced is presented as Supplemental Material 1. Copy numbers of individual mRNAs were determined using linearized plasmid DNA containing the appropriate target sequences and normalized to the determined copy number of the reference gene TBP (TATA-box binding protein) which was found to be better suited for the experiments than β -actin (data not shown). All amplification reactions were controlled for the appropriate products by melting curve analysis and by 1.5 % agarose gel electrophoresis. In case of the quantification using the "RT² Profiler PCR Array for human glucose metabolism" (PAHS-006A, SABiosciences, Qiagen) expression data were analyzed by the 2^{- Δ C_t} method. Therefore, relative fold changes were determined by subtracting the C_t of the housekeeping genes (contained within the assay by the manufacturer) from the C_t of the gene of interest, calculating the negative binary logarithm of the resulting Δ C_t followed by the comparison of the final values of treated samples with the untreated control.

Plasmids used as standards for qRT-PCR were either synthesized by Eurofins (Ebersberg, Germany) or cloned from amplification products by standard protocols.

cDNA from normal brain tissue was obtained from BioCat (Heidelberg, Germany).

Cell-based assays

For the determination of viability and toxicity the CellTiterGlo Assay, the CellTiterBlue Assay and the CytoToxONE Assay (all from Promega) were employed as described previously (Gaunitz and Heise 2003). The assays are based on the measurement of ATP (CellTiterGlo Assay), on dehydrogenase activity (CellTiterBlue Assay), and on lactate dehydrogenase activity in the supernatant as a result of necrotic loss of membrane integrity (CytoToxONE Assay). Luminescence and fluorescence were measured using either a Mithras LB 940 Multimode Microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) or a Spectra Max M5 (Molecular Devices, Biberach, Germany).

Cells were initially cultivated in the wells of 96-well plates (μ Clear, Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany) at a density of 2,500 cells/well (LN405) or 5,000 cells/well (T98G and U87) with 200 μ l of medium. After overnight incubation, medium was withdrawn and replaced with 200 μ l of fresh medium with the substances to be tested or vehicle. All assays were generally performed in sextuplicate at the time points indicated in the individual experiments.

Determination of intracellular L-histidine

Intracellular L-histidine was determined according to the method of Teufel et al. (2003). Briefly, 10^6 cells were seeded in 10-mm cell culture dishes (TPP, Trasadingen, Switzerland) with 10 ml of medium. After an overnight incubation, cells received fresh medium with or without carnosine or L-histidine. 72 h later cells were washed three times with ice-cold washing buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) and were finally collected in 1 ml washing buffer. After a short centrifugation (500g, 4 °C, 10 min) cells were resuspended in 300 μ l of ice-cold lysis buffer (125 mM Tris-HCl, pH 9.5, containing 0.1 mM $MnCl_2$) and lysed by sonification using a Bioruptor[®] (Diagenode, Liège, Belgium) for 7.5 min with a 30 s on/30 s off protocol at maximum energy. After centrifugation (5 min at 17,000g at 4 °C) the supernatant was adjusted to a final protein concentration of 4 μ g protein/100 μ l and Tris-HCl to a final concentration of 50 mM (final $MnCl_2$ concentration 0.1 mM). 100 μ l of this adjusted supernatant was dispensed into the wells of a black 96-well plate (Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany). Then, 50 μ l 1 % trichloroacetic acid and 50 μ l *o*-phthalaldehyde solution (5 mg/ml in 2 mM NaOH) were added and after an incubation of 30 min at 30 °C the resulting fluorescence (λ_{ex} 340 nm and λ_{em} 440 nm) was quantified using a SpectraMax M5 Microplate Reader (Molecular Devices, Biberach, Germany).

Statistical analysis

Student's *t* test was performed using the algorithm implemented in Excel (Microsoft, Richmond, USA) (unpaired two-sample test with unequal variances). Calculation of ED50 was performed using Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) using the Boltzmann function to produce a sigmoidal curve from which the ED50 was derived. Relative data resulting from two experiments with a separate mean and standard deviation are presented using Gaussian error propagation according to the formula:

$$\frac{\Delta E}{E} = \sqrt{\left(\frac{\Delta a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\Delta b}{b}\right)^2}$$

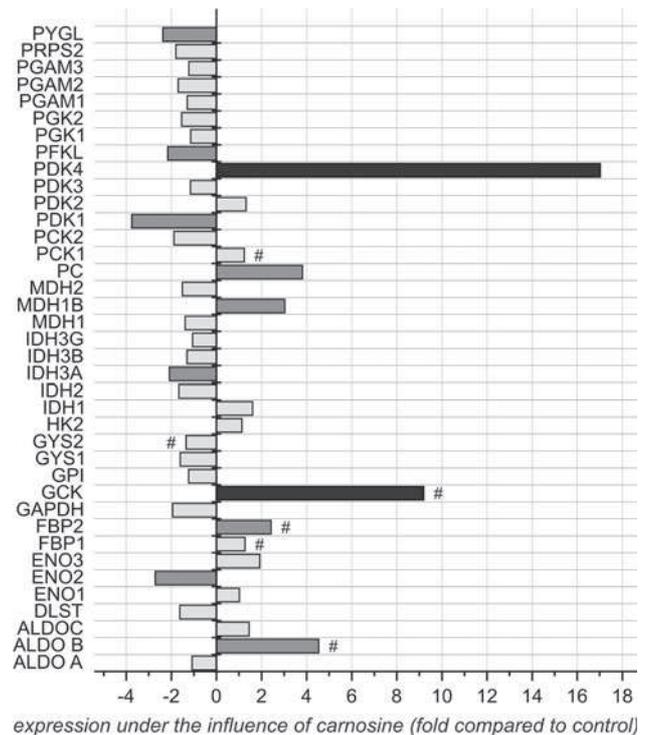


Fig. 1 Changes of mRNA expression in cells from the line U87 under the influence of 50 mM carnosine as revealed by human glucose metabolism "RT² Profiler PCR Array". Enhanced expression is indicated by bars towards right and reduced expression by bars towards left. Black bars indicate a more than sixfold change and dark grey bars a change >twofold. ALDO A/B/C aldolase A, B and C, DLST dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex), ENO1 enolase 1, (alpha), ENO2 enolase 2 (gamma, neuronal), ENO3 enolase 3 (beta, muscle), FBP1/2 fructose-1,6-bisphosphatase 1 and 2, GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GCK glucokinase (hexokinase 4), GPI glucose-6-phosphate isomerase, GYS1/2 glycogen synthase 1 (muscle) and 2 (liver), HK2 hexokinase 2, IDH1 isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble, IDH2 isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial, IDH3A/B/G isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha, beta and gamma; MDH1/1B malate dehydrogenase 1 and 1B, NAD (soluble), MDH2 malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial), PC pyruvate carboxylase, PCK1/2 phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) and 2 (mitochondrial), PDK1/2/3/4 pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1, 2, 3 and 4, PFKL phosphofructokinase, liver; PGK1,2 phosphoglycerate kinase 1 and 2, PGAM1/2/3 phosphoglu mutase 1, 2 and 3, PRPS2 phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2, PYGL phosphorylase, glycogen, liver. Other genes from the array that were significantly expressed but unchanged under the influence of carnosine and that are not included in the figure: TPI triosephosphate isomerase, TKT transketolase, TALDO1 transaldolase 1, SUCLG1 succinate-CoA ligase, alpha subunit, SDH A/B succinate dehydrogenase complex, subunit A and B, PGLS 6-phosphogluconolactonase, PDHA1/B pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1 and beta, GSK3B glycogen synthase kinase 3 beta, GBE1 glucan (1,4- β -), branching enzyme 1, FH fumarate hydratase, DLD dihydrolipoamide dehydrogenase, CS citrate synthase, ACO2 aconitase 2, mitochondrial, ACLY ATP citrate lyase. #: low expressed gene with $C_t \geq 30$

with ΔE is the propagated error; $E = a/b$; a , mean of data set 1; b , mean of data set 2; Δa , standard deviation of data set 1; Δb , standard deviation of data set 2.

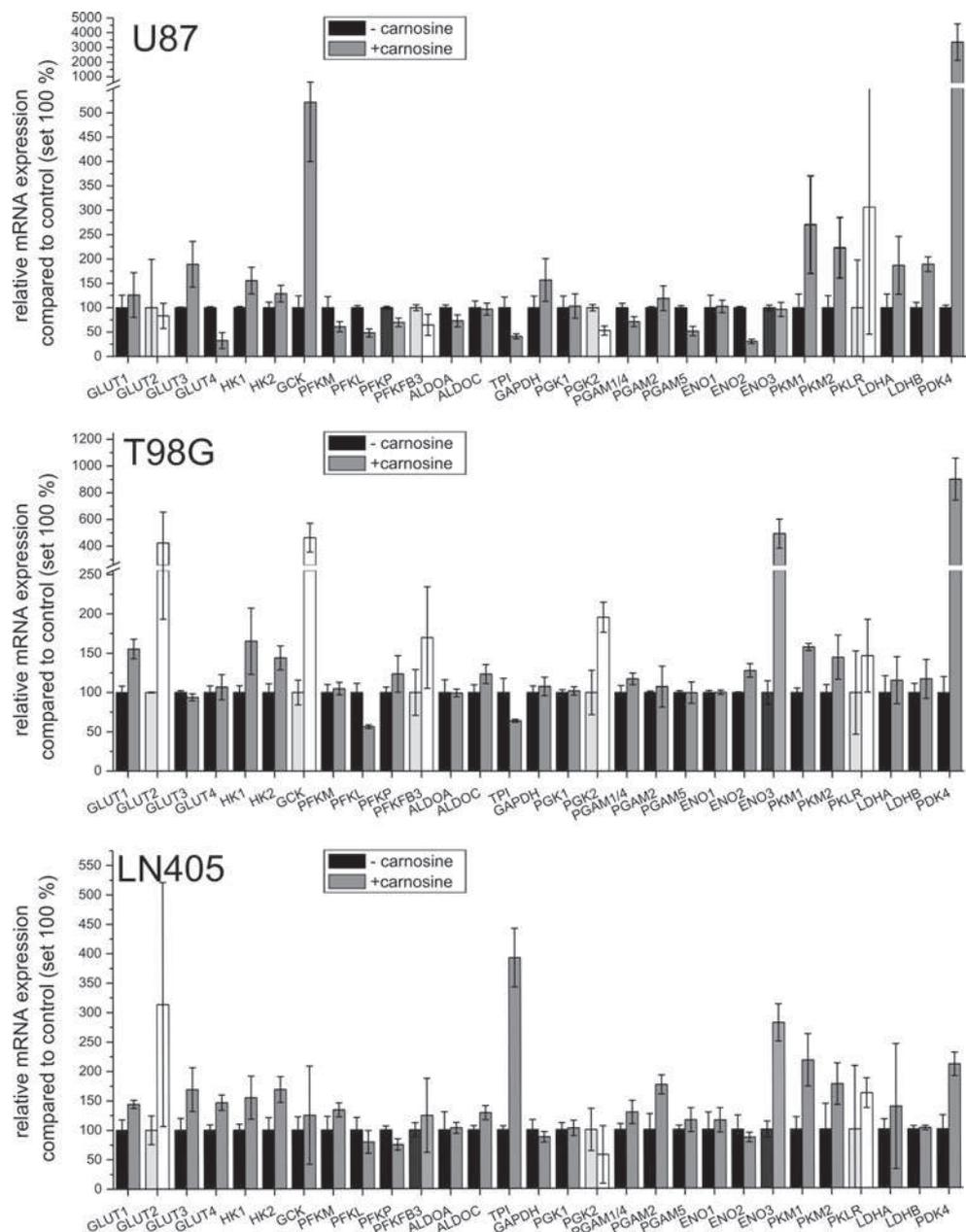
Results

qRT-PCR analysis of genes influenced by carnosine

In order to analyze a possible influence of carnosine on enzymes involved in glucose metabolism, cells from the glioblastoma cell line U87 were incubated for 24 h in the absence and presence of 50 mM carnosine and analyzed by a “RT² Profiler PCR Array”. The result of the experiment is presented in Fig. 1. The array identified two genes with a strongly enhanced expression under the influence of carnosine: glucokinase (GCK) was enhanced ninefold and pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) 17-fold. In order

to confirm this result and to identify whether the same effect can be observed in other cells of glioblastoma origin, we performed qRT-PCR analysis with the cell lines T98G and LN405 in addition to U87. We also included some targets that were not present on the “RT² Profiler PCR Array”. A compilation of all data from all cell lines is presented in Fig. 2. As can be seen, the experiment confirmed a strong induction of PDK4 in U87 and T98G and a small induction in LN405. Although we also found the induction of GCK confirmed at least in U87 and T98G along with some other genes, we considered focussing on PDK4 because of its high induction and the reliable amount of mRNA found in non-stimulated U87 cells.

Fig. 2 Changes of mRNA expression in cells from the lines U87, T98G and LN405 under the influence of 50 mM carnosine as revealed by qRT-PCR. Total amount of mRNA of each gene tested was determined using standard curves and normalized to the expression of TBP. Abbreviations used are the same as in Fig. 1. Additional genes: *GLUT1/2/3/4* glucose transporter 1/2/3/4, *HK1* hexokinase 1, *PFKM* phosphofructokinase, muscle; *PFKP* phosphofructokinase, platelet; *PFKFB3* 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase isoenzyme 3—splice variant UBI2K4, *PKM1/2* pyruvate kinase, muscle type 1/2, *PKLR* pyruvate kinase, liver and red blood cells, *LDH A/B* lactate dehydrogenase A/B. Genes with expression levels below the standard curve (<100 copies) are painted in *white or light gray*



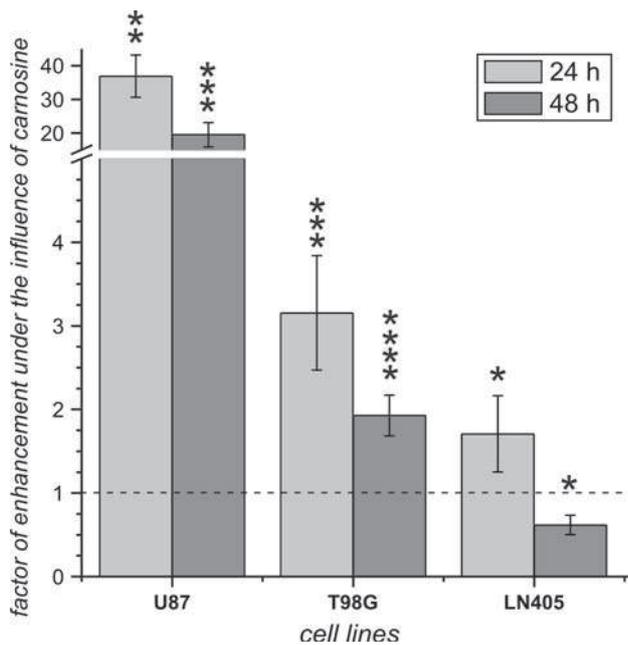


Fig. 3 Expression of PDK4 mRNA under the influence of carnosine after 24 and 48 h incubation. Cells from the cell lines LN405, U87 and T98G were incubated in the absence and presence of 50 mM carnosine. After 24 and 48 h cells were harvested, the mRNA isolated, reverse transcribed and subjected to qRT-PCR. The copy number of transcripts encoding PDK4 was normalized to the copy number of transcripts encoding TBP and finally the normalized relative copy numbers were compared between treated and untreated cells to determine the factor of enhancement under the influence of carnosine. The *dashed line* indicates the base line that would result without any effect of carnosine on the relative expression. Student's *t* test was performed using the results from determinations performed in quadruplicate to sextuplicate. **** $p < 5 \times 10^{-6}$; *** $p < 5 \times 10^{-5}$; ** $p < 5 \times 10^{-4}$; * $p < 5 \times 10^{-3}$

Since only a small induction was detected in cells from the line LN405, we addressed the question whether an effect can be observed after 48 h of incubation. Therefore, cells from the different lines were treated with 50 mM carnosine for 24 and 48 h. Relative levels of expression were compared between cells treated with carnosine and untreated cells and the corresponding factor of enhancement under the influence of carnosine is presented in Fig. 3. As can be seen, the enhancement is significant at 24 and 48 h in cells from the line U87 and T98G and significant in cells from the line LN405 at 24 h. Surprisingly, there is a small but significant drop in expression in the line LN405 at 48 h. At this point it should also be noted that the total effect observed differed quantitatively among independent experiments. This may be attributed to different influences from different charges of FCS (data not shown). However, the qualitative effect was confirmed in all experiments (24 h: U87—14 independent experiments; fold enhancement, 17.4 ± 10.6 ; range 7.1–36.9; T98G—3 independent experiments; fold enhancement 4.6 ± 3.5 ; range 2.1–8.6; LN405: 3 independent experiments; fold enhancement, 1.7 ± 0.5 ; range

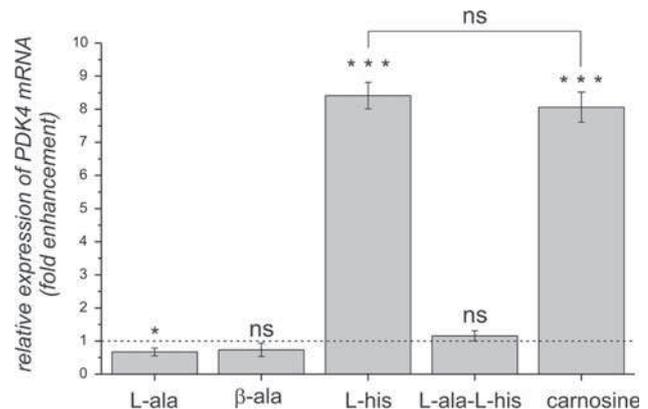


Fig. 4 PDK4 mRNA expression under the influence of different amino acids and dipeptides. Cells from the line U87 were incubated in the absence and presence of the test compounds indicated (each at 50 mM). After 24 h cells were harvested, mRNA isolated, reverse transcribed and subjected to qRT-PCR. The copy number of transcripts encoding PDK4 was normalized to the copy number of transcripts encoding TBP and finally the normalized relative copy numbers were compared between treated and untreated cells to determine the factor of enhancement under the influence of the test compounds. The *dashed line* indicates the base line that would result without any effect of carnosine on the relative expression. Student's *t* test was performed using the results from determinations performed in quadruplicate. * $p < 5 \times 10^{-2}$ and *** $p < 5 \times 10^{-4}$; *ns* not significant

1.3–2.2). Because of these differences all experiments presented in a single figure have been performed under the same conditions for all cells.

Effect of L-alanine, β -alanine, L-histidine and L-alanine-L-histidine on the expression of PDK4

In order to analyze the specificity of carnosine's effect on PDK4 expression, we asked whether one of its amino acid components, β -alanine or L-histidine, the isomer L-alanine or the dipeptide L-ala-L-his may exhibit the same effect. Therefore, cells from the line U87 were treated with the compounds for 24 h and subjected to qRT-PCR. The result of the experiment is presented in Fig. 4. All compounds were tested at a concentration of 50 mM. As can be seen in Fig. 4, L-histidine exhibits a strong effect on PDK4 expression that is not significantly different from that of carnosine. No significant effect was seen with β -alanine and L-ala-L-his, and a slight but significant reduction ($p < 0.05$) was determined with L-alanine.

Comparison of PDK4 expression under the influence of L-histidine and carnosine in U87, T98G and LN405 cells

Next, we compared the effect of L-histidine and carnosine on the expression of PDK4 in different cell lines. In order to do this, cells from the lines U87, T98G and LN405 were

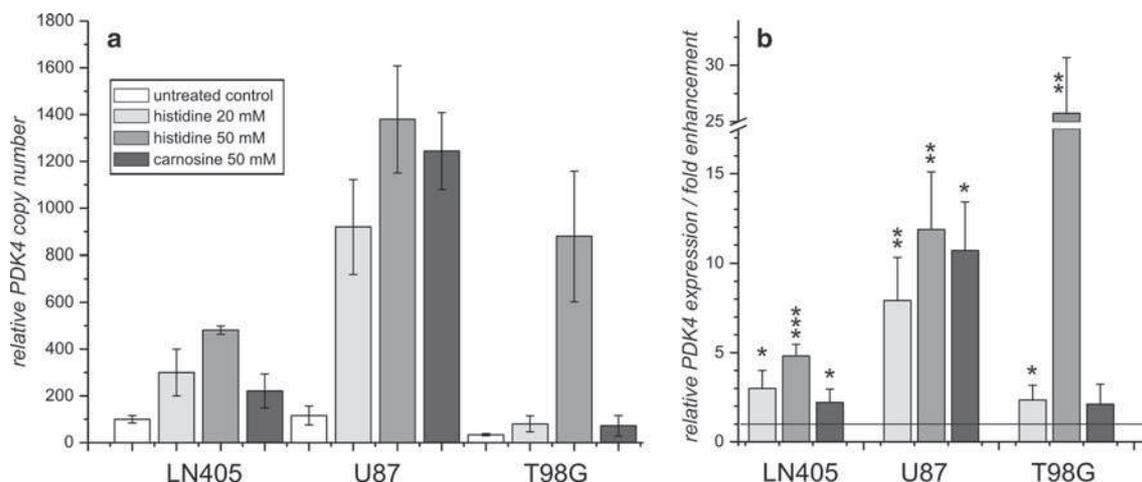


Fig. 5 Relative copy number of mRNA encoding PDK4 and expression under the influence of L-histidine and carnosine. **a** Cells from the cell lines LN405, U87 and T98G were incubated in the absence and presence of 20 and 50 mM L-histidine and in the presence of 50 mM carnosine. After 24 h cells were harvested, the mRNA isolated, reverse transcribed and subjected to qRT-PCR. The copy number of transcripts encoding PDK4 was normalized to the copy number of transcripts encoding TBP and is depicted as the relative copy number. In order to compare the relative copy number

between the lines, the relative copy number in untreated cells from the line LN405 was set as 100 %. **b** The normalized relative copy numbers (panel **a**) were compared between treated and untreated cells for each cell line to determine the factor of enhancement under the influence of carnosine. The dashed line indicates the base line that would result without any effect of histidine or carnosine on the relative expression. Student's *t* test was performed using the results from determinations performed in quadruplicate. *** $p < 5 \times 10^{-4}$; ** $p < 5 \times 10^{-3}$; * $p < 5 \times 10^{-2}$

incubated in the absence and presence of 20 mM and 50 mM L-histidine and 50 mM carnosine. 24 h later a qRT-PCR experiment was performed. The result of the experiment is presented in Fig. 5. In the left panel (a) the relative copy number is shown. In order to compare differences between the lines the relative copy number of untreated cells from the line LN405 was set as 100 %. In the right panel (b) the enhancement of PDK4 expression under the influence of the substances is shown. As can be seen, the influence of L-histidine at a concentration of 20 mM is in all lines comparable to the enhancement obtained with 50 mM carnosine. At a concentration of 50 mM L-histidine, expression appears to be more strongly enhanced with an apparent very high effect in cells from the line T98G. Although the height of the enhancement has to be interpreted with care since the basal expression of PDK4 is low in this line (below the standards ≤ 100 copies), the effect of 50 mM L-histidine is significantly more pronounced than that of 50 mM carnosine ($p < 0.005$). With regard to LN405 the enhancement with 50 mM L-His compared to 50 mM carnosine is significantly higher ($p < 0.05$), whereas there is no significant difference in the line U87.

Cell viability under the influence of carnosine and L-histidine

The observation of a comparable induction of PDK4 expression under the influence of L-histidine and carnosine raised the question whether there is also an influence of L-

histidine on cell viability in the tumor cell lines. To assess this, cells were incubated with different concentrations of carnosine and L-histidine for 24, 48 and 72 h and cell viability was determined by CellTiterGlo (Fig. 6a, b) and CellTiterBlue (Fig. 6c, d) assays. The result of the experiments is presented in Fig. 6. As expected, carnosine was clearly able to inhibit cell viability in all three lines (Fig. 6a, c). The same effect was observed with L-histidine (Fig. 6b, d), but at comparable concentrations the inhibitory effect of L-histidine was stronger than that of carnosine, for example, at 48 h with the CTB assay: 63.0 ± 16.9 % viability in 50 mM carnosine vs. 28.9 ± 5.1 % viability in 50 mM L-histidine (LN405); 58.0 ± 9.8 % viability in 50 mM carnosine vs. 43.9 ± 2.6 % viability in 50 mM L-histidine (U87); 64.1 ± 4.1 % viability in 50 mM carnosine vs. 3.5 ± 5.1 % viability in 50 mM L-histidine (T98G). Although it was difficult to calculate a reliable ED50 from different experiments, the general tendency was a strong response to L-histidine of T98G (ED50 7.7 mM; CTB at 48 h; sigmoidal fit with $R^2 = 0.997$) followed by LN405 (ED50 9.4 mM; CTB at 48 h; sigmoidal fit with $R^2 = 0.981$) and U87 (ED50 15.8 mM; CTB at 48 h; sigmoidal fit with $R^2 = 0.968$). A mathematically trustable calculation of the ED50 for carnosine was not possible, but it is obvious from Fig. 6 that all lines responded almost equally to the different concentrations of carnosine. A second observation was a microscopically evident cell death under the influence of L-histidine that was not

detected under the influence of carnosine (data not shown). In fact, we never detected any necrosis in cells treated with carnosine (≤ 50 mM). Therefore, we also employed the CytoToxONE assay to determine whether necrotic cell death occurs under the influence of L-histidine. A corresponding experiment is presented in Fig. 6e that demonstrates necrosis in cells from the line T98G after 48 h (starting at a concentration of 10 mM L-histidine) that was also significant at 72 h in the two other lines, but was less pronounced than in T98G. No cell death was detected under the influence of carnosine at concentrations ≤ 50 mM (data not shown).

Expression of carnosinase

Because of the strong effect of L-histidine on cell viability and PDK4 expression, we wondered whether the cleavage of carnosine is a prerequisite for the observed effects under the influence of carnosine. Therefore, we analyzed whether the two described carnosinase genes (CNDP1 and CNDP2) are transcribed in the cells from the three lines and compared the level of expression to the expression of carnosinases in normal brain tissue by qRT-PCR. In these experiments, mRNA encoding serum carnosinase (CN1) was almost not present in cells from the lines LN405 and T98G and its expression in U87 cells was detectable but still $\sim 2,000$ to $3,000$ times less than in the four normal brain tissue mRNAs employed (Fig. 7). The expression of CNDP2 was comparably high in the three lines with an increase in the level of mRNA encoding tissue carnosinase (CN2, also designated cytosolic nonspecific dipeptidase) from LN405 to U87 (two times more than LN405) and to T98G (three times higher expression than in LN405). A comparison with normal brain tissue revealed an equal expression in T98G cells as compared to the temporal lobe and a ~ 3 times higher expression in tissue from the occipital lobe, the parietal lobe and the frontal lobe.

Intracellular L-histidine in cells cultivated in the absence and presence of carnosine and L-histidine

In order to determine whether the exposure of cells to medium containing carnosine or L-histidine does result in an increased intracellular concentration of L-histidine, cells from the three different lines were incubated for 72 h in medium containing 50 mM carnosine or 20 mM L-histidine, and the relative intracellular concentration of L-histidine was compared to cells cultivated in standard medium (containing 0.2 mM L-histidine). The result of the experiment is presented in Fig. 8. As can be seen, intracellular L-histidine concentrations are significantly elevated in cells from the lines U87 and T98G but not in cells from the line LN405 which has the lowest CN2 expression (Fig. 7). The

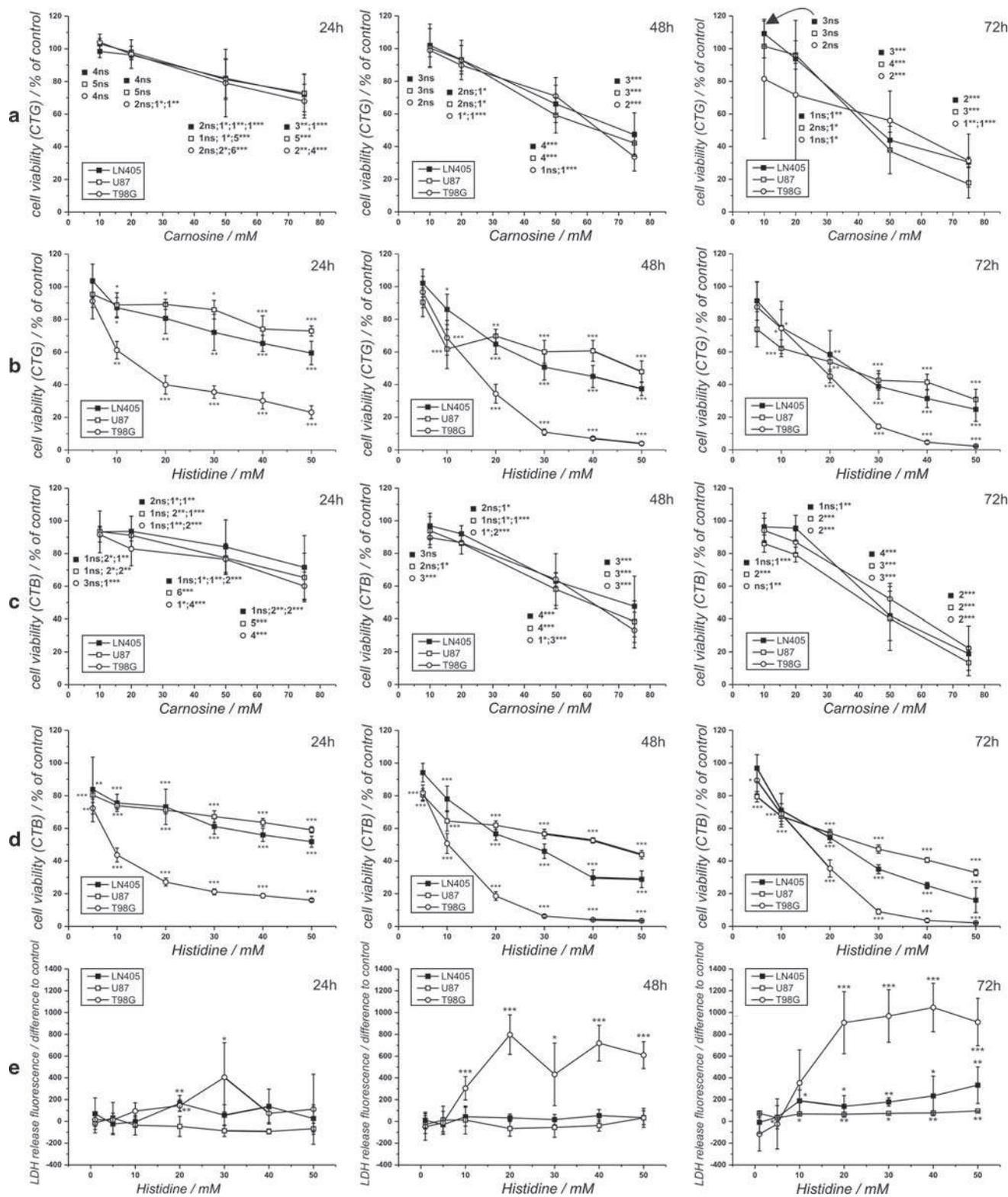
presence of L-histidine in the medium resulted in a significantly increased concentration of L-histidine in all lines.

Discussion

In recent years, the antineoplastic effect of carnosine that was first described by Nagai and Suda (1986) has been confirmed by different groups in cell culture (Holliday and McFarland 1996; Renner et al. 2008; Iovine et al. 2011) and in vivo (Renner et al. 2010b; Horii et al. 2012). Therefore, a potential use of carnosine as a therapeutic drug for the treatment of cancer patients has already been discussed (Gaunitz and Hipkiss 2012; Hipkiss and Gaunitz 2013). Unfortunately, the molecular targets and the mode of action responsible for the observed effects have not been elucidated, although there have been indications that glycolytic flux and ATP production may be cellular targets (Renner et al. 2010a; Iovine et al. 2011). This hypothesis was also supported by experiments with yeast that demonstrated that carnosine slows growth rate and increases cell death only in cells that depend on glycolysis for ATP production and not in cells that can produce their ATP by oxidative phosphorylation (Cartwright et al. 2012).

In the present work, we demonstrate that carnosine induces expression of PDK4 in glioblastoma cells. To our knowledge, this is the first clear evidence that the dipeptide is able to influence gene expression. We could also demonstrate that the same effect on PDK4 expression is observed under the influence of L-histidine but not in the presence of β -alanine, L-alanine or L-alanine-L-histidine. In addition, the inhibitory effect of carnosine on tumor cell viability was also visible in the presence of L-histidine, strongly pointing towards the interpretation that cleavage of carnosine by the presence of cytosolic carnosinase 2 leads to the formation of L-histidine that is in turn responsible for enhanced expression of PDK4 and loss of cell viability. Transcriptional effects of L-histidine have also been shown by Son et al. (2005) who demonstrated an inhibition of TNF- α -induced IL-8 expression in Caco-2 and HT-29 cells which is not the case in cells treated with carnosine (Son et al. 2008). Interestingly, the same authors also confirmed that carnosine is not cleaved in Caco-2 cells (Son et al. 2008).

One question that needs to be answered is the missing effect of L-alanine-L-histidine on the expression of PDK4 and its only weak but significant effect on cell viability (CTG assay) after 72 h in U87 cells incubating them in 75 mM L-alanine-L-histidine (79.5 ± 5.2 % viability compared to 17.8 ± 9.3 % in 75 mM carnosine; $p < 0.005$; data not shown). At this point, it should also be noted that this observation also excludes any unspecific effect of carnosine, e.g., by changing osmotic pressure or pH. One possibility is that L-alanine-L-histidine may not



enter the cells as good as carnosine. Carnosine can be taken up at least by one of four transporters. These are PEPT1, PEPT2 (oligopeptide transporter 1 and 2; also designated

SLC15A1 and 15A2) and PHT1 and PHT2 (peptide/histidine transporter 1 and 2; also designated SLC15A4; SLC15A3) (see Smith et al. 2013; Daniel and Kottra 2004

Fig. 6 Viability of cells at different concentrations of carnosine and L-histidine after 24, 48 and 72 h of incubation. Cells from the lines T98G, LN405 and U87 were cultivated at an initial culture density of 2,500 cells/well (LN405) or 5,000 cells/well (T98G and U87) in 96 well plates. 24 h later they received fresh medium with different concentrations of carnosine and L-histidine and cell-based assays were performed 24, 48 and 72 h after addition of the compounds. CellTiterGlo Assay (a) and CellTiterBlue assay (c) from cells incubated with carnosine. Mean and standard deviations were calculated from data of different independent experiments each performed in sextuplicate. *Numbers* indicate in how many experiments the reduction of viability was significant and *asterisks* indicate the level of significance: *ns* not significant, $***p < 5 \times 10^{-4}$; $**p < 5 \times 10^{-3}$; $*p < 5 \times 10^{-2}$. CellTiterGlo Assay (b) and CellTiterBlue Assay (d) from cells incubated with L-histidine. Experiments were performed in sextuplicate. *Asterisks* indicate level of significance (see legend to a). e CytoToxONE Assay with cells cultivated in L-histidine. Experiments were performed in sextuplicate. *Asterisks* indicate level of significance (see legend to a)

for review). PEPT1 and 2 possess the capability to transport all 400 different dipeptides (Daniel and Kottra 2004) and should therefore also transport L-alanine-L-histidine. With regard to the PHTs we did not find experimental evidence in the literature whether they are able to transport L-alanine-L-histidine as it has been described for the transport of carnosine by PHT1 (Yamashita et al. 1997) and PHT2 (Sakata et al. 2001). At this point it should be noted that the PHTs in comparison to the PEPTs also transport L-histidine. The most likely interpretation of the missing effect of L-alanine-L-histidine may simply be that the effects observed are in fact induced by L-histidine which is released from carnosine, but cannot be cleaved from L-alanine-L-histidine under the influence of CN2. As Lenney et al. (1985) have demonstrated, L-alanine-L-histidine is not just a substrate of CN2 but instead inhibits the enzyme already at a concentration of 0.1 mM by 84 %. We are also aware that Teufel et al. (2003) pointed out that the optimal pH for degradation of carnosine by carnosinase 2 is around

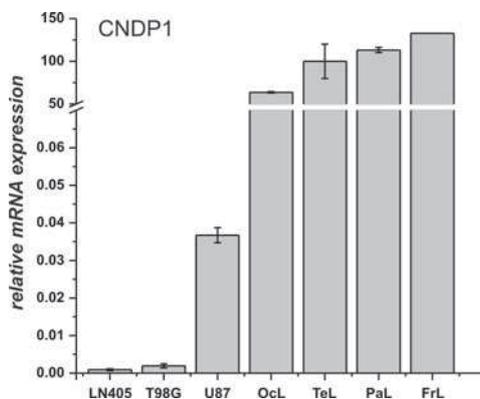


Fig. 7 Expression of CNDP1 and CNDP2 in glioblastoma cells and normal brain tissue. For the experiment RNA from the lines T98G, LN405 and U87 was reverse transcribed and the expression of CNDP1 and CNDP2 was analyzed by qRT-PCR and compared to the

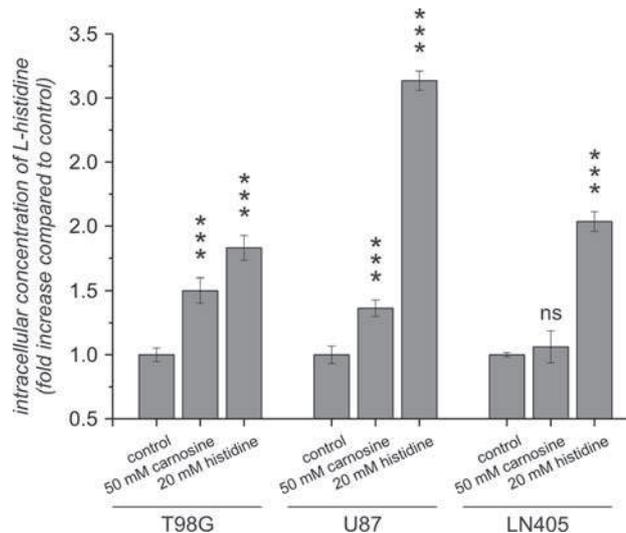
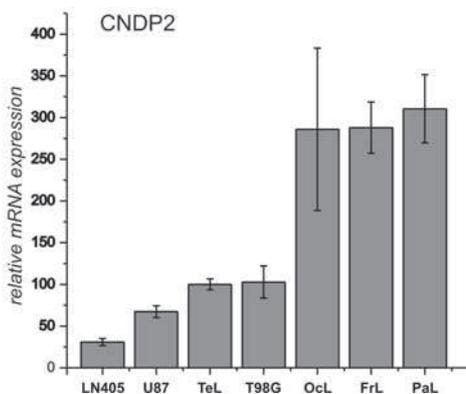


Fig. 8 Increase of intracellular L-histidine in the absence and presence of L-histidine and carnosine in the culture medium. Cells from three different lines were incubated for 72 h in the presence of 50 mM carnosine and 20 mM L-histidine and the relative intracellular concentration of L-histidine was determined and compared to cells cultivated in standard cultivation medium (0.2 mM L-histidine). All experiments have been performed in sextuplicate. $***p < 5 \times 10^{-4}$; *ns* not significant

9.5 which is well above the physiological pH. However, one may consider that the physiological conditions may be different from the experimental ones, and it also has to be considered that given the high effect of L-histidine even a small continuous release of L-histidine from carnosine may be enough to result in the observed physiological effects. Moreover, the results presented in Fig. 8 clearly demonstrate that the intracellular concentration of L-histidine is elevated at least in cells from the lines T98G and U87 when carnosine is present in the medium. One spillover that is also interesting to note is the absence of CN1 expression in



expression in normal brain tissue. *OcL* occipital lobe, *TeL* temporal lobe, *PaL* parietal lobe, *FrL* frontal lobe. Relative mRNA expression was calculated by normalization to expression of TBP

the glioma cells since Gautam et al. (2012) just recently demonstrated that CN1 protein levels are lowered in patients with glioblastoma.

Another question that needs to be addressed by further experiments is the connection between the antineoplastic effect of L-histidine and carnosine and the enhanced expression of PDK4. PDK4 is one of four human kinases that inhibit the pyruvate dehydrogenase complex via phosphorylation of its E1 component. Therefore, its over-expression will result in a reduced conversion of pyruvate to acetyl-CoA which is the only entry point for carbohydrates derived from circulating glucose (or intramuscular glycogen) into the mitochondria for complete oxidation (Pilegaard and Neuffer 2004). Although our experiments do not reveal whether the enhanced expression of PDK4-mRNA is accompanied by enhanced enzymatic activity of PDK4, the observation that pyruvate can prevent the growth inhibition induced by carnosine (Holliday and McFarland 1996) is a strong hint pointing towards a direct influence of pyruvate dehydrogenase kinases on tumor cell growth since PDK4 (and also PDK1 and PDK2) are allosterically inhibited by pyruvate (Roche and Hiromasa 2007). Since the glioblastoma cells do not produce ATP by oxidative phosphorylation (Renner et al. 2010a) one may speculate that production of acetyl-CoA or its entry into the citric acid cycle may play a distinct role in tumor cells aside from the production of ATP. In fact, although inhibitors of pyruvate dehydrogenase kinases are discussed as therapeutic tools for the treatment of tumors (Sutendra and Michelakis 2013), it was demonstrated that PDK4 mRNA is commonly downregulated in tumors compared to their tissues of origin and that over-expression decreases cell proliferation (Grassian et al. 2011). Since a detailed discussion on the role of the citric acid cycle and acetyl-CoA as well as on thiamin diphosphate-dependent enzymes in tumor metabolism is beyond the scope of this manuscript, readers should refer to recent publications by Bunik et al. (2013) and Icard et al. (2012).

Aside from regulation of PDK4 expression, we cannot rule out the possibility that carnosine also has other influences on (glycolytic) ATP production that contribute to its antineoplastic effect and may not be related to free L-histidine. This consideration comes from experiments with yeast. As Cartwright et al. (2012) have demonstrated, no loss of viability was observed when yeast cells were grown with 2 % glucose in the presence of 10 mM L-histidine but exhibited only 90 % viability when cultivated under the same conditions in the presence of 10 mM carnosine. At this point it should also be noted that carnosine exhibited a strong effect on cell viability in cells from the line LN405, although expression of CN2 is low in this line and only a small activation of PDK4 expression was observed. Whether the decrease in overall ATP production determined by the CellTiterGlo viability assay in the cultures of our experiments results from a reduced number

of cells or may also reflect an inhibition of glycolytic ATP production remains speculative but cannot be ruled out. In conclusion, for the first time it is demonstrated that in the presence of carnosine, transcriptional regulation can be altered and that the effect is mimicked by L-histidine. Aside from many other functions attributed to carnosine it can therefore also be considered as a vehicle for L-histidine that protects this amino acid from becoming part of the pool of amino acids entering protein biosynthesis and which releases it in cells with cytosolic carnosinase 2. In addition, a strong influence of a proteinogenic amino acid on tumor growth is demonstrated that adds to the growing body of evidence that amino acids participate in and regulate key metabolic pathways (Wu 2013).

In view of a potential use of carnosine as a cancer therapeutic, it would be highly interesting whether there are L-histidine containing peptides or derivatives that under physiological conditions in humans are a substrate for carnosinase 2 but not for carnosinase 1 to be used to target glioma cells without being degraded by serum carnosinase. As already demonstrated at least purified recombinant CN1 and CN2 exhibit different substrate specificities under experimental conditions (Teufel et al. 2003). A different approach would be to inhibit CN1 which might be possible as suggested by Vistoli et al. (2006).

We hope that our work will encourage further investigation of carnosine's effects in cells derived from other tumors and normal tissue. At least non-tumorous human embryonic kidney 293 (HEK293) cells respond to the presence of carnosine with reduced growth and a small but significant enhancement of PDK4 expression (Supplemental Material 2). Although HEK293 cells are immortalized and are therefore not really normal parenchymal cells, it will be necessary to analyze carnosine's effects also in normal tissue in more detail when considering a possible application as an anti-cancer drug.

Acknowledgments We like to thank Dr. Hans-Heinrich Foerster from the Genolytic GmbH (Leipzig, Germany) for genotyping and confirmation of cell identity. We also thank Berthold Technologies (Bad Wildbad, Germany) for the kind disposal of a Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader and last not least Mr. Rainer Baran-Schmidt for technical assistance.

Conflict of interest The authors declare no competing financial interests.

References

- Boldyrev AA, Aldini G, Derave W (2013) Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev* 93:1803–1845
- Bunik VI, Tylicki A, Lukashev NV (2013) Thiamin diphosphate-dependent enzymes: from enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models. *FEBS J.* doi:10.1111/febs.12512

- Cartwright SP, Bill RM, Hipkiss AR (2012) L-carnosine affects the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a metabolism-dependent manner. *PLoS ONE* 7:e45006
- Daniel H, Kottra G (2004) The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflug Arch Eur J Phys* 447:610–618
- Gaunitz F, Heise K (2003) HTS compatible assay for antioxidative agents using primary cultured hepatocytes. *Assay Drug Dev Technol* 1:469–477
- Gaunitz F, Hipkiss AR (2012) Carnosine and cancer: a perspective. *Amino Acids* 43:135–142
- Gautam P, Nair SC, Gupta MK, Sharma R, Polisetty RV, Uppin MS, Sundaram C, Puligopu AK, Ankathi P, Purohit AK, Chandak GR, Harsha HC, Sirdeshmukh R (2012) Proteins with altered levels in plasma from glioblastoma patients as revealed by iTRAQ-based quantitative proteomic analysis. *PLoS ONE* 7:e46153
- Grassian AR, Metallo CM, Coloff JL, Stephanopoulos G, Brugge JS (2011) Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation. *Genes Dev* 25:1716–1733
- Gulewitsch W, Amiradzibi S (1900) Ueber das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextraktes. *Ber Deut Chem Ges* 33:1902–1903
- Hipkiss AR, Gaunitz F (2013) Inhibition of tumour cell growth by carnosine: some possible mechanisms. *Amino Acids*. doi:10.1007/s00726-013-1627-5
- Holliday R, McFarland GA (1996) Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. *Br J Cancer* 73:966–971
- Horii Y, Shen J, Fujisaki Y, Yoshida K, Nagai K (2012) Effects of l-carnosine on splenic sympathetic nerve activity and tumor proliferation. *Neurosci Lett* 510:1–5
- Icard P, Poulain L, Lincet H (2012) Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1825:111–116
- Iovine B, Iannella ML, Nocella F, Pricolo MR, Baldi MR, Bevilacqua MA (2011) Carnosine inhibits KRas-mediated HCT-116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Lett* 315:122–128
- Lenney JF, Peppers SC, Kucera-Orallo CM, George RP (1985) Characterization of human tissue carnosinase. *Biochem J* 228:653–660
- Nagai K, Suda T (1986) Antineoplastic effects of carnosine and beta-alanine—physiological considerations of its antineoplastic effects. *J Phys Soc Jpn* 48:741–747
- Pilegaard H, Neuffer PD (2004) Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise. *Proc Nutr Soc* 63:221–226
- Renner C, Seyffarth A, de Arriba S, Meixensberger J, Gebhardt R, Gaunitz F (2008) Carnosine inhibits growth of cells isolated from human glioblastoma multiforme. *Int J Pept Protein Res* 14:127–135
- Renner C, Asperger A, Seyffarth A, Meixensberger J, Gebhardt R, Gaunitz F (2010a) Carnosine inhibits ATP production in cells from malignant glioma. *Neurol Res* 32:101–105
- Renner C, Zemitzsch N, Fuchs B, Geiger KD, Hermes M, Hengstler J, Gebhardt R, Meixensberger J, Gaunitz F (2010b) Carnosine retards tumor growth in vivo in an NIH3T3-HER2/neu mouse model. *Mol Cancer* 9:2
- Roche TE, Hiromasa Y (2007) Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cell Mol Life Sci* 64:830–849
- Sakata K, Yamashita T, Maeda M, Moriyama Y, Shimada S, Tohyama M (2001) Cloning of a lymphatic peptide/histidine transporter. *Biochem J* 356:53–60
- Smith DE, Cléménçon B, Hediger MA (2013) Proton-coupled oligopeptide transporter family SLC15: physiological, pharmacological and pathological implications. *Mol Aspects Med* 34:323–336
- Son DO, Satsu H, Shimizu M (2005) Histidine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett* 579:4671–4677
- Son DO, Satsu H, Kiso Y, Totsuka M, Shimizu M (2008) Inhibitory effect of carnosine on interleukin-8 production in intestinal epithelial cells through translational regulation. *Cytokine* 42:265–276
- Sutendra G, Michelakis ED (2013) Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front Oncol* 3:38
- Teufel M, Saudek V, Ledig JP, Bernhardt A, Boularand S, Carreau A, Cairns NJ, Carter C, Cowley DJ, Duverger D, Ganzhorn AJ, Guenet C, Heintzelmann B, Laucher V, Sauvage C, Smirnova T (2003) Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J Biol Chem* 278:6521–6531
- Vistoli G, Pedretti A, Cattaneo M, Aldini G, Testa B (2006) Homology modeling of human serum carnosinase, a potential medicinal target, and MD simulations of its allosteric activation by citrate. *J Med Chem* 49:3269–3277
- Wu G (2013) Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids* 45:407–411
- Yamashita T, Shimada S, Guo W, Sato K, Kohmura E, Hayakawa T, Takagi T, Tohyama M (1997) Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter. *J Biol Chem* 272:10205–10211

6 Weiterführende Arbeiten (noch unveröffentlichte Daten)

Nachdem durch Letzien *et al.* gezeigt wurde [94], dass sowohl Carnosin als auch L-Histidin die mRNA Expression der PDK4 steigern, stellte sich die Frage, auf welche Art und Weise dieser Effekt vermittelt wird. Da die Regulation der PDK4 bereits gut charakterisiert wurde [31], bietet dies eine Grundlage, um Signaltransduktionswege, welche durch das Carnosin beeinflusst werden, zu identifizieren. Im Folgenden sollen kurz einige nach der Publikation entstandene und noch unveröffentlichte Daten vorgestellt werden.

6.1 Mögliche Beeinflussung des FOXO1 / PGC-1 α Signalweges

Um die Anwesenheit der an der PDK4 Expression bekanntermaßen beteiligten Transkriptionsfaktoren und Komponenten von Signaltransduktionswegen sowie deren mögliche Beeinflussung durch Carnosin zu bestimmen, erfolgte die Quantifizierung der mRNA der Gene *retinoid X receptor α* , *retinoid receptor α* , Glucocorticoid Rezeptor, ERR α , FOXO 1 und 3, PPAR α , β und γ und PGC-1 α (eine Übersicht bietet [29]). Dazu wurden U87 Zellen 24h mit oder ohne 50 mM Carnosin kultiviert, die RNA extrahiert, revers transkribiert und mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) untersucht (Methode in [94] beschrieben). Die Anwesenheit der untersuchten Gene konnte bestätigt werden, wobei die Expression von FOXO1 und PGC-1 α unter dem Einfluss von Carnosin erhöht war (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Regulation der PDK4 mRNA durch die untersuchten Faktoren möglich wäre, wobei diese durch FOXO1 und/oder PGC-1 α wahrscheinlich ist. Als nächstes wurde dieser Effekt unter dem Einfluss von β -Alanin und L-Histidin untersucht. Hierzu wurden U87 Zellen 24h mit oder ohne 50 mM β -Alanin, L-Histidin oder Carnosin behandelt und die mRNA Expressionen via qRT-PCR bestimmt. Die Abbildung 4a zeigt eine Steigerung der PDK4, FOXO1 und PGC-1 α mRNA unter dem Einfluss von Carnosin (Faktor PDK4: $9,67 \pm 1,33$; FOXO1: $6,51 \pm 1,38$; PGC-1 α : $3,25 \pm 0,88$) und L-Histidin (Faktor PDK4: $15,55 \pm 1,82$; FOXO1: $8,22 \pm 1,9$; PGC-1 α : $1,57 \pm 0,33$), aber nicht unter β -Alanin, womit die Expression dieser 3 Gene qualitativ miteinander korreliert. FOXO1 und PGC-1 α sind Transkriptionsfaktoren, welche unter Hungern aktiviert werden und unter anderem die PDK4 steigern. Dazu bindet FOXO1 an die *insulin response elemente* der PDK4, wobei PGC-1 α als Coaktivator mit FOXO1 interagiert oder mittels einer Dimerisierung mit ERR α den PDK4 Promoter aktiviert [95, 96]. Da die Steigerung der FOXO1 mRNA Expression unter Carnosin am stärksten war, sollte mittels Reportergen Assays die Aktivität des Transkriptionsfaktors untersucht werden. Dazu erfolgte die Konstruktion eines Plasmids,

in dem die Expression der sekretierten *Gaussia princeps* Luziferase durch einen basalen Promoter, welcher 4 Bindungsstellen für FOXO1 (*FOXO-GauIII*) besitzt, kontrolliert wird (Methode in [97] beschrieben). Als Kontrollplasmid wurde das gleiche Reporter gen unter der Verwendung von 4 mutierten FOXO1 Bindungsstellen (*FOXO_mut-GauIII*) genutzt (Oligonukleotid Sequenzen siehe 9.1 Ergänzendes Material). Anschließend wurden die Plasmide transient in U87 Zellen transfiziert (Methode in [98] beschrieben), worauf ein Medienwechsel mit oder ohne 50 mM Carnosin erfolgte. Nach einer 24 stündigen Inkubation wurde die Reporter genaktivität im Medium gemessen und an der des Kontroll-Plasmids normiert.

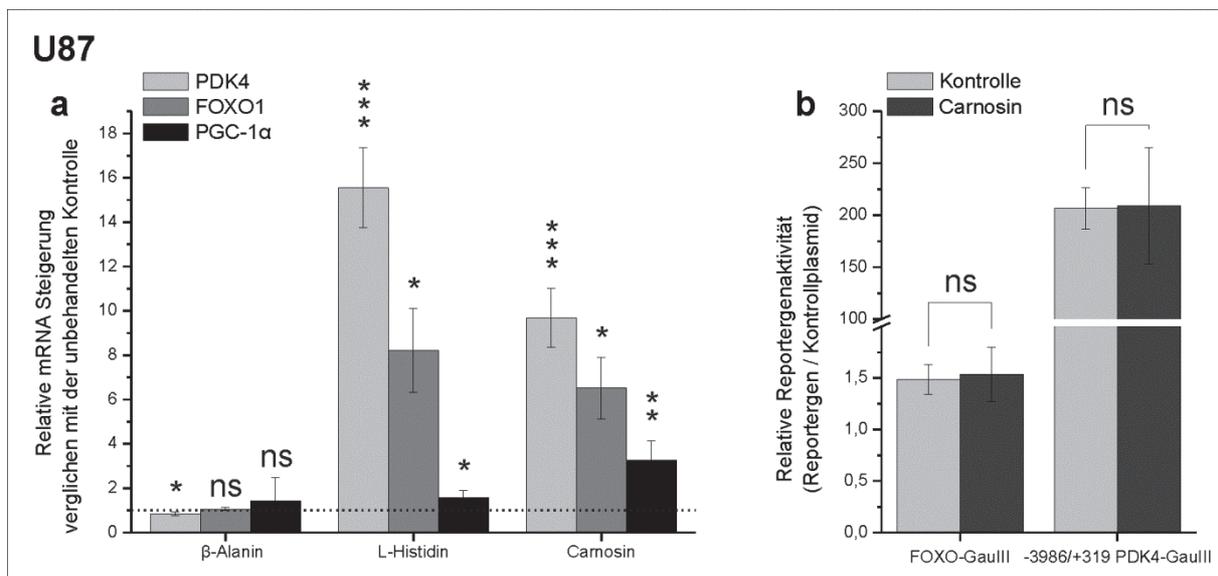


Abbildung 4: a L-Histidin und Carnosin steigern die PDK4, FOXO1 und PGC-1α mRNA Expression. U87 Zellen wurden in Medium mit oder ohne 50 mM β-Alanin, L-Histidin oder Carnosin kultiviert. Nach 24h erfolgte die RNA Extraktion und die Synthese der cDNA, welche anschließend mittels qRT-PCR untersucht wurde. Kopienzahlen der untersuchten Gene wurden an der Kopienzahl der mRNA des TATA-box bindenden Proteins normiert und anschließend an der resultierenden Expression der Kontrolle normalisiert (relative mRNA Steigerung). b Carnosin steigert nicht die FOXO oder PDK4 Reporter genaktivität. U87 Zellen wurden transient mit folgenden Plasmiden transfiziert: FOXO-GauIII, FOXO_mut-GauIII, pT81GauIII oder -3986/+319 PDK4-GauIII. Nach Abschluss der Transfektion erhielten die Zellen frisches Medium mit oder ohne 50 mM Carnosin, worauf nach weiteren 24h Inkubation die *Gaussia*-Luziferase Aktivität im Medium gemessen wurde. Die Aktivität des Reporter gens (*FOXO-GauIII* bzw. -3986/+319 *PDK4-GauIII*) wurde anschließend an dem Kontrollplasmid (*FOXO_mut-GauIII* bzw. *pT81GauIII*) normalisiert (relative Reporter genaktivität). Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test durchgeführt: *** $p < 5 \times 10^{-4}$; ** $p < 5 \times 10^{-3}$; * $p < 5 \times 10^{-2}$; ns nicht signifikant

Abbildung 4b zeigt eine geringe basale Aktivität von *FOXO-GauIII* mit einem Faktor von 1,48 gegenüber dem Kontrollplasmid, jedoch keine signifikante Steigerung unter dem Einfluss von Carnosin. Um weitere Transkriptionsfaktoren einzuschließen, wurde die 5'-Desoxyribonukleinsäuresequenz (DNA) des PDK4 Gens (3986 Basenpaare vor und 319 Basenpaare nach dem Transkriptionsstartpunkt) mittels PCR Amplifikation gewonnen und vor das Startcodon der *Gaussia*-Luziferase des *pT81GauIII* Plasmids kloniert. Somit konnte ein Reporter gen (-3986/+319 *PDK4-GauIII*) gewonnen werden, um die Promotoraktivität der

PDK4 zu untersuchen. Hierzu erfolgte die Transfektion des *-3986/+319 PDK4-GaulIII* Plasmids und des Kontrollplasmids (*pT81GaulIII*) in U87 Zellen, welche daraufhin 24 Stunden mit oder ohne 50 mM Carnosin behandelt wurden. Abbildung 4b zeigt die relative Reportergergen Aktivität des *-3986/+319 PDK4-GaulIII* Plasmids, welche sich unter dem Einfluss von Carnosin nicht von der Kontrolle unterschied. Zum jetzigen Zeitpunkt ist ungeklärt, ob das Ausbleiben einer Reaktion der Reportergergen auf das Carnosin impliziert, dass die für die Regulation benötigten Sequenzen nicht in den Reportergergen vertreten sind oder zusätzliche epigenetische Prozesse an der Regulation beteiligt sind, die durch die Reportergergen nicht erfasst werden.

6.2 Mögliche Regulation durch Histonacetylierung

Mittels epigenetischer Modifikationen kann die Genexpression unabhängig von der DNA Sequenz verändert werden. So liegt genomische DNA im Nukleus an Histone assoziiert vor, wodurch die räumliche Struktur bestimmt und die Genaktivität reguliert werden kann (eine Übersicht bietet [99]). Um Gene zu aktivieren, können Histone mittels Histonacetyltransferasen acetyliert werden, was Histon-Deacetylasen (HDAC) durch eine Deacetylierung wieder rückgängig machen können. Da der Acetylierungsstatus der Histone für die Expression des PDK4 Gens entscheidend ist [31], könnte Carnosin diese Mechanismen beeinflussen und so die PDK4 mRNA Expression regulieren. Um dem nachzugehen wurden U87 Zellen zusätzlich zu Carnosin mit dem HDAC Inhibitor Trichostatin A (TSA) behandelt, worauf nach 24h die RNA isoliert, revers transkribiert und mittels qRT-PCR untersucht wurde. Abbildung 5a zeigt, dass sich sowohl unter dem Einfluss von 0,8 μ M TSA (Faktor: $3,8 \pm 0,44$) als auch unter 20 mM Carnosin (Faktor: $3,85 \pm 0,31$) die PDK4 mRNA Expression erhöht. Zusätzlich wird dieser Effekt bei einer Kombination von 0,8 μ M TSA und 20 mM Carnosin auf den Faktor $8,11 \pm 0,89$ signifikant gesteigert. Dagegen erfolgte unter dem Einfluss von 50 mM Carnosin die Induktion der PDK4 mRNA Expression um den Faktor $18,07 \pm 0,84$, wobei durch eine kombinierte Behandlung mit 0,8 μ M TSA und 50 mM Carnosin keine weitere Steigerung erfolgte (Faktor: $16,9 \pm 0,99$). Diese Beobachtung würde dafür sprechen, dass Carnosin und TSA durch ähnliche oder gleiche Mechanismen die PDK4 mRNA Expression steigern. Um zu überprüfen, ob Carnosin die HDAC Aktivität beeinflusst, wurde der HDAC Glo™ I/II Assay (Promega, Mannheim) zur Bestimmung der HDAC (Klassen I und II) Aktivität durchgeführt. Hierzu wurden U87 Zellen 24h mit oder ohne Carnosin oder 0,4 μ M TSA behandelt, worauf der HDAC-Glo Assay nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung des ATP Gehaltes

mittels des CellTiterGlo Assays (Promega, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers, in separat kultivierten Zellen und unter den gleichen Bedingungen wie im HDAC Glo Assay.

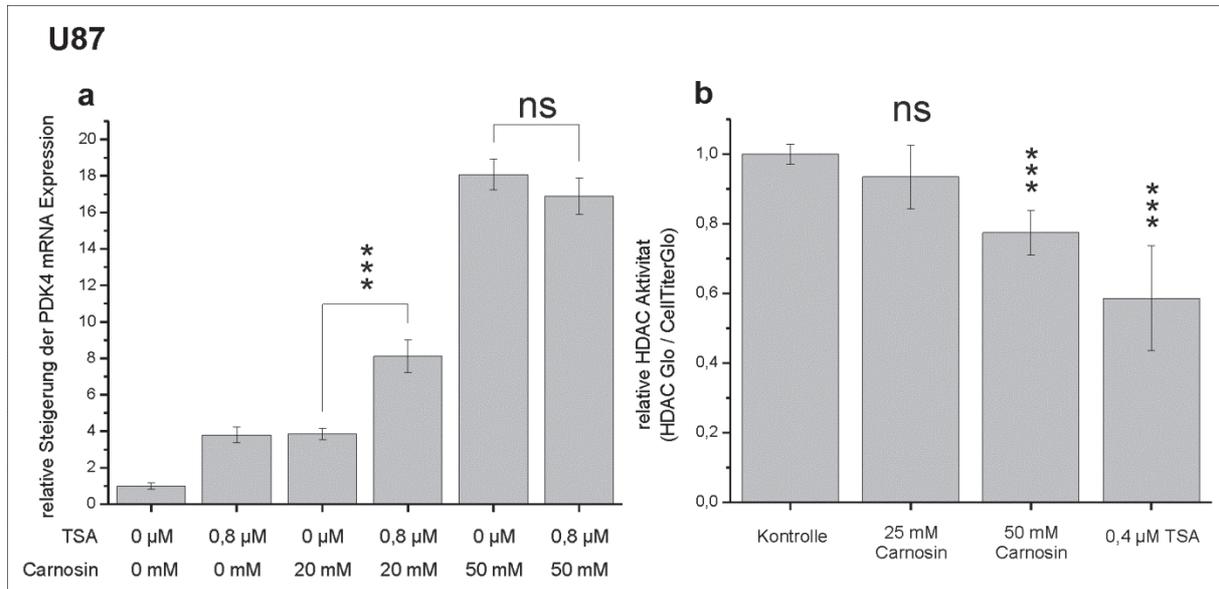


Abbildung 5: a Trichostatin A (TSA) ahmt die Steigerung der PDK4 mRNA nach. U87 Zellen wurden in Medium mit oder ohne Carnosin oder TSA kultiviert. Nach 24h erfolgte die RNA Extraktion, die cDNA Synthese und anschließend eine qRT-PCR Analyse. Kopienzahlen der PDK4 mRNA wurden an der Kopienzahl von β -Aktin normiert (relative mRNA Steigerung). **b** Carnosin reduziert die HDAC Aktivität. U87 Zellen wurden für 24h mit oder ohne Carnosin oder TSA behandelt, worauf der HDAC Glo I/II Assay durchgeführt wurde. Um antiproliferative Effekte zu berücksichtigen, wurde das HDAC Glo Signal an dem Signal des CellTiterGlo Assays normiert (relative HDAC Aktivität). Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test durchgeführt: *** $p < 5 \times 10^{-4}$; ns nicht signifikant

Um antiproliferative Effekte zu berücksichtigen, wurde das HDAC Glo Signal an dem Signal des CellTiterGlo Assays (Methode in [94] beschrieben) normiert (siehe Abbildung 5b). Das Experiment zeigte, dass unter dem Einfluss von 50 mM Carnosin, neben der Positivkontrolle von 0,4 μ M TSA (Reduzierung auf $0,59 \pm 0,15$), die relative HDAC Aktivität auf $0,77 \pm 0,065$ signifikant reduziert wurde. Obwohl keine signifikante Änderung der relativen HDAC Aktivität unter dem Einfluss von 25 mM Carnosin beobachtet wurde (Reduzierung auf $0,93 \pm 0,09$), spricht das Experiment (in dem die Aktivität von Enzymen der Klassen I und II erfasst wurde) dafür, dass unter dem Einfluss von Carnosin die Aktivität von HDACs beeinflusst und hierüber die PDK4 mRNA Expression erhöht wird. Um einen möglichen Einfluss von Carnosin auf den Histonacetylierungsstatus des PDK4 Gens genauer zu untersuchen, sind weiterführende Experimente nötig, zu denen unter anderem auch Chromatin-Immunpräzipitationen gehören würden.

6.3 PDK Proteinexpressionen unter dem Einfluss von Carnosin

Der PDC hat eine große Bedeutung für den Metabolismus der Tumorzellen (siehe 3.3.3 Bedeutung der Pyruvatdehydrogenase für Tumorzellen), wodurch die Untersuchung der PDK4 Proteinexpression von Interesse war.

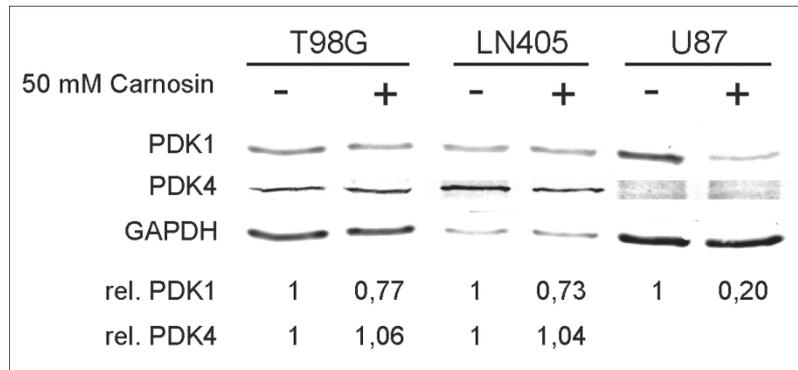


Abbildung 6: PDK1/4 Proteinexpressionen unter dem Einfluss von 50 mM Carnosin. Zellen der Linien T98G, LN405 und U87 wurden für 24h mit (+) oder ohne (-) 50 mM Carnosin behandelt. Proteinextrakte wurden mittels Westen Blot Analyse mit Antikörpern gegen PDK1, PDK4 und GAPDH inkubiert. Relative Protein-Expressionen (rel.) wurden durch Densitometrie ermittelt und an GAPDH normiert.

Hierzu wurden Zellen der Linien T98G, LN405 und U87 für 24h mit oder ohne 50 mM Carnosin behandelt, worauf eine Proteinextraktion und die Analyse per Western Blot erfolgte (Methode in [88] beschrieben). Mittels der Antikörper gegen PDK4 (ab110336, Abcam, Cambrige; Vereinigtes Königreich) und GAPDH als Ladekontrolle (14C10, New England Biolabs, Frankfurt am Main) erfolgte die Detektion der Proteinbanden (siehe Abbildung 6). Interessanterweise konnte in den Zellen der Linien T98G und LN405 keine Veränderung der PDK4 Proteinexpression unter dem Einfluss von Carnosin beobachtet werden. Zusätzlich war das PDK4 Protein in U87 Zellen kaum nachweisbar. Aufgrund dieser Beobachtungen, konnte vermutet werden, dass der antiproliferative Effekt von Carnosin nicht auf die PDK4 zurückzuführen ist. Daher erfolgten auch Untersuchungen an dem Isoenzym der PDK4, der PDK1. Da die mRNA Expression der PDK1 im PCR Array unter dem Einfluss von Carnosin verringert war, wurde dessen Proteinexpression mittels Antikörper (ADI-KAP-PK112, Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach) untersucht. Abbildung 6 zeigt, dass die PDK1 Proteinexpression leicht in Zellen der Linien T98G (Faktor: 0,77) und LN405 (Faktor: 0,73) und stark in U87 (Faktor 0,2) in Anwesenheit von 50 mM Carnosin abnahm. Um zu untersuchen, ob die PDK1 mRNA Expression unter Carnosin nicht nur in U87 Zellen inhibiert wird, wurden die Zelllinien T98G, LN405 und 17 primäre Zellkulturen, welche von GBM Gewebe isoliert wurden (Methode in [81] beschrieben), für 24h mit oder ohne 50 mM Carnosin behandelt und die mRNA Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Das Experiment zeigte, dass in allen, außer einer (Faktor $-1,33 \pm 0,27$) der untersuchten Zellkulturen, die PDK1 mRNA Expression signifikant in Anwesenheit von Carnosin reduziert war (siehe Abbildung 7a). Dabei war der Faktor der geringsten signifikanten Reduzierung $-1,43 \pm 0,15$ (12/06) und der stärksten Reduzierung $-10,2 \pm 0,27$ (29/13). Aufgrund der Bedeutung der PDK1 für den Tumormetabolismus, war es von Interesse zu untersuchen, ob die mRNA

dieses Genes in Glioblastomgewebe überexprimiert wird. Dazu wurde die RNA von 17 chirurgisch entfernten Tumoren isoliert und mittels qRT-PCR untersucht. Zusätzlich wurde cDNA von Normalgewebe verschiedener Patienten und Lokalisationen [Temporallappen (C1234078), Parietallappen (C1234066), Okzipitallappen (C123462) und Frontallappen (C1234051), Biocat GmbH, Heidelberg] verwendet, um die PDK1 mRNA Expressionen im Normalgewebe mit der der Tumore vergleichen zu können.

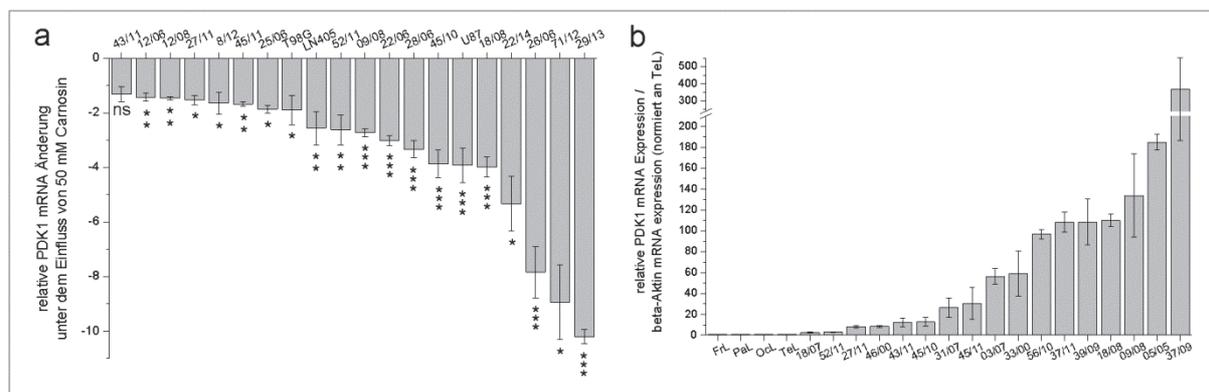


Abbildung 7: **a** Carnosin inhibiert die PDK1 mRNA Expression in GBM Zellkulturen. Zellkulturen, welche aus humanem GBM Gewebe etabliert wurden und GBM Zelllinien wurden mit oder ohne 50 mM Carnosin behandelt. Nach 24h erfolgte die RNA Extraktion und die Synthese der cDNA, welche anschließend mittels qRT-PCR untersucht wurde. Kopienzahlen der PDK1 mRNA wurden an der Kopienzahl des TATA-box bindenden Proteins normiert und anschließend an der resultierenden Expression der Kontrolle normalisiert (relative mRNA Änderung). **b** PDK1 ist in GBM überexprimiert. Die PDK1 mRNA Expression in chirurgisch entferntem GBM Gewebe wurde mittels qRT-PCR untersucht. mRNA Expressionen wurden an der Kopienzahl von β -Aktin normiert und an der Expression von Normalgewebe des Temporallappen (TeL) normalisiert (auf 1 gesetzt). Abkürzungen der Normalgewebe: PaL = Parietallappen; OcL = Okzipitallappen; FrL = Frontallappen. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test durchgeführt: *** $p < 5 \times 10^{-4}$; ** $p < 5 \times 10^{-3}$; * $p < 5 \times 10^{-2}$; ns nicht signifikant

Die qRT-PCR Analysen zeigten, dass das PDK1 Gen in Glioblastomgewebe deutlich überexprimiert ist (siehe Abbildung 7b), wobei der Faktor gegenüber dem Normalgewebe (Temporallappen) von $2,45 \pm 0,39$ (18/07) bis $369,4 \pm 183,02$ (37/09) reicht. Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Arbeitsgruppen, die eine gesteigerte Tumorigenität im Zusammenhang mit einer Überexpression der PDK1 beobachteten [35, 20]. Anhand dieser Beobachtungen ist es denkbar, dass die Beeinflussung der PDK1 für die antineoplastische Wirkung von Carnosin verantwortlich ist. Allerdings ist zur Klärung dieser Frage eine Reihe weiterer Experimente nötig, wobei insbesondere der Einfluss von Carnosin auf die Aktivität des PDCs näher untersucht werden müsste.

7 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades: Dr. rer. med.

Titel: Untersuchungen zur Regulation des Glucosestoffwechsels in
Glioblastomen und dessen Beeinflussung durch Carnosin

eingereicht von: Henry Oppermann

angefertigt in: Universität Leipzig
Universitätsklinikum, Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie und
Medizinische Fakultät, Institut für Biochemie

Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Meixensberger
Prof. Dr. Frank Gaunitz

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist die häufigste Tumorerkrankung des zentralen Nervensystem und zeichnet sich durch eine sehr ungünstige Prognose mit einer mittleren Lebenserwartung von 11 bis 14 Monaten aus [7, 12]. Typisch für die Krebszellen ist ihr glykolytisch hoch aktiver Phänotyp, wobei das Endprodukt der Glykolyse, Pyruvat, auch in Gegenwart von Sauerstoff nicht für die weitere Gewinnung von ATP durch die nachgeschalteten Prozesse des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung verwendet wird. Dieses Phänomen ist heute unter dem Begriff „Warburg Effekt“ bekannt [100]. Demnach gewinnen Tumorzellen ihr ATP ausschließlich aus der Glykolyse unter der verstärkten Sekretion von Lactat. Das natürlich vorkommende Dipeptid Carnosin (β -Alanyl-L-Histidin) wirkt sich antiproliferativ auf Tumorzellen aus, wobei dieser Effekt mit einer Inhibition der glykolytischen ATP Produktion einhergeht [16].

Ziel der Arbeit war es, molekularbiologische Mechanismen zu identifizieren, welche durch Carnosin beeinflusst werden und somit die glykolytische ATP Produktion hemmen. Dazu

erfolgte zunächst die Analyse der mRNA Expression von für die Glykolyse relevanten Genen in Zellen der GBM Linie U87 unter dem Einfluss von Carnosin mittels des "RT2 Profiler PCR Array for human glucose metabolism". Der Array identifizierte mehrere Gene, deren mRNA Expression unter Carnosin verändert war, wobei die Steigerung der Glucokinase (neunfach) und der Pyruvatdehydrogenase Kinase 4 (PDK4; 17-fach) besonders hervorging. Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass dies nach unserem Wissen der erste eindeutige Hinweis ist, dass das Dipeptid Carnosin die Genexpression beeinflussen kann. Um dieses Ergebnis zu verifizieren und weitere mRNA Expressionen zu untersuchen, erfolgten qRT-PCR Experimente mit Carnosin behandelten Zellen der GBM Linien T98G, LN405 und U87. In den Experimenten zeigten sich verschiedene glykolytisch relevante Enzyme auf der Ebene der mRNA Expression von Carnosin beeinflusst, wobei die Steigerung der PDK4 mRNA Expression in allen drei Zelllinien zu beobachten war. Um die Spezifität des Effekts zu untersuchen, wurden U87 Zellen zusätzlich mit dem Dipeptid L-Alanyl-L-Histidin sowie L-Alanin, und den beiden Komponenten des Carnosins, β -Alanin, und L-Histidin, behandelt und mittels qRT-PCR die PDK4 mRNA Expression bestimmt. Neben Carnosin steigerte nur die Aminosäure L-Histidin die PDK4 mRNA Expression. Als nächstes war es von Interesse zu untersuchen, ob L-Histidin neben der Steigerung der PDK4 mRNA Expression ebenso wie Carnosin antiproliferative Effekte auf die GBM Zelllinien hat. Mittels zellbasierender Assays konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure nicht nur die Zellviabilität der Linien T98G, LN405 und U87 signifikant verringert, sondern bei vergleichbaren Konzentrationen dieser Effekt noch stärker war als der des Carnosins. Anhand der Beobachtungen stellte sich nun die Frage, ob die Freisetzung von L-Histidin für die Effekte von Carnosin verantwortlich sein könnte. Da Carnosin durch Carnosinasen in β -Alanin und L-Histidin gespalten wird, wurde zuerst überprüft, ob mRNAs, die die zwei bekannten Carnosinasen kodieren, in den GBM Zelllinien exprimiert werden. Im Vergleich zum Normalgewebe zeigte sich, dass die mRNA der ins Serum sezernierten Carnosinase 1 (CN1) in den Zellen der Linie U87 stark unterexprimiert vorliegt und in T98G und LN405 die Expression unter der Nachweisgrenze war. Dagegen war in den drei GBM Zelllinien die Expression der cytosolischen Carnosinase 2 (CN2) mRNA auf einem ähnlich hohen Niveau wie im Normalgewebe. Da die die CN2 kodierende mRNA in Tumorzellen eindeutig nachgewiesen werden konnte, stellte sich somit die Frage, ob Carnosin in den Tumorzellen tatsächlich gespalten wird. Es zeigte sich, dass in der Anwesenheit von Carnosin die intrazelluläre L-Histidin Konzentration in den Linien T98G und U87 signifikant anstieg. Obwohl dies in der Zelllinie LN405 nicht beobachtet wurde, was wahrscheinlich an einer geringen CN2 Expression liegen könnte, untermauert diese Beobachtung, dass die Freisetzung von L-Histidin durch die enzymatische Spaltung von Carnosin für die antineoplastischen Effekte verantwortlich sein könnte.

Da die antiproliferative Wirkung von Carnosin mit der Induktion der PDK4 mRNA Expression einhergeht, war es von Interesse, zu analysieren, welche molekularbiologischen Mechanismen dafür verantwortlich sind. Die Regulation der PDK4 Genexpression wurde bereits umfangreich charakterisiert [31, 29], wodurch dies einen guten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen bietet. In ersten qRT-PCR Experimenten wurde analysiert, ob die mRNA von Transkriptionsfaktoren, welche dafür bekannt sind, das PDK4 Gen zu regulieren, exprimiert werden und ob eine Änderung der Expression durch Carnosin erfolgt. Alle untersuchten mRNA Expressionen konnten in den Zellen der Linien LN405, T98G und U87 nachgewiesen werden, was eine Regulation durch die entsprechenden Signalwege möglich macht. Zusätzlich konnte eine qualitative Korrelation der PDK4 mRNA Expression mit der der Gene FOXO1 und PGC-1 α beobachtet werden. Erste Transfektionsexperimente lieferten bislang jedoch keinen Hinweis, dass die Wirkung des Carnosins auf die Expression der PDK4 über diese Transkriptionsfaktoren erfolgt. Das Ausbleiben einer Reaktion der Reportergene auf die Gegenwart des Carnosins legte die Vermutung nahe, dass Carnosin epigenetische Mechanismen der Expressionsregulation beeinflussen könnte, die sich in Reportergenen nicht detektieren lassen. Da zudem bekannt war, dass an der Regulation der PDK4 Histonacetylierungen beteiligt sind, wurde die Frage gestellt, ob Carnosin auf diese Einfluss nehmen könnte. Entsprechende qRT-PCR Experimente unter Verwendung des Histon-Deacetylase (HDAC) Inhibitors Trichostatin A (TSA) [101] zeigten in der Tat, dass Carnosin den Acetylierungsstatus der Histone des PDK4 Gens beeinflussen könnte. Diese Beobachtung wurde gestützt durch eine Analyse der HDAC Aktivität, die zeigte, dass Carnosin in U87 Zellen diese nach einer Behandlung von 24h signifikant verringerte. An dieser Stelle sollte angemerkt werden, dass auch andere epigenetische Regulationsmechanismen untersucht wurden. Dabei wurde die PDK4 mRNA Expression unter dem Einfluss des DNA Methyltransferase Inhibitors 5-Aza-deoxycytidin untersucht und die Einwirkungen von micro RNA's mittels eines Reportergens, welches die 3' untranslatierte Region der PDK4 mRNA enthielt, bestimmt (Daten nicht gezeigt). Diese Mechanismen konnten jedoch ausgeschlossen werden, da sich keine Korrelation zu der induzierten PDK4 mRNA Expression unter Carnosin zeigte.

Zusammenfassend deuten die durchgeführten Experimente darauf hin, dass an der Wirkung des Carnosins - zumindest im Hinblick auf die Expression der PDK4 - Prozesse, die die Histonacetylierung modulieren, beteiligt sind. Um dies jedoch eindeutig zu belegen, wären im nächsten Schritt Chromatin-Immünpräzipitations Experimente nötig, um einen veränderten Histonacetylierungsstatus des PDK4 Gens unter dem Einfluss des Carnosins nachzuweisen.

Neben der Untersuchung der Mechanismen, welche an der Steigerung der PDK4 mRNA Expression durch Carnosin beteiligt sind, war es von Interesse, zu hinterfragen, ob die

veränderte Expression der PDK4 zur Inhibition der Zellproliferation führt, wie aufgrund anderer Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden konnte [45]. Hierzu war es notwendig, zu analysieren, inwiefern die veränderte mRNA Expression auch zu einer veränderten Proteinexpression führt. Daher wurde mittels Western Blot Analyse die PDK4 Proteinexpression unter dem Einfluss von 50 mM Carnosin in den Zellen der Linien T98G, LN405 und U87 untersucht. Diese Studien zeigten überraschenderweise keine signifikante Änderung der Expression des PDK4 Proteins unter dem Einfluss von Carnosin. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die Steigerung der PDK4 mRNA Expression für die antineoplastische Wirkung von Carnosin verantwortlich ist. Dies unterminiert jedoch nicht die Bedeutung der Entdeckung, dass die PDK4 mRNA Expression unter Carnosin gesteigert wird, da diese Beobachtung einen Schlüssel für zukünftige Untersuchungen darstellt, um die primären molekularen Ziele des Carnosins aufzuklären.

Im Hinblick auf die antineoplastische Wirkung des Carnosins könnte einer zweiten Beobachtung eine bedeutendere Rolle zufallen. So zeigten qRT-PCR Experimente und Western Blot Analysen, dass die PDK1 mRNA und Proteinexpression ebenfalls durch Carnosin moduliert werden. Dabei konnte eine Verringerung der PDK1 Proteinexpression durch die Behandlung mit 50 mM Carnosin für 24h in den Zellen der Linien T98G, LN405 und U87 um die jeweiligen Faktoren 0,77 (T98G), 0,73 (LN405) und 0,2 (U87) beobachtet werden. Dies ist ein interessantes Ergebnis, da die PDK1 Expression mit der Malignität von Tumoren zu korrelieren scheint [35]. Um zu überprüfen, ob die PDK1 mRNA Expression wie im PCR Array auch in anderen Zellkulturen in Anwesenheit von Carnosin verringert wird, wurden neben den drei Zelllinien 17 primäre Zellkulturen, welche aus GBM Gewebe etabliert wurden, untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die PDK1 mRNA Expression in fast allen untersuchten Zellkulturen unter dem Einfluss des Dipeptids signifikant verringert wird. An dieser Stelle sollte angemerkt werden, dass L-Histidin ebenfalls die PDK1 mRNA und die korrespondierende Proteinexpression in U87 Zellen verringert (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte mittels qRT-PCR gezeigt werden, dass die PDK1 in GBM Gewebe verglichen mit Normalgewebe überexprimiert wird. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und Beständigkeit dieses Effekts, könnte der antineoplastische Effekt von Carnosin mittels einer Inhibition der PDK1 mRNA/Protein Expression vermittelt werden. Um diese Frage zu klären, müssten weitere Experimente erfolgen, in denen beispielsweise die PDC Aktivität unter dem Einfluss von Carnosin und die daraus resultierenden Veränderungen im Stoffwechsel zu untersuchen wären.

8 Literaturverzeichnis

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114(2):97–109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4
2. Gladson CL, Prayson RA, Liu WM (2010) The pathobiology of glioma tumors. *Annu Rev Pathol* 5:33–50. doi: 10.1146/annurev-pathol-121808-102109
3. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 19(4):764–772. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
4. Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M et al. (2000) Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab. Invest.* 80(1):65–72
5. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B et al. (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 64(19):6892–6899. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337
6. Yan H, Parsons DW, Jin G et al. (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* 360(8):765–773. doi: 10.1056/NEJMoa0808710
7. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P et al. (2009) IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin. Cancer Res.* 15(19):6002–6007. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0715
8. Holland EC (2001) Progenitor cells and glioma formation. *Curr. Opin. Neurol.* 14(6):683–688
9. Chesler DA, Berger MS, Quinones-Hinojosa A (2012) The potential origin of glioblastoma initiating cells. *Front Biosci (Schol Ed)* 4:190–205
10. Galli R, Binda E, Orfanelli U et al. (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 64(19):7011–7021. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1364
11. Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S et al. (2006) PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 51(2):187–199. doi: 10.1016/j.neuron.2006.06.012
12. Stupp R, Mason WP, van den Bent, Martin J et al. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352(10):987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330
13. Lunt SY, Vander Heiden MG (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:441–464. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237
14. Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191):309–314
15. Bensinger SJ, Christofk HR (2012) New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23(4):352–361. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.02.003
16. Renner C, Asperger A, Seyffarth A et al. (2010) Carnosine inhibits ATP production in cells from malignant glioma. *Neurol. Res.* 32(1):101–105. doi: 10.1179/016164109X12518779082237
17. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH et al. (2008) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452(7184):230–233. doi: 10.1038/nature06734
18. Ward PS, Thompson CB (2012) Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21(3):297–308. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.014

19. Yeung SJ, Pan J, Lee M (2008) Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 65(24):3981–3999. doi: 10.1007/s00018-008-8224-x
20. Kaplon J, Zheng L, Meissl K et al. (2013) A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* 498(7452):109–112. doi: 10.1038/nature12154
21. Patel MS, Nemeria NS, Furey W et al. (2014) The Pyruvate Dehydrogenase Complexes: Structure-based Function and Regulation. *J. Biol. Chem.* 289(24):16615–16623. doi: 10.1074/jbc.R114.563148
22. Jha MK, Jeon S, Suk K (2012) Pyruvate Dehydrogenase Kinases in the Nervous System: Their Principal Functions in Neuronal-glia Metabolic Interaction and Neuro-metabolic Disorders. *Curr Neuropharmacol* 10(4):393–403. doi: 10.2174/157015912804143586
23. Patel MS, Korotchkina LG (2001) Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Exp. Mol. Med.* 33(4):191–197. doi: 10.1038/emm.2001.32
24. Yang D, Gong X, Yakhnin A et al. (1998) Requirements for the adaptor protein role of dihydrolipoyl acetyltransferase in the up-regulated function of the pyruvate dehydrogenase kinase and pyruvate dehydrogenase phosphatase. *J. Biol. Chem.* 273(23):14130–14137
25. Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P et al. (1998) Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* 329 (Pt 1):191–196
26. Sugden MC, Holness MJ (2003) Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284(5):E855-62. doi: 10.1152/ajpendo.00526.2002.
27. Podar K, Anderson KC (2010) A therapeutic role for targeting c-Myc/Hif-1-dependent signaling pathways. *Cell Cycle* 9(9):1722–1728
28. Pate KT, Stringari C, Sprowl-Tanio S et al. (2014) Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer. *EMBO J.* 33(13):1454–1473. doi: 10.15252/emboj.201488598
29. Jeong JY, Jeoung NH, Park K et al. (2012) Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Diabetes Metab J* 36(5):328–335. doi: 10.4093/dmj.2012.36.5.328
30. Lee JH, Kim E, Kim D et al. (2012) Hypoxia induces PDK4 gene expression through induction of the orphan nuclear receptor ERR γ . *PLoS ONE* 7(9):e46324. doi: 10.1371/journal.pone.0046324
31. Kwon H, Harris RA (2004) Mechanisms responsible for regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene expression. *Adv. Enzyme Regul.* 44:109–121. doi: 10.1016/j.advenzreg.2003.11.020
32. Huang B, Wu P, Bowker-Kinley MM et al. (2002) Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Expression by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Ligands, Glucocorticoids, and Insulin. *Diabetes* 51(2):276–283. doi: 10.2337/diabetes.51.2.276
33. Lu C, Lin S, Chen K et al. (2008) Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *J. Biol. Chem.* 283(42):28106–28114. doi: 10.1074/jbc.M803508200

34. Degenhardt T, Saramäki A, Malinen M et al. (2007) Three members of the human pyruvate dehydrogenase kinase gene family are direct targets of the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J. Mol. Biol.* 372(2):341–355. doi: 10.1016/j.jmb.2007.06.091
35. McFate T, Mohyeldin A, Lu H et al. (2008) Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 283(33):22700–22708. doi: 10.1074/jbc.M801765200
36. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P et al. (2010) Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med* 2(31):31ra34. doi: 10.1126/scitranslmed.3000677
37. Jha MK, Suk K (2013) Pyruvate dehydrogenase kinase as a potential therapeutic target for malignant gliomas. *Brain Tumor Res Treat* 1(2):57–63. doi: 10.14791/btrt.2013.1.2.57
38. Fan J, Kang H, Shan C et al. (2014) Tyr-301 phosphorylation inhibits pyruvate dehydrogenase by blocking substrate binding, and promotes the Warburg effect. *J. Biol. Chem.* doi: 10.1074/jbc.M114.593970
39. Shan C, Kang H, Elf S et al. (2014) Tyr-94 phosphorylation inhibits pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 and promotes tumor growth. *J. Biol. Chem.* 289(31):21413–21422. doi: 10.1074/jbc.M114.581124
40. Stacpoole PW (2012) The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases. *Aging Cell* 11(3):371–377. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00805.x
41. Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T et al. (2012) Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metab.* 15(6):827–837. doi: 10.1016/j.cmet.2012.05.001
42. Lu W, Pelicano H, Huang P (2010) Cancer metabolism: is glutamine sweeter than glucose? *Cancer Cell* 18(3):199–200. doi: 10.1016/j.ccr.2010.08.017
43. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E et al. (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104(49):19345–19350. doi: 10.1073/pnas.0709747104
44. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM et al. (2009) ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 324(5930):1076–1080. doi: 10.1126/science.1164097
45. Grassian AR, Metallo CM, Coloff JL et al. (2011) Erk regulation of pyruvate dehydrogenase flux through PDK4 modulates cell proliferation. *Genes Dev.* 25(16):1716–1733. doi: 10.1101/gad.16771811
46. Zachar Z, Marecek J, Maturo C et al. (2011) Non-redox-active lipoate derivatives disrupt cancer cell mitochondrial metabolism and are potent anticancer agents in vivo. *J. Mol. Med.* 89(11):1137–1148. doi: 10.1007/s00109-011-0785-8
47. Gulewitsch W, Amiradžibi S (1900) Ueber das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextractes. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 33(2):1902–1903. doi: 10.1002/cber.19000330275
48. Mannion AF, Jakeman PM, Dunnett M et al. (1992) Carnosine and anserine concentrations in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 64(1):47–50
49. Abraham D, Pisano JJ, Uendriend S (1962) The distribution of homocarnosine in mammals. *Arch. Biochem. Biophys.* 99:210–213
50. Boldyrev AA, Aldini G, Derave W (2013) Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.* 93(4):1803–1845. doi: 10.1152/physrev.00039.2012

51. Kalyankar GD, Meister A (1959) Enzymatic synthesis of carnosine and related beta-alanyl and gamma-aminobutyryl peptides. *J. Biol. Chem.* 234:3210–3218
52. Horinishi H, Grillo M, Margolis FL (1978) Purification and characterization of carnosine synthetase from mouse olfactory bulbs. *J. Neurochem.* 31(4):909–919
53. Hoffmann AM, Bakardjiev A, Bauer K (1996) Carnosine-synthesis in cultures of rat glial cells is restricted to oligodendrocytes and carnosine uptake to astrocytes. *Neuroscience Letters* 215(1):29–32. doi: 10.1016/S0304-3940(96)12937-2
54. Bauer K, Schulz M (1994) Biosynthesis of carnosine and related peptides by skeletal muscle cells in primary culture. *Eur. J. Biochem.* 219(1-2):43–47
55. Drozak J, Chrobok L, Poleszak O et al. (2013) Molecular identification of carnosine N-methyltransferase as chicken histamine N-methyltransferase-like protein (hnmt-like). *PLoS ONE* 8(5):e64805. doi: 10.1371/journal.pone.0064805
56. Jackson MC, Kucera CM, Lenney JF (1991) Purification and properties of human serum carnosinase. *Clin. Chim. Acta* 196(2-3):193–205
57. Lenney JF, Peppers SC, Kucera-Orallo CM et al. (1985) Characterization of human tissue carnosinase. *Biochem. J.* 228(3):653–660
58. Teufel M, Saudek V, Ledig J et al. (2003) Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J. Biol. Chem.* 278(8):6521–6531. doi: 10.1074/jbc.M209764200
59. Hipkiss AR (1998) Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30(8):863–868
60. Smith EC (1938) The buffering of muscle in rigor; protein, phosphate and carnosine. *J. Physiol. (Lond.)* 92(3):336–343
61. Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC et al. (1988) Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85(9):3175–3179
62. Baran EJ (2000) Metal complexes of carnosine. *Biochemistry Mosc.* 65(7):789–797
63. Hipkiss AR, Worthington VC, Himsworth DT et al. (1998) Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Biochim. Biophys. Acta* 1380(1):46–54
64. Nadi NS, Hirsch JD, Margolis FL (1980) Laminar distribution of putative neurotransmitter amino acids and ligand binding sites in the dog olfactory bulb. *J. Neurochem.* 34(1):138–146
65. Boldyrev A, Song R, Lawrence D et al. (1999) Carnosine protects against excitotoxic cell death independently of effects on reactive oxygen species. *Neuroscience* 94(2):571–577
66. Hipkiss AR, Michaelis J, Syrris P (1995) Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Lett.* 371(1):81–85
67. Hipkiss AR, Chana H (1998) Carnosine protects proteins against methylglyoxal-mediated modifications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248(1):28–32. doi: 10.1006/bbrc.1998.8806
68. Preston JE, Hipkiss AR, Himsworth DT et al. (1998) Toxic effects of beta-amyloid(25-35) on immortalised rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine. *Neurosci. Lett.* 242(2):105–108
69. Hipkiss AR (2007) Could carnosine or related structures suppress Alzheimer's disease? *J. Alzheimers Dis.* 11(2):229–240
70. Boldyrev A, Fedorova T, Stepanova M et al. (2008) Carnosine [corrected] increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: a pilot study. *Rejuvenation Res* 11(4):821–827. doi: 10.1089/rej.2008.0716

71. Chez MG, Buchanan CP, Aimonovitch MC et al. (2002) Double-blind, placebo-controlled study of L-carnosine supplementation in children with autistic spectrum disorders. *J. Child Neurol.* 17(11):833–837
72. Babizhayev MA, Deyev AI, Yermakova VN et al. (2001) N-Acetylcarnosine, a natural histidine-containing dipeptide, as a potent ophthalmic drug in treatment of human cataracts. *Peptides* 22(6):979–994
73. Chengappa, K N Roy, Turkin SR, DeSanti S et al. (2012) A preliminary, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of L-carnosine to improve cognition in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 142(1-3):145–152. doi: 10.1016/j.schres.2012.10.001
74. Baraniuk JN, El-Amin S, Corey R et al. (2013) Carnosine treatment for gulf war illness: a randomized controlled trial. *Glob J Health Sci* 5(3):69–81
75. Sakae K, Agata T, Kamide R et al. (2013) Effects of L-carnosine and its zinc complex (Polaprezinc) on pressure ulcer healing. *Nutr Clin Pract* 28(5):609–616. doi: 10.1177/0884533613493333
76. Soliman KM, Mohamed AM, Metwally NS (2007) Attenuation of Some Metabolic Deteriorations Induced by Diabetes Mellitus Using Carnosine. *J. of Applied Sciences* 7(16):2252–2260. doi: 10.3923/jas.2007.2252.2260
77. Yuneva MO, Bulygina ER, Gallant SC et al. (1999) Effect of Carnosine on Age-Induced Changes in Senescence-Accelerated Mice. *Journal of Anti-Aging Medicine* 2(4):337–342. doi: 10.1089/rej.1.1999.2.337
78. Hipkiss AR (2009) On the enigma of carnosine's anti-ageing actions. *Exp. Gerontol.* 44(4):237–242. doi: 10.1016/j.exger.2008.11.001
79. Nagai K, Suda T (1986) [Antineoplastic effects of carnosine and beta-alanine--physiological considerations of its antineoplastic effects]. *Nihon Seirigaku Zasshi* 48(11):741–747
80. Holliday R, McFarland GA (1996) Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. *Br. J. Cancer* 73(8):966–971
81. Renner C, Seyffarth A, de Arriba, Susana Garcia et al. (2008) Carnosine Inhibits Growth of Cells Isolated from Human Glioblastoma Multiforme. *Int J Pept Res Ther* 14(2):127–135. doi: 10.1007/s10989-007-9121-0
82. Renner C, Zemitzsch N, Fuchs B et al. (2010) Carnosine retards tumor growth in vivo in an NIH3T3-HER2/neu mouse model. *Mol. Cancer* 9:2. doi: 10.1186/1476-4598-9-2
83. Horii Y, Shen J, Fujisaki Y et al. (2012) Effects of L-carnosine on splenic sympathetic nerve activity and tumor proliferation. *Neurosci. Lett.* 510(1):1–5. doi: 10.1016/j.neulet.2011.12.058
84. Jia H, Qi X, Fang S et al. (2009) Carnosine inhibits high glucose-induced mesangial cell proliferation through mediating cell cycle progression. *Regul. Pept.* 154(1-3):69–76. doi: 10.1016/j.regpep.2008.12.004
85. Rybakova YS, Boldyrev AA (2012) Effect of carnosine and related compounds on proliferation of cultured rat pheochromocytoma PC-12 cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 154(1):136–140
86. Iovine B, Iannella ML, Nocella F et al. (2012) Carnosine inhibits KRAS-mediated HCT116 proliferation by affecting ATP and ROS production. *Cancer Lett.* 315(2):122–128. doi: 10.1016/j.canlet.2011.07.021
87. Gaunitz F, Hipkiss AR (2012) Carnosine and cancer: a perspective. *Amino Acids* 43(1):135–142. doi: 10.1007/s00726-012-1271-5
88. Asperger A, Renner C, Menzel M et al. (2011) Identification of factors involved in the anti-tumor activity of carnosine on glioblastomas using a proteomics approach. *Cancer Invest.* 29(4):272–281. doi: 10.3109/07357907.2010.550666

89. Bharadwaj LA, Davies GF, Xavier IJ et al. (2002) L-carnosine and verapamil inhibit hypoxia-induced expression of hypoxia inducible factor (HIF-1 alpha) in H9c2 cardiomyoblasts. *Pharmacol. Res.* 45(3):175–181. doi: 10.1006/phrs.2001.0911
90. Iovine B, Oliviero G, Garofalo M et al. (2014) The anti-proliferative effect of L-carnosine correlates with a decreased expression of hypoxia inducible factor 1 alpha in human colon cancer cells. *PLoS ONE* 9(5):e96755. doi: 10.1371/journal.pone.0096755
91. Ditte Z, Ditte P, Labudova M et al. (2014) Carnosine inhibits carbonic anhydrase IX-mediated extracellular acidosis and suppresses growth of HeLa tumor xenografts. *BMC Cancer* 14:358. doi: 10.1186/1471-2407-14-358
92. Zhang Z, Miao L, Wu X et al. (2014) Carnosine Inhibits the Proliferation of Human Gastric Carcinoma Cells by Retarding Akt/mTOR/p70S6K Signaling. *J Cancer* 5(5):382–389. doi: 10.7150/jca.8024
93. Hipkiss AR, Gaunitz F (2014) Inhibition of tumour cell growth by carnosine: some possible mechanisms. *Amino Acids* 46(2):327–337. doi: 10.1007/s00726-013-1627-5
94. Letzien U, Oppermann H, Meixensberger J et al. (2014) The antineoplastic effect of carnosine is accompanied by induction of PDK4 and can be mimicked by L-histidine. *Amino Acids* 46(4):1009–1019. doi: 10.1007/s00726-014-1664-8
95. Attia RR, Connaughton S, Boone LR et al. (2010) Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) by thyroid hormone: role of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC-1 alpha). *J. Biol. Chem.* 285(4):2375–2385. doi: 10.1074/jbc.M109.039081
96. Schmidt SF, Mandrup S (2011) Gene program-specific regulation of PGC-1{alpha} activity. *Genes Dev.* 25(14):1453–1458. doi: 10.1101/gad.2076411
97. Braun S, Oppermann H, Mueller A et al. (2012) Hedgehog signaling in glioblastoma multiforme. *Cancer Biol. Ther.* 13(7):487–495. doi: 10.4161/cbt.19591
98. Heise K, Oppermann H, Meixensberger J et al. (2013) Dual luciferase assay for secreted luciferases based on Gaussia and NanoLuc. *Assay Drug Dev Technol* 11(4):244–252. doi: 10.1089/adt.2013.509
99. Maleszewska M, Kaminska B (2013) Is glioblastoma an epigenetic malignancy? *Cancers (Basel)* 5(3):1120–1139. doi: 10.3390/cancers5031120
100. Bayley J, Devilee P (2012) The Warburg effect in 2012. *Curr Opin Oncol* 24(1):62–67. doi: 10.1097/CCO.0b013e32834deb9e
101. Beumer JH, Tawbi H (2010) Role of histone deacetylases and their inhibitors in cancer biology and treatment. *Curr Clin Pharmacol* 5(3):196–208

9 Anhang

9.1 Ergänzendes Material

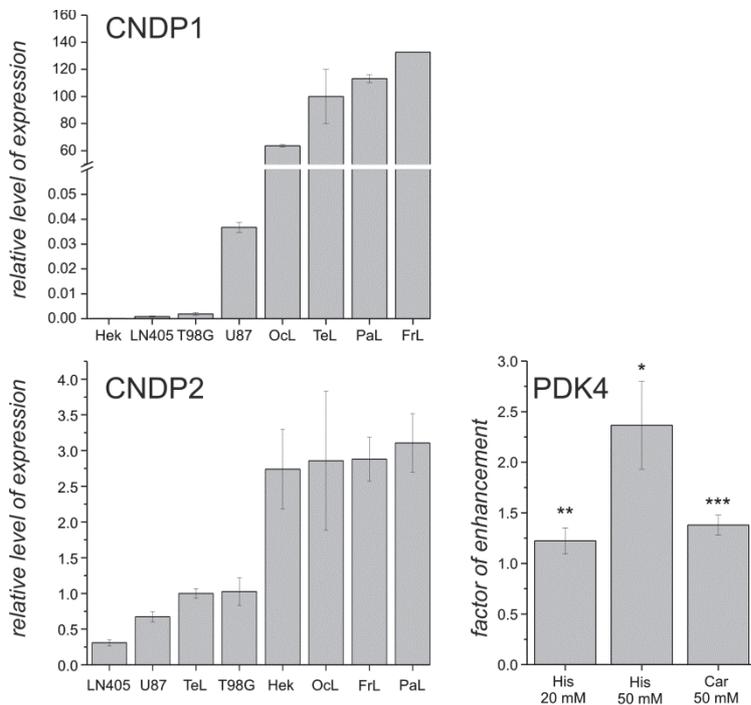
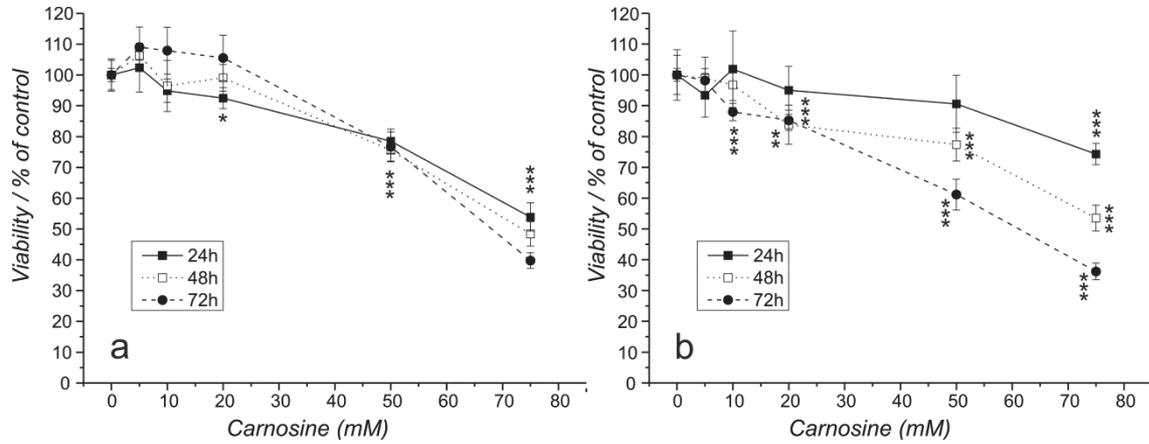
Supplemental material 1 – Primers used for qRT-PCR

target gene	forward primer (5'→3')	reverse primer (5'→3')	Product size Melt temp.	targeted variant
GLUT1 NM_006516.2	TGATCGAGGAGTTCTACAACCAGA Exon Nr. 3	CCGGGATGAAGATGATGCTC Exon Nr. 5	474 bp 90.7 °C	1
GLUT2 NM_000340.1	ATTGCTCCAACCGCTCTCA Exon Nr. 5	CTGAAGGATGGCTCGCACACC Exon Nr. 6	162 bp 84.5 °C	1
GLUT3 NM_006931.2	CTGGTTTATTGTGGCCGAACTCTT Exon Nr. 9	GCAGCATTCAGAAGCGTCCGT Exon Nr. 10	439 bp 88.9 °C	1
GLUT4 NM_001042.2	GCTGTGTTCTCTGCGGTGCTT Exon Nr. 2	GCCTCCCAGCCACGTCTCAT Exon Nr. 3	112 bp 85.6 °C	1
HK1 NM_000188.2	GCAGATCTCTGAGACGCTGAA Exon Nr. 16	CTGTCATCGCAGGTGCTATTC Exon Nr. 17	138 bp 86.3 °C	1 - 5
HK2 NM_000198.4	CCCTGCCACCAGACTAAACTA Exon Nr. 5	GCCCACAATGAGACCAATC Exon Nr. 6	225 bp 86.4 °C	1
GCK NM_000162.3	CATCTCTGAGTGCATCTCCGA Exon Nr. 4	CCCTCTCCGTTTGATAGCGT Exon Nr. 5	205 bp 87.1 °C	1 - 3
PFKM NM_001166686.1	TGGGCCTGGTTGGGTCAAT Exon Nr. 8	GCGGCCATTACTTCTAACAC Exon Nr. 9	155 bp 85.3 °C	1 - 4
PFKL NM_002626.4	ATCGCTGAGGGTGCCATTGAC Exon Nr. 8	ACAGTTACACGGGTGTCGAA Exon Nr. 9	101 bp 86.8 °C	2
PFKP NM_002627.4	TCCAACAATGTGCCGGGTTC Exon Nr. 16	CCGCCATGGTCTCGATGATG Exon Nr. 17	137 bp 88.8 °C	1, 2
PFKFB3*	CCGCTCATGAGACGCAATA Exon C	CGGGAGCCTTTCATGTTAGAC Exon D and G	193 bp 90.7 °C	UBI2K4
ALDOA NM_000034.3	CCATGGCGACCGTCACA Exon Nr. 12	GCCAGGGCTCGCTTGACATAC Exon Nr. 13	253 bp 92.0 °C	1 - 6
ALDOC NM_005165.2	GTGGGCATCAAGGTTGACAAG Exon Nr. 3	GTATTGGGCACAGCGTTCT Exon Nr. 5	102 bp 85.8 °C	1
TPI NM_000365.5	CAGACAAAGGTCATCGCAGAT Exon Nr. 3	CGCATCAGAGACGTTGGACT Exon Nr. 5	162 bp 87.3 °C	1 - 3
GAPDH NM_002046.3	GATGCCCCATGTTCTGTCA Exon Nr. 6	TGTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT Exon Nr. 9	589 bp 89.7 °C	1
PGK1 NM_000291.3	CTGGCTGGATGGGCTTGACT Exon Nr. 8	AATACCCCCACAGGACCATT Exon Nr. 9	103 bp 84.8 °C	1

target gene	forward primer (5'→3')	reverse primer (5'→3')	Product size Melt temp.	targeted variant
PGK2 NM_138733.4	GCTGGAGAACCTGCGCTTTCA Exon Nr. 1	AGAATCCGGATGCTTTATGGG Exon Nr. 1	212 bp 82.2 °C	1
PGAM1/4 NM_002629.2	ATCAGTAAGGATCGCAGGTAT Exon Nr. 2	GGCTGCAATCAGTACACGTT Exon Nr. 3	150 bp 84.2 °C	1
PGAM2 NM_000290.3	TGGACGAGAAGCACCCCTACT Exon Nr. 1	CCTTGATCTGGGGAACAATCT Exon Nr. 2	153 bp 89.0 °C	1
PGAM5 NM_001170543.1	GCCAGACCCGCCCGTGTC Exon Nr. 4	TCTGCGCGGTGGATGTAGTTC Exon Nr. 5	102 bp 88.7 °C	1 - 3
ENO1 NM_001428.3	CTTCAAGTCTCCCGATGACCC Exon Nr. 8	CGGCCTTGGCGATCCT Exon Nr. 9	215 bp 87.7 °C	1, 2
ENO2 NM_001975.2	TCCCACTGATCCTTCCCGATA Exon Nr. 8	GGACCAGGCAGCCCAATCATC Exon Nr. 9	127 bp 86.7 °C	1
ENO3 NM_001976.4	AATCGATCCAGGCGTGCAAA Exon Nr. 9	GGCCTTCGGGTTACGGAECTT Exon Nr. 12	245 bp 89.2 °C	1 - 3
PKM1 NM_182470.2	TTGTGCGAGCCTCAAGTCACT Exon Nr. 7	CAGGGAAGATGCCACGGTA Exon Nr. 9	222 bp 88.9 °C	2 - 4, 7
PKM2 NM_002654.4	TGGGGCCATAATCGTCCT Exon Nr. 9	GACGAGCTGTCTGGGGATTCC Exon Nr. 10	110 bp 88.2 °C	1, 5, 6
PKLR NM_000298.5	CGAGGGCAGAGACAAGCGATG Exon Nr. 8	CAGCTGCCGGTGGTACACT Exon Nr. 9	161 bp 89.7 °C	1, 2
LDHA NM_005566.3	CGGTTGCAATCTGGATTCAGC Exon Nr. 3	TGCACAACCTCCACCTAGAATCCT Exon Nr. 7	582 bp 87.0 °C	1 - 6
LDHB NM_002300.6	TCTGCTAGATTTGCTACCTTATG Exon Nr. 5	CAGCCTAGAGCTCACTAGTCACA Exon Nr. 8	522 bp 84.9 °C	1, 2
PDK4 NM_002612.3	CTGTGATGGATAATTCCC Exon Nr. 9	GCCTTAAAGTAGATGATAGCA Exon Nr. 10	148 bp 81.1 °C	1
TBP NM_003194.4	TTGACCTAAAGACCATTGCAC Exon Nr. 4	GCTCTGACTTTAGCACCTGTT Exon Nr. 6	424 bp 83.9 °C	1, 2
beta actin NM_001101.3	CCGGGACCTGACTGACTACCT Exon Nr. 4	CCTAGAAGCATTGCGGTGGA Exon Nr. 6	584 bp 90.5 °C	1
CNDP1 NM_032649.5	GAAGAATACCGGAATAGCAG Exon Nr. 7	CGGCCAGGTATGACTGTT Exon Nr. 8	152 bp 83.8 °C	1
CNDP2 NM_018235.2	AGAAGCCCTGCATCACCTAC Exon Nr. 6	CCACCAAAGAGCCCATC Exon Nr. 7	150 bp 86.4 °C	1, 2
PDK1 NM_018235.2	AATCACCAGGACAGCCAATAC Exon Nr. 7	CTCATTACCCAGCGTGACA Exon Nr. 8	158 bp 82.4 °C	1
FOXO1 NM_018235.2	GTGGATGGTCAAGAGCGTGC Exon Nr. 1	GAACTTGCTGTGTAGGGACA Exon Nr. 2	106 bp 83.5 °C	1
PGC-1 alpha NM_018235.2	GTCGCAGTCACAACACTT Exon Nr. 5	CACTTAAGGTGCGTTCA Exon Nr. 7	122 bp 82.4 °C	1

* Sequence was derived from:

Kessler R, Eschrich K (2001) Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Mol Brain Res* 7:190-195



Supplemental Material 2

Effect of carnosine and L-histidine on non-tumorous human embryonic kidney cells

In a first series of experiments with the non-tumorous human embryonic kidney cells HEK293 we evaluated cell-viability in the presence of different concentrations of carnosine after 24, 48 and 72 hours exposure. The result presented in supplemental Fig. 1 demonstrates that the non-tumorous cell line also responds to the presence of carnosine with a reduced viability as determined by CellTiterGlo (supplemental Fig. 1a) and CellTiterBlue assay (supplemental Fig. 1b) but not as strongly as glioblastoma cells. In addition, qRT-PCR experiments performed with HEK293 cells which were incubated for 24 hours in the presence of 20 mM and 50 mM L-histidine and 50 mM carnosine confirmed a weak but significant effect on PDK4 expression in this line (supplemental Fig. 2). In addition we analyzed the expression of carnosinase 1 and 2 (supplemental Fig. 2). Whereas carnosinase 1 expression was below the standard curve (less than 100 mRNA copies) expression of carnosinase 2 was comparable to the expression in normal brain tissue.

Oligonukleotidsequenzen (Weiterführende Arbeiten)

Tabelle 2: Oligonukleotidsequenzen zur Konstruktion der Reportergene

Bindungsmotif	forward Sequenz (5'→3')	reverse Sequenz (5'→3')
FOXO	GAT CCG GGA GAG ATC AAG TAA ACA ACT ATG TAA ACA ACA AAC TCA	GAT CTG AGT TTG TTG TTT ACA TAG TTG TTT ACT TGA TCT CTC CCG
FOXO_mut	GAT CCG GGA GAG ATC AAG TTA TCA ACT ATG TTA TCA ACA AAC TCA	GAT CTG AGT TTG TTG ATA ACA TAG TTG ATA ACT TGA TCT CTC CCG

Primer	forward Sequenz (5'→3')	reverse Sequenz (5'→3')
(-3968/+319) PDK4	CAT GGC GGG ATC CTT TCT TAT GGG CTG C	CGC CTC CAT GGT GAC GCC CAC Cc

9.2 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....
Datum

.....
Unterschrift

9.3 Lebenslauf

Name: Henry Oppermann
Familienstatus ledig
Staatsangehörigkeit deutsch
Adresse: Rudolph-Hermann-Straße 12, 04299 Leipzig
Geburtsdatum: 10. Mai 1988 in Leipzig

Beruflicher Werdegang

5.11.2012 – heute wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie Universitätsklinikum Leipzig (Thema: Untersuchungen zur Regulation des Glucosestoffwechsels in Glioblastomen und dessen Beeinflussung durch Carnosin)

16.04.2012 – 14.10.2012 Auslandspraktikum in der Aston University Birmingham United Kingdom (Thema: Beeinflussung von Carnosin auf das Zellwachstum von Mesenchymalen Stammzellen)

01.11.2011 – 06.04.2012 Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie Universitätsklinikum Leipzig (Thema: Untersuchungen zur Aktivität des Hedgehog Signalweges in Glioblastomen)

01.02.2011 – 01.11.2011 Diplom an der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie Universitätsklinikum Leipzig (Thema: Untersuchungen zur Aktivität des HIF1- α Signal- transduktionsweges in Glioblastomen)

10.08.2009 – 28.02.2010 Praxissemester im Institut für Oberflächen-modifizierung Leipzig (Thema: Photoinduzierte chemische Reaktionen: Kinetik und Mechanismen)

09.02.2009 – 27.09.2009 Praktikum bei der Firma bubbles & beyond

04.08.2006 – 10.04.2007 Grundwehrdienst

Schulische Ausbildung

2007 – 2011	Hochschule Zittau/Görlitz, Studium der Chemie (erlangen des akademischen Grades: Diplom - Chemiker)
2004 – 2006	Karl-Heine-Schule, Fachoberschule Fachrichtung Technik (erlangen der Fachhochschulreife)
1998 – 2004	Thomas-Müntzer-Schule Leipzig (erlangen das Realschulabschlusses)
1994 – 1998	Christoph-Arnold-Grundschule Leipzig

Sprachkenntnisse

Englisch verhandlungssicher
Polnisch Grundkenntnisse

9.4 Veröffentlichungen

Publikationen

Letzien, Ulrike*; **Oppermann, Henry***; Meixensberger, Jürgen; Gaunitz, Frank (2014): The antineoplastic effect of carnosine is accompanied by induction of PDK4 and can be mimicked by l-histidine. In: *Amino Acids* 46 (4), S. 1009–1019. DOI: 10.1007/s00726-014-1664-8.

Heise, Kerstin; **Oppermann, Henry**; Meixensberger, Jürgen; Gebhardt, Rolf; Gaunitz, Frank (2013): Dual luciferase assay for secreted luciferases based on Gaussia and NanoLuc. In: *Assay Drug Dev Technol* 11 (4), S. 244–252. DOI: 10.1089/adt.2013.509.

Braun, Stefanie*; **Oppermann, Henry***; Mueller, Antje*; Renner, Christof; Hovhannisyan, Amalya; Baran-Schmidt, Rainer et al. (2012): Hedgehog signaling in glioblastoma multiforme. In: *Cancer Biol. Ther.* 13 (7), S. 487–495. DOI: 10.4161/cbt.19591.

*Diese Autoren waren gleichermaßen an der Arbeit beteiligt.

Buchbeiträge

Gaunitz F., **Oppermann H**, Hipkiss A. R. (2014): Carnosine and Cancer, in: Preedy V. R. (2014): *Imidazole Dipeptides; Chemistry, Analysis, Function and Effects* (befindet sich im Druck)

Kongressbeiträge

Vorträge:

Oppermann, H.; Letzien, U.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. (2014): The specific anti-neoplastic effect of carnosine and its dependence on release of L-histidine under the influence of carnosinase in glioma tumor cells. In: *65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie*; Dresden. DOI: 10.3205/14dgnc053

Oppermann, H.; Renner, C.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. (2012): HIF signalling in glioblastoma under the influence of carnosine. In: *63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie*; Leipzig. DOI: 10.3205/12dgnc215

Posterbeiträge:

Süptitz, J.; Reichenbach, A.; **Oppermann, H.**; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. (2014): Correlation between glutathione concentration, glutamate secretion, response to oxidative stress, expression and inhibition of the xc-exchange transporter in glioblastoma cell culture. In: *65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie*; Dresden. DOI: 10.3205/14dgnc464

Letzien, U.; **Oppermann, H.**; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. (2014): Transcriptional effects of carnosine in glioblastoma cells are mimicked by the histone deacetylase inhibitor Trichostatine A. In: *65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie*; Dresden. DOI: 10.3205/14dgnc465

Frömberg, A.; Rabe, M.; **Oppermann, H.**; Gaunitz, F.; Meixensberger, J.; Aigner, A. (2013): Functional analysis of the Special AT-rich Binding Protein 1 (SATB1) for therapeutic intervention in solid tumor cells. In: *12. Research Festival for Life Sciences*; Leipzig

Oppermann, H.; Letzien, U.; Meixensberger, J.; Gaunitz, F. (2013): The specific anti-neoplastic effect of carnosine and its dependence on release of L-histidine under the influence of carnosinase in tumor cells. In: *12. Research Festival for Life Sciences*; Leipzig

Abstracts:

Prager, I.; Patties, I.; Himmelbach, K.; Kallendrusch, S.; **Oppermann, H.**; Kortmann, R.-D.; Glasow, A. (2014): Long-Term Effects of X-Ray Radiation in Combination with Resveratrol on neural Stem Cells in mouse Hippocampal Tissue Cultures. In: *Strahlentherapie und Onkologie* 190 (1), S. 118.

9.5 Danksagungen

Mein besonderer Dank richtet sich an meine Betreuer Herrn Prof. Dr. Jürgen Meixensberger und Herrn Prof. Dr. Frank Gaunitz ohne deren Einsatz die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin danke ich für die fachkundige Betreuung, ergiebigen Diskussionen und die Mischung aus Hilfestellung und Zurückhaltung, was essentiell zu meiner Ausbildung beigetragen hat.

Herrn Rainer Baran-Schmidt möchte ich für die Hilfestellung bei der Durchführung meiner Versuche danken.

Meiner gesamten Familie und meinen Freunden möchte ich für die Unterstützung während meiner Promotion danken.

Meiner Freundin Daniela Franke danke ich für die Unterstützung, Rückhalt und Motivation.