

**Regulation des Energiemetabolismus von Neuronen:  
Die Rolle von Glucose- und Lactattransportern**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

der Doktorin der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

von

**Sandra Mühlenbacher**

Saarbrücken

2025

**Tag des Kolloquiums:** 14.04.2026

**Dekan:** Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Uli Müller

Prof. Dr. Martin van der Laan

**Vorsitz:** Prof. Dr. Karin Römisch

**Akad. Mitglied:** Dr. Frank Hannemann

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Systemische Verteilung und Regulation von Transportern .....</b>	<b>8</b>
1.1.1	Glucosetransporter .....	8
1.1.2	Bekannte Regulationsmechanismen von Glucosetransportern .....	10
1.1.3	Lactattransporter .....	13
<b>1.2</b>	<b>Individuelle Regulation zur Energieversorgung der einzelnen Zelle .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Energieversorgung des Gehirns .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4</b>	<b>Energieversorgung von Neuronen .....</b>	<b>18</b>
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>25</b>
2.1.1	Chemikalien .....	25
2.1.2	Kulturmedium .....	27
2.1.3	Puffer und Lösungen.....	27
2.1.4	Antikörper, Primer und Inhibitoren .....	29
2.1.5	Verbrauchsmaterial .....	30
2.1.6	Geräte .....	31
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>32</b>
2.2.1	Kultivierung und Aussaat der Zellen .....	33
2.2.2	Trypanblaufärbung.....	33
2.2.3	Calcium Imaging.....	35
2.2.4	Quantitative Real Time PCR .....	41
2.2.5	ELISA .....	43
2.2.6	Biotinylierungsassay .....	46
2.2.7	Immunzytochemische Färbung.....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1</b>	<b>Beeinträchtigung der Proliferation durch langfristigen Glucoseentzug .....</b>	<b>52</b>

---

<b>3.2</b>	<b>Langfristige Mangelbehandlungen beeinflussen Transkription und Translation von GLUT1 und MCT1.....</b>	<b>57</b>
<b>3.3</b>	<b>Glutamin und Glucose beeinflussen Glucose- und Lactattransporter über mTORC1 und HIF1<math>\alpha</math> .....</b>	<b>63</b>
3.3.1	AZD 8055 erhöht den GLUT1 Proteingehalt bei Glutamingabe.....	66
3.3.2	Glutamin stabilisiert HIF1 $\alpha$ und Glucose beeinflusst die mTORC1 / S6K1 vermittelte HIF1 $\alpha$ Translation .....	68
3.3.3	mTORC1 vermittelte Translationsmechanismen beeinflussen GLUT1, MCT1 und GLUT3 .....	75
3.3.4	Energiemangel induziert keine Translokation bei GLUT3, GLUT1 oder MCT1 .	90
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>95</b>
<b>4.1</b>	<b>Ausschluss von GLUT4 und MCT2 von weiteren Experimenten.....</b>	<b>95</b>
<b>4.2</b>	<b>SH-SY5Y Zellen regulieren GLUT1, GLUT3 und MCT1 unter langfristigem Glutamin- oder Glucosemangel.....</b>	<b>96</b>
4.2.1	Glutamin reguliert den GLUT1 mRNA Gehalt mittels direkter HIF1 $\alpha$ Stabilisierung .....	97
4.2.2	Glutaminmangel reguliert den Proteingehalt von GLUT1, GLUT3 sowie MCT1 über mTORC1 und 4EBP1 .....	102
4.2.3	Glucosemangel reguliert den GLUT1, GLUT3 und MCT1 Proteingehalt mittels mTORC1 und S6K.....	105
4.2.4	Kombinierter Glutamin- und Glucosemangel reguliert GLUT1, GLUT3 und MCT1 Proteingehalt mittels mTORC1, S6K und 4EBP1 .....	110
<b>4.3</b>	<b>Akuter Glutaminmangel beeinflusst den GLUT1, GLUT3 und MCT1 Proteingehalt über mTORC1 und 4EBP1.....</b>	<b>115</b>
<b>4.4</b>	<b>Keine Translokation von GLUT1, GLUT3 oder MCT1 bei Glutamin- und / oder Glucosemangel .....</b>	<b>116</b>
<b>4.5</b>	<b>Fazit.....</b>	<b>118</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>Appendix.....</b>	<b>121</b>

---

<b>7.1</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>121</b>
<b>7.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>7.3</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>132</b>
<b>7.4</b>	<b>Ergänzende Daten.....</b>	<b>137</b>
7.4.1	Deskriptive Statistik.....	137
7.4.2	Ergänzende Calcium Imaging Experimente .....	208
7.4.3	Ergänzende Immuncytochemische Experimente .....	210
7.4.4	Ergänzende ELISA Experimente .....	215
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>216</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf und akademischer Werdegang .....</b>	<b>218</b>

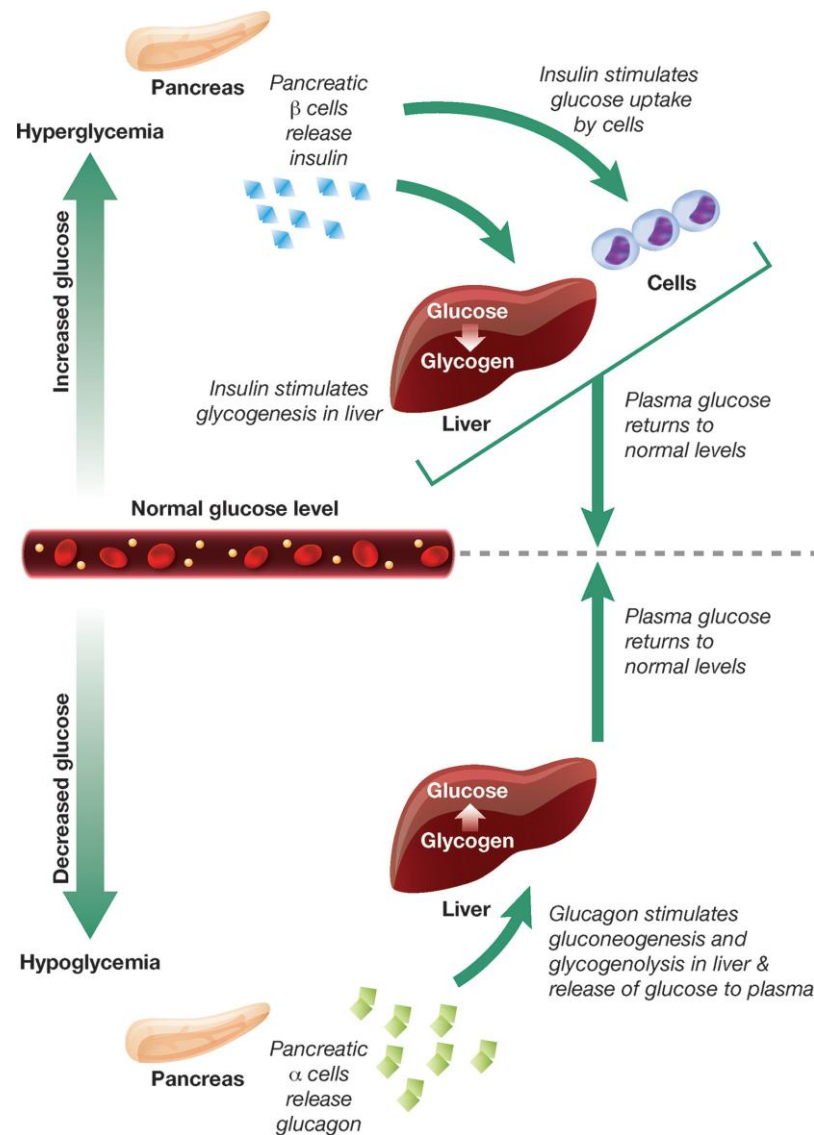
# 1. Einleitung

Zentraler Gegenstand der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchung ist der Transport von Energieträgern *in vitro*. Die Kernfrage ist hierbei, ob eine koordinierte Regulation der Glucose- und Lactattransporter vorliegt. Das Hauptaugenmerk liegt auf Zellen ohne Energiespeicher bei Energiemangel. Im Rahmen dessen werden zunächst jene Transporter auf Transkriptions- und Translationsebene ermittelt, welche durch den systematischen Vorenthalt eines oder mehrerer Energieträgern im verwendeten Modell beeinflusst sind. Anschließend werden die hierfür verantwortlichen Regulationskaskaden durch Verwendung von Inhibitoren ermittelt und untersucht. Abschließend erfolgt die Bearbeitung der Kernfrage, welche Energieträger sich welcher Kaskaden bedienen und welche gemeinsamen oder exklusiven Regulationskaskaden die untersuchten Transporter haben.

Als Energieträger dienen dem menschlichen Körper *in vivo* Nährstoffe wie Zucker, Fettsäuren und Aminosäuren, welche vom Zentralnervensystem auch in ihrer Form als Signalmoleküle genutzt werden können um die Energieversorgung des Organismus zu bewerten. Besonders sensitiv ist das Zentralnervensystem hierbei für Änderungen des Blutglucosespiegels (Sandoval *et al.*, 2008). Zur Aufrechterhaltung der Glucosehomeostase im Körper sind hauptsächlich die Peptidhormone Glucagon und Insulin verantwortlich. Durch Nahrungsaufnahme kommt es zu einem Anstieg der Blutglucosekonzentration (Hyperglykämie), wodurch die Sekretion von Insulin erfolgt, woraufhin die Glucoseaufnahme in die Zellen sowie die Glycogenese induziert wird (Abbildung 1). In Folge dessen werden Glucagonsekretion sowie Glucoseproduktion und Abgabe von freien Fettsäuren gehemmt und die Proteinbiosynthese gesteigert (Sandoval *et al.*, 2008; Hædersdal *et al.*, 2018).

Ein Absinken der Blutglucosekonzentration unter 4 mM (entspricht 72 mg/dL) im menschlichen Blutkreislauf, beispielsweise ausgelöst durch Nahrungsmangel, wird als Hypoglykämie bezeichnet (Amiel *et al.*, 2008; Stanley *et al.*, 2019). Ein Unterschreiten dieses Wertes wird als akutes hypoglykämisches Ereignis bezeichnet, welches zu einem Abfall des Insulinspiegels und zu einer verminderten Epinephrinsekretion führt. Dadurch wird die Aufnahme der Blutglucose in Zellen verringert. Um die Blutglucosekonzentration zu erhöhen, wird in der Leber mittels Glycogenolyse und Gluconeogenese Glucose aus Glycogen produziert und in den Blutkreislauf abgegeben (Abbildung 1). Im Zuge dessen werden

Glucagonsekretion und Glutaminaufnahme gesteigert (Amiel *et al.*, 2008; Rehni and Dave, 2018; Hædersdal *et al.*, 2018).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Blutglucoseregulation bei Hyper- und Hypoglykämie.** Oben: Systemische Regulation bei einer Hyperglykämie. Die  $\beta$  – Zellen des Pankreas sezernieren Insulin, wodurch die überschüssige Blutglukose in Form von Glycogen in der Leber gespeichert oder in Zellen wie Adipozyten importiert wird. Unten: Systemische Regulation bei einem hypoglykämischen Ereignis. Es erfolgt die Sekretion von Glucagon durch die  $\alpha$  – Zellen des Pankreas, wodurch die als Glycogen gespeicherte Glukose aus der Leber in den Blutkreislauf abgegeben wird. Abbildung zitiert aus Hædersdal *et al.*, 2018.

Eine solche Hypoglykämie äußert sich beim Menschen zunächst durch Symptome wie Hunger, kalter Schweiß und Verwirrtheit, bei fortschreitender und ununterbrochener Hypoglykämie folgen Koma und Tod (Rehni and Dave, 2018; Hædersdal *et al.*, 2018).

## 1.1 Systemische Verteilung und Regulation von Transportern

Entscheidend für die Regulation der Glucosehomeostase im Körper sowie für die Energieversorgung von Zellen ist die Aufnahme von Glucose durch die Zellen, was durch sogenannten Glucosetransporter erfolgt. Für alternative Energiequellen wie Lactat und Ketonkörper besitzen Zellen Monocarboxylattransporter. Die Steuerung dieser Einströme erfolgt durch die koordinierte Regulation der zuständigen Transporter. Die Regulation dieser Transporter lässt sich in verschiedene regulatorische Mechanismen und Prozesse untergliedern, hierbei können entweder systemische Signale wie Insulin oder eine zellinterne Verschiebung des AMP Verhältnisses eine Änderung der Glucose- oder Monocarboxylattransporter induzieren. Diese Regulationsprozesse fördern die Expression von Transmembrantransportern hauptsächlich mittels Transkription und Translation. Zusätzlich kann durch Translokation ein relativ schneller Einbau oder Ausbau von Transportern aus Vesikeln in die Zellmembran erfolgen um den Import von Energiequellen wie Glucose und Pyruvat möglichst schnell zu regulieren (Benomar *et al.*, 2006; Mueckler and Thorens, 2013; Hardie, 2014; Perez-Escuredo *et al.*, 2016; Jeon, 2016).

### 1.1.1 Glucosetransporter

Hauptverantwortlich für den Glucose- und Fructosetransport in Zellen sind Transmembranproteine der *SLC2A* Genfamilie, die sogenannten *Facilitated Diffusion Glucose Transporters* (GLUTs) (Mueckler and Thorens, 2013) und der *SLC5* Genfamilie, die sogenannten *Sodium - Linked Glucose Transporters* (SGLTs) (Koekkoek *et al.*, 2017). Zu der *SLC2A* Familie gehören GLUT1 bis GLUT12 sowie GLUT13 (alternativ  $H^+$  / *myo-inositol*

*co-transporter*; HMIT), welche sich durch 12 Transmembrandomänen und ihrer konservierten Aminosäuresequenz auszeichnen. Anhand der Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zueinander werden die Glucosetransporter in drei Klassen unterteilt (Tabelle 1) (Zhao and Keating, 2007; Navale and Paranjape, 2016).

**Tabelle 1: Charakterisierung der *SLC2A* Genfamilie nach Zhao and Keating, 2007.**

	Transporter	$K_m$ [mM]	Gewebe der Hauptexpression
<b>Klasse I</b>	GLUT1	3 - 7	ubiquitär
	GLUT2	17	Leber, Nieren, Dünndarm
	GLUT3	1,4	Gehirn, Nervenzellen
	GLUT4	6,6	Muskulatur, Fettgewebe, Herz
<b>Klasse II</b>	GLUT5	—	Darm, Nieren, Hoden
	GLUT7	0,3	Dünndarm, Kolon, Hoden
	GLUT9	—	Leber, Nieren
	GLUT11	—	Herz, Muskulatur
<b>Klasse III</b>	GLUT6	—	Milz, Leukozyten, Gehirn
	GLUT8	2	Hoden, Blastozysten, Gehirn, Muskulatur, Adipozyten
	GLUT10	0,3	Leber, Pankreas
	GLUT12	—	Herz, Prostata, Brustdrüse
	GLUT13 (HMIT)	—	Gehirn

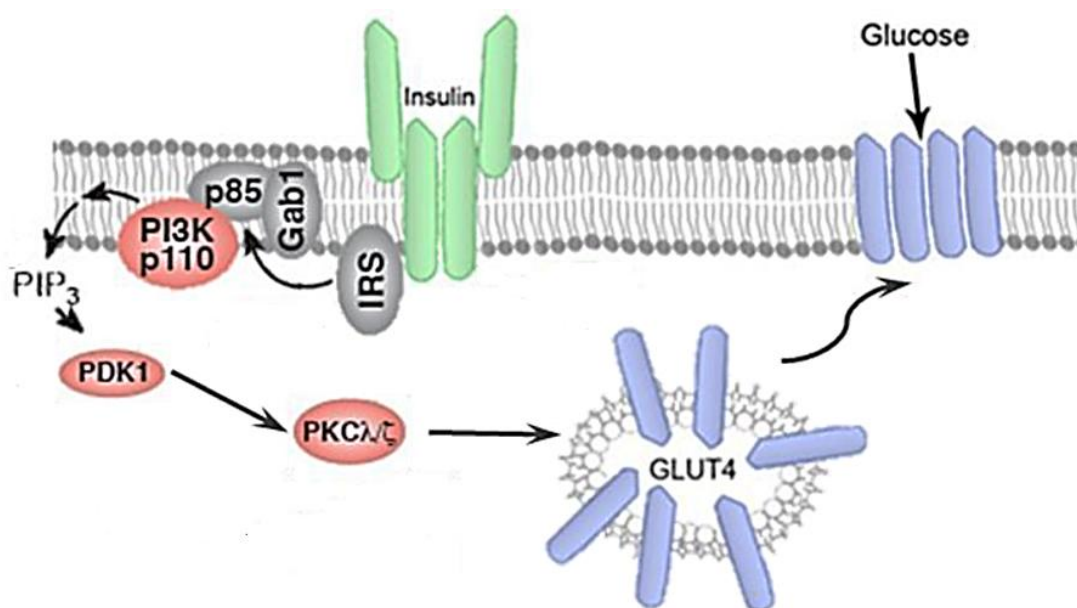
Im Gegensatz zu den SGLTs sind GLUTs keine aktiven Transporter und sind beim Transport von Glucose auch nicht auf Gradienten anderer Moleküle angewiesen, sondern erlauben eine unidirektionale vereinfachte Diffusion entlang des Glucosegradienten. Glucosetransporter können je nach Gewebe zusätzlich die Funktion eines Glucosesensors übernehmen. Klasse I Glucosetransporter haben üblicherweise Glucose als bevorzugtes Substrat, während Transporter der Klasse II eher Fructose transportieren.

Die SGLTs hingegen benötigen einen Natriumgradienten, um Glucose durch die Zellmembran transportieren zu können, dies kann entgegen des Glucosegradienten erfolgen,

Voraussetzung ist, dass der Transport entlang des Natriumgradienten erfolgt (Cura and Carruthers, 2012; Navale and Paranjape, 2016).

### 1.1.2 Bekannte Regulationsmechanismen von Glucosetransportern

Der am ausführlichsten erforschte Regulationsmechanismus ist die GLUT4 Translokation bei insulinempfindlichen Zellen durch ein systemisches Insulinsignal. Wie bereits beschrieben, wird die Glucosehomeostase im Falle einer Hyperglykämie durch den insulinvermittelten Einstrom in Zellen sichergestellt. Dieser Mechanismus ist in Bezug auf Diabetes ausführlich beschrieben, daher ist der insulinabhängige Regulationsmechanismus für GLUT4 bei einem zu hohen Blutglucosespiegel für Zellen mit Insulinrezeptoren bekannt. Dauert ein Insulinstimulus wenige Minuten an, so wird der GLUT4 Gehalt in der Plasmamembran mittels Translokation erhöht, was zu einer verstärkten Glucoseaufnahme führt. Diese Translokation wird über *Insulin Receptor Substrate* (IRS) / Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) vermittelt (Abbildung 2) (Benomar *et al.*, 2006; Amato and Man, 2011).



**Abbildung 2: Insulinvermittelte Prozesse einer Zelle bei Hyperglykämie.** Die Glucoseaufnahme der Zelle wird durch die Translokation von GLUT4 aus Vesikeln in die Zellmembran realisiert. Voraussetzung für diesen Mechanismus ist die Expression von Insulinrezeptoren. Abbildung modifiziert aus Hajiaghaalipour *et al.*, 2015.

Zu den insulinabhängigen Glucosetransportern gehört neben GLUT4 auch GLUT8 (Benomar *et al.*, 2006). Andere Glucosetransporter gelten als insulinunabhängig und können durch Neurotransmitter, metabolischen Stress (Weisova *et al.*, 2009), Verschiebung des AMP / ATP Verhältnisses (Jeon, 2016) oder Hypoxie (Hao *et al.*, 2019) reguliert werden. Die insulinunabhängige Regulation von Glucosetransportern ist vor allem bei Zellen ohne Insulinrezeptoren von Interesse, aber in aktuellen wissenschaftlichen Arbeiten nicht näher beschrieben (vergleiche Tabelle 2). Eine Übersicht der Literatur zeigt beispielsweise, dass die Regulation von GLUT1 überwiegend in Tumoren erforscht wird. Hierbei konnten in den Arbeiten von Hao *et al.*, 2019, Kappler *et al.*, 2012 und Wincewicz *et al.*, 2007 GLUT1 Überexpressionen in verschiedenen Tumorarten nachgewiesen werden, welche mit HIF1 als Teil einer unbekanntenen Regulationskaskade in Zusammenhang stehen. Als Grund hierfür wird der gesteigerte Energiebedarf eines schnell proliferierenden Tumors angenommen, welcher vermutlich nicht mehr durch Glycolyse gedeckt werden kann (Kappler *et al.*, 2019).

Die Regulation von GLUT3 wird hauptsächlich in Neuronen untersucht. Hierbei steht vor allem ein gesteigerter Energiebedarf durch neuronale Aktivität, bei der Zelldifferenzierung während der Gehirnentwicklung oder durch Tumorproliferation im Vordergrund. Auffällig ist die große Uneinigkeit über die beteiligten Regulatoren, so führt Agostini *et al.*, 2016 die GLUT3 Transkription auf mTOR zurück, während Kappler *et al.*, 2012 in Tumoren HIF1 verantwortlich macht. Auch für den GLUT3 Translokationsmechanismus gibt es unterschiedliche Hypothesen von Ferreira *et al.*, 2011 und Weisova *et al.*, 2009.

Des Weiteren wird Glucosemangel oftmals im Zusammenhang mit Hypoxie untersucht. Als Hypoxie wird die Sauerstoffversorgung einer Zelle bezeichnet, welche den Bedarf der Zelle nicht decken kann Dengler, 2020. *In vivo* werden solche Hypoxien oftmals durch Ischämien verursacht, wodurch auch eine Mangelversorgung mit Energieträgern auftritt. Dies ist besonders für Organe wie Herz und Gehirn dramatisch, da diese Gewebe durch Mangelversorgung innerhalb kurzer Zeit Schaden nehmen. Daher beschäftigen sich Arbeiten wie Ding *et al.*, 2018, Guo *et al.*, 2008 und Ramamoorthy and Shi, 2014 zwar mit kombiniertem Sauerstoff- und Glucosemangel in Neuronen, jedoch ohne auf die Glucosetransporter einzugehen.

**Tabelle 2: Exemplarische Auflistung verwandter wissenschaftlicher Arbeiten im Bereich Regulation Energieversorgung von Zellen.** Im Vordergrund steht die Methodik der Arbeiten, wie, Versuchsobjekt, welches Protein als Regulator agiert und welchem übergeordneten Themengebiet die Arbeit angehört.

<b>Transporter</b>	<b>Arbeit</b>	<b>Versuchs- organismus</b>	<b>Regulator</b>	<b>Thema</b>
<b>GLUT1</b>	Barnes <i>et al.</i> , 2002	Leber Zelllinie	AMPK	Osmotischer Stress
	Hao <i>et al.</i> , 2019	Magenkarzinom Biopsien	HIF1	Korrelation HIF GLUT1
	Kappler <i>et al.</i> , 2012	MDA-MB-231 XF354	HIF1	Tumor
	Wincewicz <i>et al.</i> , 2007	Colorektales Karzinom Biopsien	HIF1	Tumor
<b>GLUT3</b>	Agostini <i>et al.</i> , 2016	Primäre Neurone	mTOR	Differenzierung
	Benomar <i>et al.</i> , 2006	SH-SY5Y	PI3K	Insulinsensitivität
	Ferreira <i>et al.</i> , 2011	Primäre Neurone HEK293T MDCK	nNOS	Glutamat
	Kappler <i>et al.</i> , 2012	MDA-MB-231 XF354	HIF1	Tumor
	Weisova <i>et al.</i> , 2009	Primäre Neurone	AMPK	Glutamat
<b>GLUT4</b>	Benomar <i>et al.</i> , 2006	SH-SY5Y	PI3K	Insulinsensitivität
<b>Ohne Transporter</b>	Ding <i>et al.</i> , 2018	SH-SY5Y	mTOR	Hypoxie, Glucose
	Guo <i>et al.</i> , 2008	Primäre Neurone	HIF1	Hypoxie, Glucose
	Ramamoorthy and Shi, 2014	Primäre Neurone	HIF1	Hypoxie, Glucose
	Suryawan and Davis, 2018	<i>In vivo</i> Schwein	mTOR	Aminosäure, Insulin

### 1.1.3 Lactattransporter

Zusätzlich zu den bereits genannten Glucosetransportern werden zur Energieversorgung auch *Monocarboxylate Transporters* (MCTs) genutzt. Von den 14 bisher bekannten Transportern dieser *SLC16A* Genfamilie sind MCT1 bis MCT4 mit dem passiven Transmembrantransport verschiedener Metaboliten wie Lactat, Pyruvat oder Ketonkörpern von besonderer Bedeutung. Für ihre Funktionalität müssen diese Proteine mit einem Chaperon wie Basigin (CD147) oder Embigin (gp70) interagieren können (Pierre and Pellerin, 2005; Halestrap and Wilson, 2012; Perez-Escuredo *et al.*, 2016).

MCT1 kommt nahezu in jedem Gewebe vor (vergleiche Tabelle 3), vor allem in Muskelzellen, Kardiomyozyten und Hepatozyten. Im Gastrointestinaltrakt, in Assoziation mit Epithelzellen, dient MCT1 sowohl der Aufnahme von Monocarboxylaten aus dem Lumen als auch deren Abgabe in das Blut, wobei der Transport von Lactat passiv und bidirektional erfolgt (Halestrap and Meredith, 2004; Perez-Escuredo *et al.*, 2016).

**Tabelle 3: Charakterisierung und Gewebeexpression der *SLC16A* Genfamilie nach Halestrap and Meredith, 2004; Pierre and Pellerin, 2005; Perez-Escuredo *et al.*, 2016.**

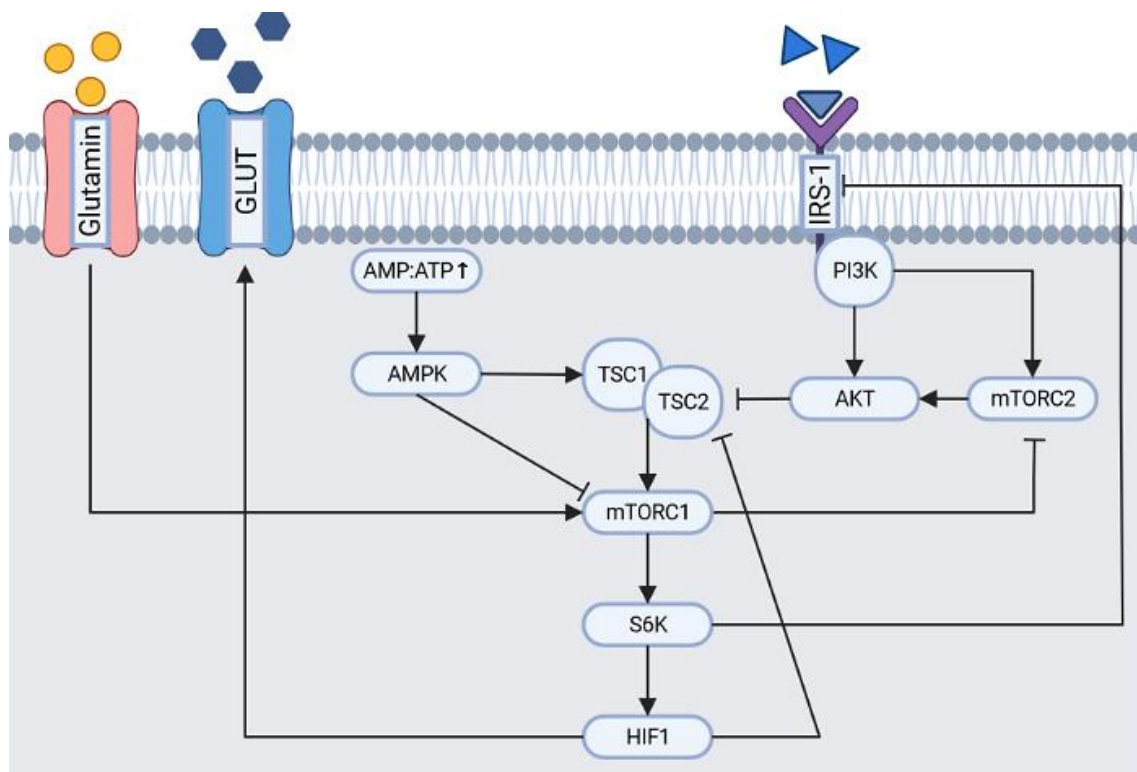
<b>Transporter</b>	<b>Km [mM]</b>	<b>Lactat</b>	<b>Gewebe der Hauptexpression</b>
<b>MCT1</b>	0,7 – 12		Ubiquitär
<b>MCT2</b>	0,1 – 0,7		Nieren, Gehirn, Neurone
<b>MCT3</b>	5 - 6		Pigmentepithel der Retina, Plexus chorioideus
<b>MCT4</b>	22 - 28		Skelettmuskulatur, Chondrozyten, Leukozyten, Hoden, Lunge, Placenta, Herz, Astrozyten
<b>MCT5</b>	—		Gehirn, Muskulatur, Leber, Nieren, Lunge, Ovarien, Placenta, Herz
<b>MCT6</b>	—		Nieren, Muskulatur, Gehirn, Herz, Pankreas, Prostata, Lunge, Placenta
<b>MCT7</b>	—		Gehirn, Pankreas, Muskulatur
<b>MCT8</b>	—		Leber, Herz, Gehirn, Thymus, Darm, Ovarien, Prostata, Pankreas, Placenta
<b>MCT9</b>	—		Endometrium, Hoden, Ovarien, Brustgewebe, Gehirn, Nieren, Nebennieren, Retina
<b>TAT1</b>	0,75 – 2,3		Nieren, Darm, Muskulatur, Placenta, Herz
<b>MCT11</b>	—		Haut, Lunge, Ovarien, Brustgewebe, Pankreas, Pigmentepithel der Retina, Plexus chorioideus
<b>MCT12</b>	—		Nieren
<b>MCT13</b>	—		Brustgewebe, Stammzellen des Knochenmarks
<b>MCT14</b>	—		Gehirn, Herz, Ovarien, Brustgewebe, Lunge, Pankreas, Pigmentepithel der Retina, Plexus chorioideus

## 1.2 Individuelle Regulation zur Energieversorgung der einzelnen Zelle

Der einzelnen Zelle selbst stehen ebenfalls Prozesse und Mechanismen zur Verfügung, um autark ihren energetischen Status zu ermitteln und ihre Energieversorgung zu regulieren. Die drei bekanntesten Enzyme hierfür sind AMPK, mTOR und HIF (Guo *et al.*, 2008; Amato and Man, 2011; Hardie, 2014).

Als Hauptregulator und Energiesensor ist die *AMP - activated protein kinase* (AMPK) von zentraler Bedeutung in allen eukaryotischen Zellen (Amato and Man, 2011). Der energetische Zustand einer Zelle wird durch die AMPK anhand des AMP / ATP Verhältnisses ermittelt. Verschiebt sich dieses Verhältnis zugunsten von AMP oder sinkt die ATP Konzentration der Zelle ab, so ist dies ein Indikator dafür, dass viel ATP in der Zelle verbraucht wurde. Daraufhin wird die AMPK aktiviert, um mehr Energie in Form von ATP bereitzustellen, was ihr über die Aktivierung katabolischer und die Abschaltung anabolischer Prozesse gelingt (Barnes *et al.*, 2002; Towler and Hardie, 2007; Amato and Man, 2011; Hardie, 2014).

Zusätzlich beeinflusst der energetische Status der Zelle über AMPK als „Energiesensor“ *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) (Zheng *et al.*, 2016). Obwohl mTOR, aufgrund seiner direkten Beeinflussbarkeit durch Aminosäuren, vornehmlich als „Glutaminsensor“ der Zelle angesehen wird, dient der mTOR Komplex 1 (mTORC1, RAPTOR), neben dem Verarbeiten der Signale von Aminosäuren, auch der allgemeinen Energieversorgung der Zelle (Dibble *et al.*, 2009; Suryawan and Davis, 2018; Bernfeld *et al.*, 2018). In einigen der bisherigen Arbeiten wird die Hypothese aufgestellt, dass mTORC1 mittels Phosphorylierung des Insulinrezeptors über S6K dessen Signalweiterleitung reguliert und somit als Gegenspieler der AMPK agiert (Abbildung 3). Ebenfalls ist ungeklärt, wie und ob diese Feedbackschleife ebenfalls in Zellen ohne Insulinrezeptor besteht. Im gleichen Zusammenhang ist auch die Beteiligung von mTOR Komplex 2 (mTORC2, RICTOR) über AKT in diesem Signalweg nachgewiesen, aber wodurch dieser Komplex aktiviert oder inhibiert wird ist weitestgehend unbekannt (Dibble *et al.*, 2009; Julien *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2018). Es liegt der begründete Verdacht vor, dass mTORC2 zusammen mit mTORC1 dazu beiträgt, Zellen die Adaption an Energiemangel zu ermöglichen (Hua *et al.*, 2019).



**Abbildung 3: Schematischer Überblick<sup>1</sup> der Verschaltung von AMPK, mTOR und HIF1.** Bei eingehendem systemischen Insulinsignal werden mTORC2, AKT und mTORC1 aktiviert, wobei mTORC1 negativ regulatorisch auf mTORC2 wirkt. Durch mTORC1 wird die S6 Kinase aktiviert, welche die Translation von HIF1 $\alpha$  steigert. Im Falle eines zellulären Energiemangels wird die AMPK aktiviert, welche mTORC1 inhibiert. Abbildung modifiziert aus Semenza, 2010; Altomare and Khaled, 2012; Zheng *et al.*, 2016; Ardestani *et al.*, 2018; Mirabilii *et al.*, 2020; Moldogazieva *et al.*, 2020.

Durch AMPK und mTOR wird auch der *hypoxia inducible factor* (HIF) beeinflusst (Moldogazieva *et al.*, 2020). Obwohl HIF vor allem eine mit Hypoxie und Ischämie assoziierte Transkriptionsfaktorfamilie aus drei bekannten Faktoren (HIF1 – HIF3) ist, lässt sich HIF1 auch durch extrazelluläre Glucosekonzentrationen in Kombination mit Hypoxie oder sogar unter normoxischen Bedingungen aktivieren. Aus diesem Umstand ergibt sich die bisher unbestätigte Hypothese, dass auch HIF1 an der Regulation der Energieversorgung von Zellen beteiligt ist (Guo *et al.*, 2008; Kappler *et al.*, 2019).

<sup>1</sup>Grafik erstellt mit BioRender.com

### 1.3 Energieversorgung des Gehirns

Das Gehirn ist einer der größten Energieverbraucher des menschlichen Körpers (Amato and Man, 2011). Bei Normoglykämie sowie milder oder moderater Hypoglykämie ist Glucose der Hauptenergieträger des menschlichen Gehirns. Bei Menschen ohne Vorerkrankungen hat eine 24 stündige Hypoglykämie keinen Effekt auf Glucoseaufnahme oder Glucoseverbrauch des Gehirns. Erst durch wiederholte hypoglykämische oder länger als 24 Stunden anhaltende Ereignisse, wird der Glucoseverbrauch des Gehirns verringert. Die Glucosekonzentration im Extrazellularraum des Gehirns liegt beim Menschen physiologisch zwischen 2,5 mM (45 mg/dL) und 5 mM (90 mg/dL). Da ein linearer Zusammenhang zwischen Blutglucosekonzentration und der Glucosekonzentration im Extrazellularraum besteht, würde eine Blutglucosekonzentration von weniger als 2,1 mM (entspricht 38 mg/dL) zum Zusammenbruch der Glucoseversorgung von Nerven- und Gliazellen führen (Rehni and Dave, 2018; Stanley *et al.*, 2019).

Daher ist Glycogen in Astrozyten in Form von cytoplasmatischen, elektronendichten, isodiametrischen  $\beta$ -Partikeln gespeichert, vor allem in Bereichen mit hoher neuronaler synaptischer Dichte. Dieser Glycogenspeicher ist jedoch im Vergleich zu den Glycogenspeichern in Muskulatur und Leber gering, dient aber zur Energieversorgung bei gesteigerter neuronaler Aktivität. Unter Glucosemangel oder bei gesteigerter synaptischer Aktivität wird das Glycogen der Astrocyten durch eine gehirnspezifische Isoform der Glycogenphosphorylase gespalten und in Form von Lactat zur Energieversorgung der Neurone genutzt, da diese selbst über kein Glycogen als Energiespeicher verfügen. In Folge dessen nimmt mit sinkendem Glycogenspiegel die Aktivität der Neurone im Gehirn ab (Dringen *et al.*, 1993; Pellegrini *et al.*, 1996; Falkowska *et al.*, 2015; Rehni and Dave, 2018). Entsteht ein Glucosemangel durch gesteigerte neuronale Aktivität, so erfolgt eine neurotransmitterinduzierte Vasodilatation, welche den zerebralen Blutfluss im betroffenen Bereich erhöht, um den Energiemangel durch systemisch verfügbare Energieträger zu kompensieren. Durch einen Glucosemangel wird außerdem die Monocarboxylataufnahme über die Blut-Hirn-Schranke gesteigert, wodurch auch Pyruvat den Neuronen als Energieträger zur Verfügung steht (Dringen *et al.*, 1993; Pellegrini *et al.*, 1996; Falkowska *et al.*, 2015; Rehni and Dave, 2018). Zudem geht Bergersen, 2015 davon aus, dass bei gesteigertem Energiebedarf durch neuronale Aktivität intrazelluläre MCTs des Kapillarendothels der Blut-Hirn-Schranke in deren Plasmamembran transloziert werden

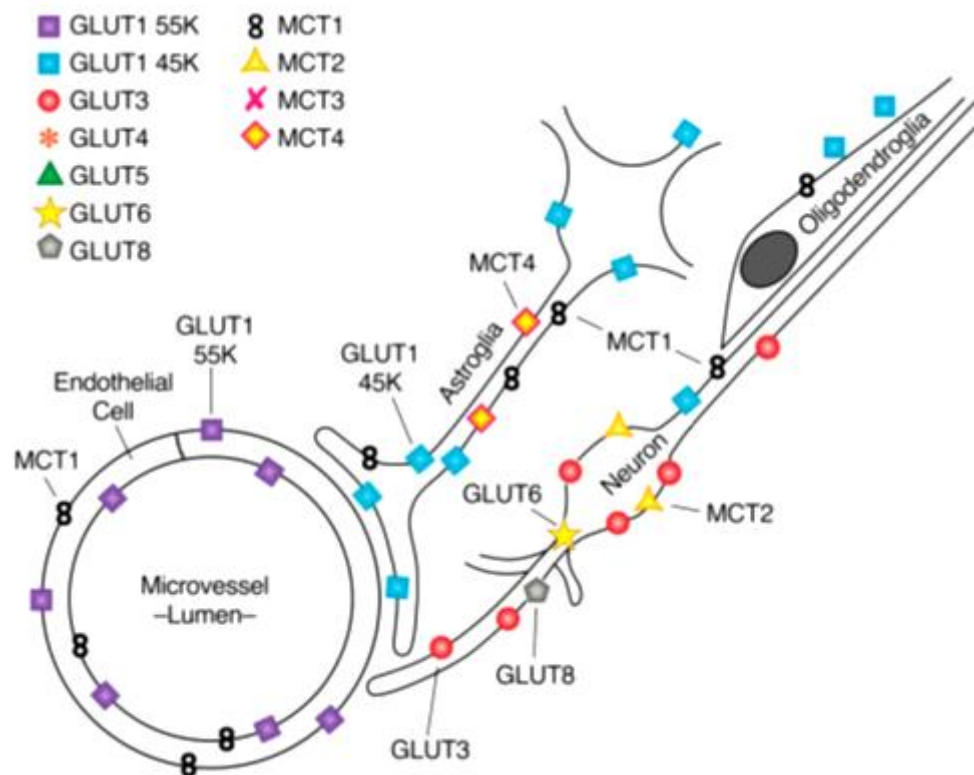
können, um so den Lactatimport für Astrozyten und Neurone zu erhöhen. Steht wieder ausreichend Glucose zur Verfügung, werden die Glycogenspeicher der Astrozyten zeitnah wieder aufgefüllt und während dessen wird Glutamin als Energieträger in Neuronen genutzt (McKenna, 2007; Agostini *et al.*, 2016).

## 1.4 Energieversorgung von Neuronen

Lactat und Ketone dienen im Falle einer Hypoglykämie oder einer gesteigerten synaptischen Aktivität Neuronen als zusätzliche oder alternative Energieträger für Glucose. Des Weiteren wird in Bergersen, 2015 die Hypothese diskutiert, dass die Aktivierung des Lactatrezeptors *HCAR1* Einfluss auf die neuronale Aktivität und dadurch auf den Energieverbrauch von Neuronen nimmt, der exakte Mechanismus ist jedoch bisher nicht bekannt. Zwar können Lactat und Ketone die Funktion von Neuronen vorübergehend sicherstellen, aber längerfristig Glucose nicht vollständig ersetzen (Falkowska *et al.*, 2015; Bergersen, 2015; Rehni and Dave, 2018). Dies ist vor allem bei dem Krankheitsbild des *Glucose transporter type 1 deficiency syndrome* (auch *De Vivo Krankheit* oder kurz *GLUT1 DS* genannt) zu beobachten. Hierbei verhindern Mutationen des *SLC2A1* Gens, dass GLUT1 Glucose über die Blut-Hirn-Schranke transportieren kann. Jedoch ermöglicht eine ketogene Diät das Überleben der Patienten, wenn auch mit Symptomen wie Krampfanfällen, Mikrozephalie und Bewegungsstörungen (Kramer and Smith, 2021).

Darüberhinaus können Neurone im Falle einer Hypoglykämie und dem daraus resultierenden Mangel an Glucose und Pyruvat auch Glutamin und Glutamat als Energiequelle nutzen. Hierbei wird Glutamin stufenweise im Citratzyklus oxidiert und verlässt diesen zunächst in Form von Malat. Zur vollständigen Oxidation muss dies zu Pyruvat weiter metabolisiert werden und erneut den Citratzyklus durchlaufen (McKenna, 2007; Amaral *et al.*, 2011). Nach bisherigem Kenntnisstand ist hierbei die Regulationskaskade PI3K / AKT / mTOR von zentraler Bedeutung bei gesteigertem Energiebedarf. Welche molekularen Mechanismen die Wahl des Energieträgers bestimmen, ist bislang nicht bekannt (McKenna, 2007; Agostini *et al.*, 2016; Divakaruni *et al.*, 2017).

Zum Import von Energiequellen wie Glucose dienen den Neuronen, wie allen anderen Zellen des Körpers, die Glucose- (GLUTs) und Monocarboxylattransporter (MCTs). Von den 14 bisher bekannten Mitgliedern der diffusionsgetriebenen *SLC2A* Transporterfamilie ist vor allem GLUT3 aufgrund seiner dominanten Rolle im Glucosetransport von Neuronen (Abbildung 4) und seiner hohen Affinität zu Glucose von Interesse (Mueckler and Thorens, 2013; Navale and Paranjape, 2016; Koekkoek *et al.*, 2017). Von den Monocarboxylattransportern findet sich vor allem MCT2 an Neuronen zum Import von Lactat (Simpson *et al.*, 2007).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Verteilung von Glucose- und Lactattransportern im Säugetiergehirn (Abbildung nach Simpson *et al.*, 2007). Die Transporter GLUT1 (55kD Isoform) und MCT1 vermitteln den Transport von Energieträgern aus dem Blut über die Blut-Hirn-Schranke. Während Gliazellen Glucose hauptsächlich über GLUT1 (45 kD Isoform) importieren, besitzen Neurone hierfür den hoch affinen GLUT3.

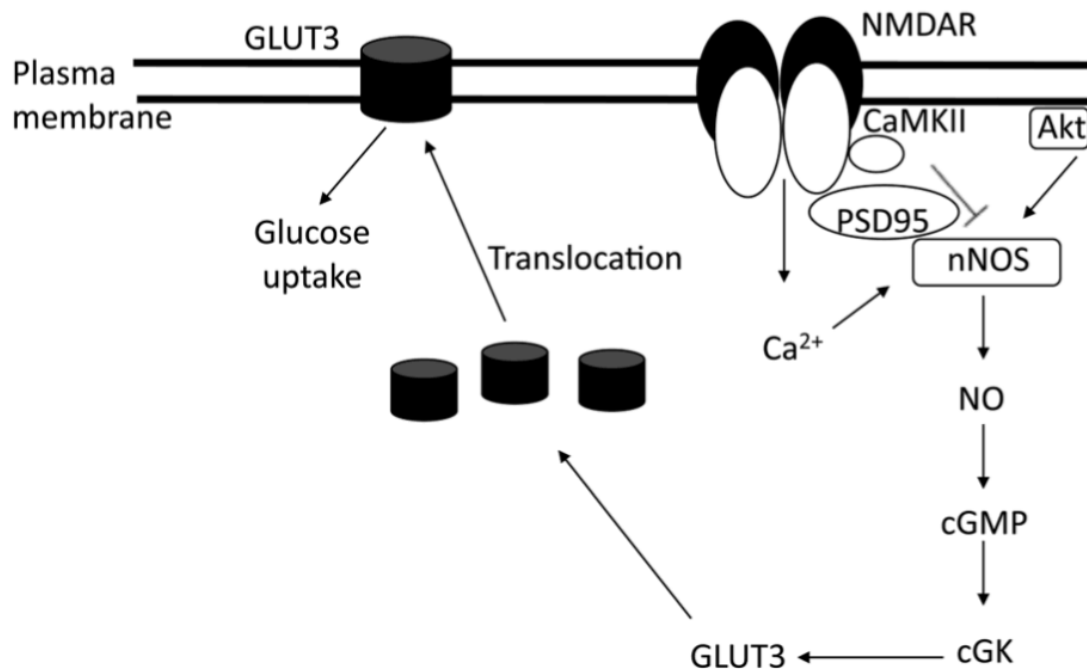
Neben dem diffusionsgetriebenen Transmembrantransport von Glucose existieren auch *Sodium - Linked Glucose Transporters* (SGLTs). Von dieser Transporterfamilie sind bisher

sechs Mitglieder identifiziert worden, wovon alle bis auf SGLT5 auch im Gehirn nachgewiesen werden konnten (Koekkoek *et al.*, 2017).

In vielen bisherigen Arbeiten über Glucosetransporter sind nur wenige Mechanismen zur Energieversorgung in Neuronen etabliert (Tabelle 2). Verschiedene Regulationsmechanismen von Neuronen sind im aktuellen Forschungsstand lediglich für Einzelfälle in spezialisierten Teilgebieten beschrieben, zum Beispiel Insulinsensitivität (Benomar *et al.*, 2006), Hypoxie (Guo *et al.*, 2008; Ramamoorthy and Shi, 2014; Ding *et al.*, 2018), Gehirnentwicklung (Ferreira *et al.*, 2011) oder Glutamatstimulation (Weisova *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011). Des Weiteren nutzen diese Arbeiten unterschiedlichste Zellen als Versuchsorganismen, was die Allgemeingültigkeit dieser Ergebnisse in Frage stellt. Außerdem sind die Versuchsparameter oft nur unscharf oder nicht definiert. In für diese Arbeit relevanten Bereichen sind Parameter wie Glucose- und Glutaminkonzentrationen oder Versuchszeiträume dementsprechend oft unbekannt. Zudem bedienen sich Arbeiten oftmals Gehirnschnitten (Divakaruni *et al.*, 2017) oder *in vivo* Studien (Guo *et al.*, 2008; Suryawan and Davis, 2018; Hao *et al.*, 2019), derartige Versuchsaufbauten erlauben keine Rückschlüsse auf den Beitrag von Neuronen zur Energieversorgung.

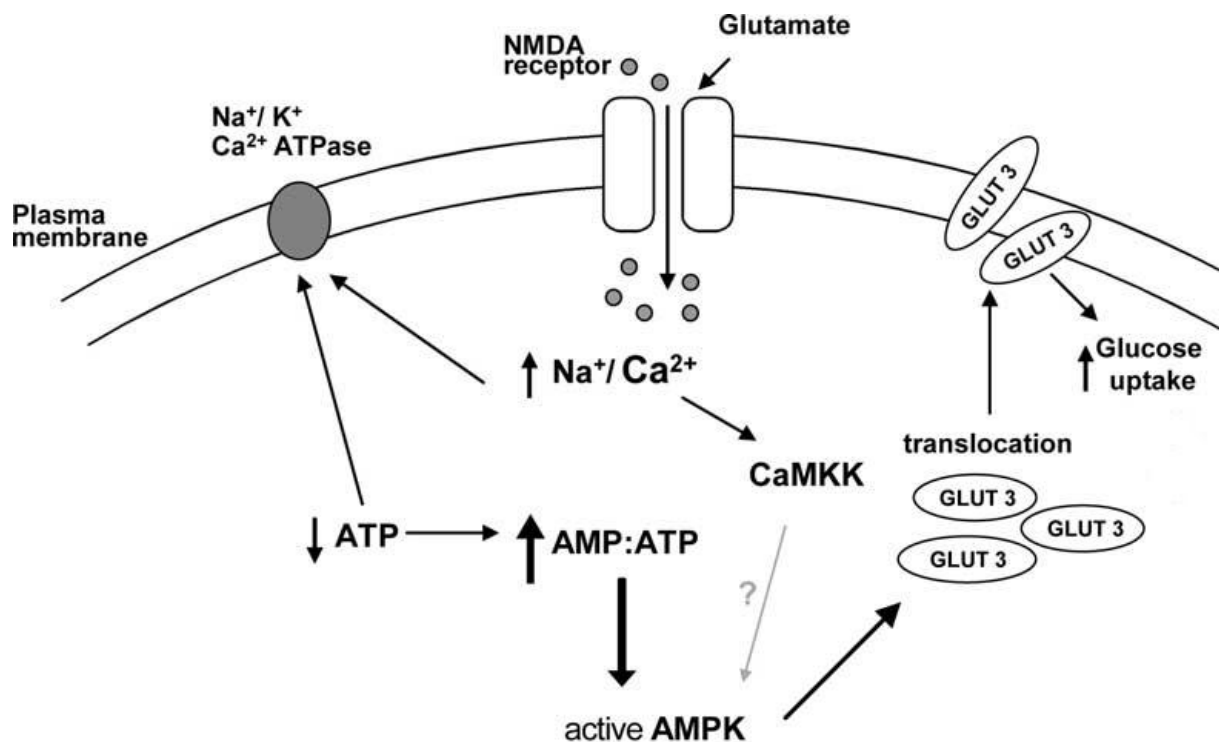
Glutamat ist als wichtigster erregender Neurotransmitter von besonderer Bedeutung für das menschliche Gehirn. Durch die Bindung von Glutamat an NMDA Rezeptoren kommt es zur neuronalen Aktivität und einem gesteigerten Energiebedarf der Neurone (McKenna, 2007). Der zugehörige Regulationsmechanismus dieser Neuronen ist bisher kontrovers beschrieben. So besteht beispielsweise Einigkeit bei der Beobachtung, dass in Körnerzellen des *stratum granulosum* und in Neuronen des Hippocampus durch synaptische Aktivität vermehrt GLUT3 in die Plasmamembran eingebaut wird, was zu einem gesteigerten Glucoseimport in die Zelle führt (Weisova *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011). Der diesem Regulationsprozess zu Grunde liegende Mechanismus konnte bisher nicht exakt geklärt werden. Daher finden sich im aktuellen Forschungsstand mehrere konkurrierende Hypothesen, von denen die relevantesten zwei in Folge näher vorgestellt werden.

So geht Ferreira *et al.*, 2011 davon aus, dass für diesen Einbau eine Phosphorylierung von nNOS durch AKT Voraussetzung ist (Abbildung 5). Erst dadurch sei eine Translokation von GLUT3 mittels Cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) möglich.



**Abbildung 5: Hypothetischer Translokationsmechanismus von GLUT3 nach Ferreira *et al.*, 2011.** Durch einen NMDA Rezeptor vermittelten Calciumeinstrom und einer Phosphorylierung durch AKT wird nNOS aktiviert. Dies führt zu einer NO Produktion was, laut Hypothese von Ferreira *et al.*, 2011, über cGMP eine GLUT3 Translokation in die Zellmembran vermittelt.

Eine ähnliche Hypothese von Weisova *et al.*, 2009 führt die GLUT3 Translokation auf eine Verschiebung des AMP:ATP Verhältnisses bei neuronaler Aktivität zurück, was in diesem Fall eine Aktivierung der AMPK zur Folge hat (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Hypothetischer Translokationsmechanismus von GLUT3 nach Weisova *et al.*, 2009.** Im Gegensatz zu (Ferreira *et al.*, 2011) ist hier das AMP:ATP Verhältnis und eine aktive AMPK für die Translokation entscheidend. Jedoch ist die Rolle des Calciumeinstroms und dessen Zusammenhang mit der AMPK nicht geklärt.

Inwiefern einer dieser Mechanismen auf andere Glucosetransporter, Rezeptoren oder Neurotransmitter übertragbar ist, oder ob sich Neurone anderer Mechanismen bedienen, ist unklar. Ebenfalls ist bislang nicht bekannt, ob eine solche Regulation bei Glucosemangel ohne gesteigerte neuronale Aktivität vorliegt.

Ähnliches zeigt sich für die Regulation von Monocarboxylattransportern. So ist bekannt, dass die Translation von MCT2 in Neuronen durch Wachstumsfaktoren über AKT / mTOR / S6K induziert wird (Robinet and Pellerin, 2010). Fraglich erscheint, ob dies auch bei Energiemangel der Fall ist, dies wurde bisher nicht an Neuronen gezeigt, aber an nicht neuronalen Zelllinien konnte unter Glucosemangel eine erhöhte Expression von MCT1 und MCT4 festgestellt werden. Der exakte Regulationsprozess ist bisher unbekannt (Marín-Hernández *et al.*, 2014).

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Verständnis der individuellen Energieversorgung von Neuronen ist von zentraler Bedeutung, da die zellulären Regulationsmechanismen zur Energieversorgung, AMPK und mTOR, in Zusammenhang mit der Amyloid  $\beta$  Produktion in Morbus Alzheimer, verschiedenen Formen von Epilepsie und Autismus stehen und der Zusammenhang mit anderen neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Parkinson oder Chorea Huntington nicht ausgeschlossen werden kann (Amato and Man, 2011; Hardie, 2014; Polchi *et al.*, 2018). Da bekannt ist, dass von Energiemangel betroffene Neurone Glucose, Pyruvat und Glutamin zur Energiegewinnung nutzen können (Agostini *et al.* 2016; Bergersen 2015; Divakaruni *et al.* 2017; Falkowska *et al.* 2015; McKenna 2007; Rehni and Dave 2018), bildet die Beobachtung dieser drei Energieträger einen wichtigen Kernpunkt dieser Arbeit.

Bei den wissenschaftlichen Veröffentlichungen, auf die sich diese Arbeit stützt (Tabelle 2), handelt es sich überwiegend um Untersuchungen, welche die wenigen etablierten Mechanismen zur Regulation der neuronalen Energieversorgung vor dem Hintergrund von Hypoxie, Glutamatstimulation und Tumorerkrankungen beschreiben. Dabei wurde Glucosemangel und dessen Auswirkungen bei neuronalen Zellen fast ausschließlich bei zeitgleicher Hypoxie betrachtet (Guo *et al.*, 2008; Ramamoorthy and Shi, 2014; Ding *et al.*, 2018; Kourti *et al.*, 2022). Hierbei reichen die Versuchszeiträume des Glucoseentzugs mit Hypoxie von drei Stunden bei primären Neuronen (Guo *et al.*, 2008) bis hin zu 24 Stunden bei SH-SY5Y Zellen (Kourti *et al.*, 2022). Allerdings werden in diesen Arbeiten keine Glucosetransporter untersucht. Jene Veröffentlichungen, die sich mit Glucosetransportern in Neuronen beschäftigen sich meist mit GLUT3 und dessen Glutamat induzierter Translokation. Hierbei wird durch die Gabe des Neurotransmitters ein akut erhöhter Energiebedarf der Zelle induziert, aber kein Energieträger systematisch vorenthalten (Weisova *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011). Die Untersuchung der Auswirkungen eines Glutaminentzugs wird meist im Rahmen von Tumorerkrankungen durchgeführt. Als zeitlicher Rahmen werden 24 bis 72 Stunden angesetzt, jedoch haben die verwendeten Zelllinien keinen neuronalen Ursprung (Bernfeld *et al.*, 2018; Kappler *et al.*, 2019). Zwar werden in Tumoren teilweise auch GLUT1 und GLUT3 untersucht, allerdings hinsichtlich einer möglichen Markerfunktion für Tumormalignität, welche mit Hypoxie in soliden Tumoren assoziiert ist (Wincewicz *et al.*, 2007; Hao *et al.*, 2019; Kappler *et al.*, 2019). Diese Primärzellen sind aber

oftmals aus im Gastrointestinaltrakt lokalisieren Tumoren gewonnen und nicht neuronaler Natur.

Daher ist es Ziel dieser Arbeit, die Regulation verschiedener Glucose- und Monocarboxylattransporter unter verschiedenen Mangelbedingungen in einer neuronalen Zelllinie zu untersuchen und dadurch eine mögliche übergeordnete Koordination verschiedener Regulationsmechanismen und –prozesse in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der Energieträger nachzuweisen.

Hierfür werden im experimentellen Aufbau Zellen der SH-SY5Y Linie verwendet, da diese ein etabliertes *in vitro* Modell für neuronale Zellen darstellen (Dravid *et al.*, 2021). Glucose, Pyruvat und Glutamin können zur Energiegewinnung genutzt werden (Agostini *et al.* 2016; Bergersen 2015; Divakaruni *et al.* 2017; Falkowska *et al.* 2015; McKenna 2007; Rehni and Dave 2018), daher werden in den Experimenten ein oder zwei dieser Energieträger systematisch entzogen. In bisherigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen werden unterschiedlichste Versuchszeiträume betrachtet, je nach Energieträger und verwendeten Zellen. Daher wird zum einen der Versuchszeitraum von drei Stunden betrachtet, da dieser für den Glucoseentzug bei primären Neuronen in der Literatur beschrieben ist (Guo *et al.*, 2008). Zum anderen wird der Versuchszeitraum von 24 Stunden untersucht, da dieser in der Literatur sowohl bei Glucoseentzug in SH-SY5Y Zellen beschrieben ist (Kourti *et al.*, 2022) als auch bei der Untersuchung von Glutaminentzug in Tumorzellen genannt ist (Bernfeld *et al.*, 2018).

Auf dieser experimentellen Basis wird ermittelt ob, und falls ja welche Glucose- oder Monocarboxylattransporter Veränderungen in Menge oder Lokalisation zeigen, um zu bestimmen ob es sich um einen Transkriptions- / Translations- oder Translokationsmechanismus handelt. Mittels Inhibitoren werden anschließend AMPK, mTOR und HIF1 als potentielle Teile der betroffenen Regulationskaskaden untersucht, um zu ermitteln, ob die Transporter

- durch eine oder mehrere dieser Regulationskaskaden beeinflusst werden
- abhängig vom Energieträger sind oder durch den generellen Energiemangel der Zelle reguliert werden
- eine Zeitabhängigkeit besitzen
- auf einen Mechanismus beschränkt sind oder nach Bedarf zwischen Transkription/Translation und Translokation wechseln können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Referenznummer	Hersteller
Acetylcholin Chlorid	L02168	Alfa Aesar
Avidin	A-9275	Sigma
B-12	T915.1	Roth
Biotin	B5161	Sigma
BSA (Bovines Serum Albumin)	BSA-1S	Capricorn Scientific
CaCl <sub>2</sub> •H <sub>2</sub> O (Calciumchlorid)	22328.262	VWR
D-(+)-Glucose (steril, 100 g/L)	G8644-100ML	Sigma
DEPC Wasser	T143.4	Carl Roth
D-Glucose (Feststoff)	700751	z-Chem
DMEM Low Glucose	31885023	Gibco
DMEM No Glucose	A1443001	Gibco
DMSO (Dimethylsulphoxid)	702530	z-Chem
EDTA	80043.2	Roth
EGTA	8B000366	Appli Chem
Ethanol 99%	1170	z-Chem
Ethanol (unvergällt)	14146.01000	Morphisto
EVA Green	27490	Axon
FCS (Fetal Calf Serum)	1008247	Gibco
Fluo-4-AM	F14201	Invitrogen
Glycin	10119CU	VWR
Glycogen	R0551	Thermo Scientific
HEPES	9105.4	Carl Roth
Isopropanol	19516	Merck
KCl (Kaliumchlorid)	0064859	Merck

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12017	Grüssing
L-Glutamin (steril, 200 mM)	17-605F	Lonza
MgCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O (Magnesiumchlorid Hexahydrat)	5833	Merck
NaCl (Natriumchlorid)	121231000U	Grüssing
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	121491000U	Grüssing
Natriumpyruvat (steril, 100mM)	58636-100ML	Sigma
Non essential amino acids	M7145-100ML	Sigma
Paraformaldehyd (4 %ig)		Sigma
Penicillin/Streptomycin (100x)	P4333-100ML	Sigma
p-NPP (para-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat)	A1442	AppliChem
Sulfo-NHS-SS-Biotin	ab145611	Abcam
Tri.Natriumcitrat	121261000U	Grüssing
Tris-HCl	AE15.2	Roth
Triton X-100	SIG-X100-100ML	Sigma
Trypsin/EDTA	25300-104	Gibco
qPCR Kit	K1691	Thermo Scientific

### 2.1.2 Kulturmedium

#### DMEM Low Glucose mit einer finalen Konzentration von:

D - Glucose	8,25 mM
L- Glutamin	4 mM
Natriumpyruvat	1 mM
FCS	10 %
Pen/Strep (100x)	1 %
NEAA (100x)	1 %
Gentamicin	0,1 %
Biotin (100.000x)	0,00001%
B12 (1000x)	0,1 %

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Blockpuffer für ELISA	5 % BSA In PBST
Färbelösung ELISA	1 mM p-NPP In RxN Puffer
Fluo-4 AM	2 µM (0,2 % DMSO) In Humanringer
Homogenisierungspuffer	2,5 mM EDTA/ EGTA In PBS
Humanringer	130 mM NaCl 2,4 mM KCl 2,5 mM CaCl <sub>2</sub> • H <sub>2</sub> O 1,3 mM MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O 2,4 g HEPES pH 7,4 bei 37 °C In Aqua dest.

---

Natrium Citratpuffer	10 mM Tri-Natriumcitrat • 2H <sub>2</sub> O In Aqua dest.
PBS	2,7 mM KCl 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> In Aqua dest.
PBST	0,1 % Triton X-100 In PBS
PBST↑	2,7 mM KCl 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 500 mM NaCl 10,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1 % Triton X-100 In Aqua dest.
Quenchingpuffer	50 mM Glycin In PBS
RxN Puffer	1 mM MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O 0,1 M Tris-HCl pH 8,7 In Aqua dest.

---

## 2.1.4 Antikörper, Primer und Inhibitoren

<b>Primärantikörper</b>	<b>Referenznummer</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-alpha Tubulin (ms)	T-6199	Sigma
Anti-GLUT 1 (rb)	ab15309	Abcam
Anti-GLUT 3 (rb)	ab15311	Abcam
Anti.HIF1 $\alpha$ (rb)	36169S	CellSignalling
Anti-Histon 3 (rb)	H0164	Sigma
Anti Histon 4 (rb)	SAB4500309	Sigma
Anti-MCT 1 (ms)	sc365501	Santa Cruz
Anti-RAPTOR (rb)	2280S	CellSignalling
Anti-RICTOR (rb)	ab70374	Abcam
Anti-Phospho-Raptor (Ser792) (rb)	2083S	CellSignalling
Anti-Phospho-Rictor (Thr1135) (rb)	3806S	CellSignalling

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Referenznummer</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Mouse AP	A9044	Sigma
Anti-Rabbit AP	A3687	Sigma
Anti-Mouse Cy2	115-225-003	Jackson Immuno Research
Anti-Rabbit Cy2	111-225-144	Jackson Immuno Research

<b>Primer</b>	<b>Gen (NCBI)</b>	<b>Hersteller</b>
GLUT 1	NM_006516.2	Thermo Scientific
GLUT 3	NM_006931.2	Thermo Scientific
MCT 1	NM_003051.3	Thermo Scientific
MCT 2	NM_001270623.1	Thermo Scientific

Inhibitoren	Referenznummer	Hersteller
Rapamycin	13346	Biomol
AZD 8055 (5-[2,4-bis[(3S)-3-methyl-4-morpholinyl]pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-yl]-2-methoxy-benzenemethanol)	16978	Cayman Chemicals

### 2.1.5 Verbrauchsmaterial

6 Wellplatten (Zellkultur, steril)	Sarstedt
24 Wellplatten (Zellkultur; steril)	Sarstedt
96 Wellplatten (Zellkultur; steril; transparent)	Sarstedt
96 Wellplatten (high-bind protein)	Sarstedt
96 Wellplatten (Zellkultur; steril; schwarz)	Sarstedt
Deckgläser (22x40 mm)	Sarstedt
Eindeckmedium FluoreGuard	Histoline
Messpipetten (steril)	Greiner Bio One
Reaktionsgefäße (0,5 mL safe lock ; 1,5 mL; 2 mL)	Sarstedt
Objektträger Super Frost weiß	Roth
Silikonkammern	Eigene Herstellung
Silikonwells	Eigene Herstellung
Zellkulturflaschen (steril)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 mL; 50 mL)	Sarstedt

### 2.1.6 Geräte

2-Wege-Wälzpumpe (ISM849)	Ismatec, Wertheim
CFX Connect Real Time System	Bio Rad
Einkanalpipette (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Brand, Wertheim
ELISA-Reader safire <sup>2</sup>	Tecan
Heizblock	Abimed, Langenfeld
Infinite 200 PRO NanoQuant Microplate	Tecan, Männedorf, Schweiz
Kamera (Calcium-Imaging, Retiga R1)	Teledyne Technologies, Kalifornien, USA
Kühlzentrifuge (Centrifuge 5417R)	Eppendorf, Wolmirstedt
Lichtquelle Fluoreszenzmikroskop (EL6000)	Leica, Wetzlar
Mehrkanalpipetten (50 µl, 200 µl)	Brand, Wertheim
Mikroskop (Calcium-Imaging, Leica DMIL LED)	Leica, Wetzlar
Neubauer Zählkammer	P. Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH-Meter (inoLab ph730)	WTW, Weilheim
Schüttler	IKA Labortechnik, Staufen
Sterilbank	Nuaire, Plymouth
Tischzentrifuge (Spectrafuge)	Labnet, Berlin
Vortex VX 100	Labnet, Berlin
Waage CP3202S und CP225D	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Nuaire, Plymouth
Wärmplatte (RCT basic)	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	Labnet, Berlin
Zentrifuge (Centrifuge 5804R)	Eppendorf, Wolmirstedt

## 2.2 Methoden

Als in vitro Modell dienen Zellen der SH - SY5Y Linie von Sigma. Diesen Zellen wird in den folgenden Experimenten für die Versuchszeiträume von drei oder 24 Stunden ein bis zwei Energieträger systematisch vorenthalten. Hierfür werden Mangelmedien gemäß der Zusammensetzung (siehe Tabelle 4) benutzt.

**Tabelle 4: Zusammensetzung verschiedener Mangelbedingungen für Experimente.** Variiert werden Glutamin-, Glucose- und Pyruvatgehalt der Medien wie angegeben. Als Grundmedium dient DMEM No Glucose von Gibco.

<b>Medium</b>	<b>Glutamin</b>	<b>Glucose</b>	<b>Pyruvat</b>
Vollmedium	4 mM	8,25 mM	1 mM
mit Glutamin, ohne Glucose	4 mM	—	1 mM
ohne Glutamin, mit Glucose	—	8,25 mM	1 mM
ohne Glutamin ohne Glucose	—	—	1 mM
mit Glutamin, ohne Pyruvat	4 mM	8,25 mM	—
ohne Glutamin, ohne Pyruvat	—	8,25 mM	—

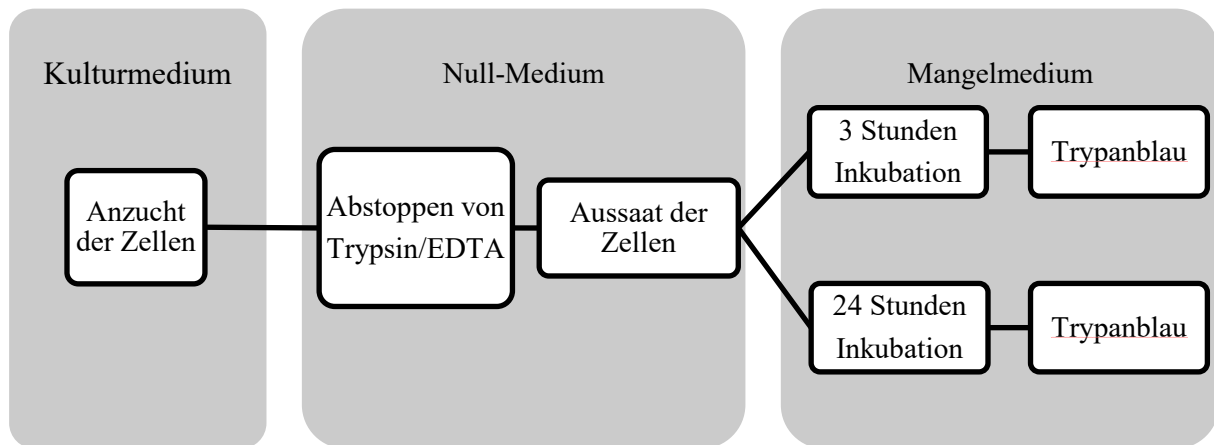
Diese Bezeichnungen werden im weiteren Verlauf der Arbeit stellvertretend für die Zusammensetzung der Medien verwendet. Die Zugabe eines Inhibitors wird gegebenenfalls mit „(R)“ für Rapamycin und mit „(A)“ für AZD8055 hinter der Mediumsbezeichnung gekennzeichnet.

### 2.2.1 Kultivierung und Aussaat der Zellen

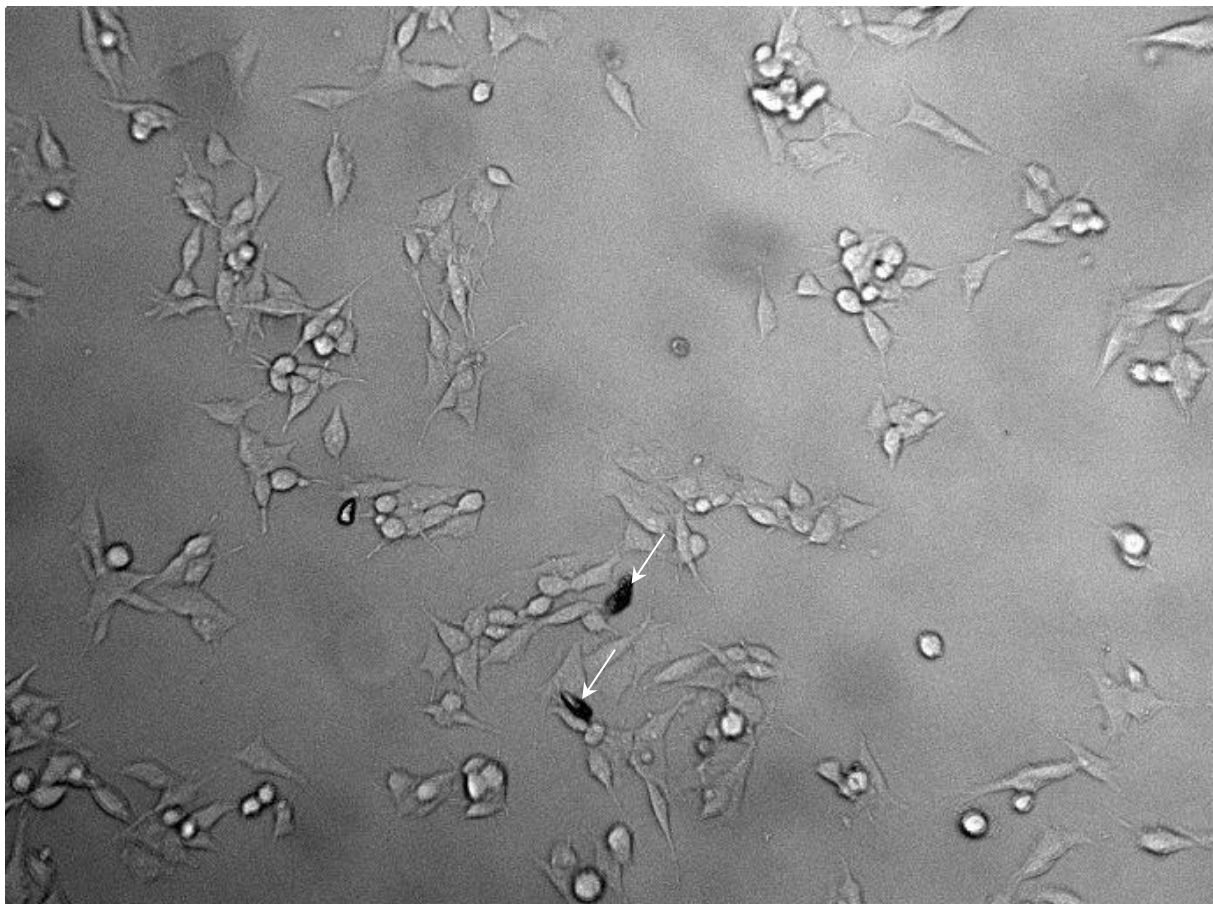
Die SH-SY5Y Zelllinie wird in Vollmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter sterilen Bedingungen kultiviert. Der Mediumswechsel erfolgt dreimal wöchentlich, wobei ein bis zweimal wöchentlich die Zellen passagiert werden. Für die Versuche werden Zellen der Passage 21 bis 27 genutzt. Hierfür werden SH-SY5Y für 3 *min* bei 37 °C mit Trypsin / EDTA inkubiert und durch leichtes Klopfen von der Kulturflasche abgelöst. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 15 *mL* Falcon überführt und mit der gleichen Menge Medium abgestoppt. Bei 1.100 *g* werden die Zellen 3 *min* lang abzentrifugiert und das Pellet in 1 *mL* DMEM No Glucose (Gibco) resuspendiert. mittels Neubauerzählkammer wird die Zellanzahl bestimmt und in die für den Versuch geeigneten Wellplatten ausgesät. Anschließend werden die Wells mit Mangelmedien aufgefüllt. Es erfolgt die Inkubation im Brutschrank für den entsprechenden Behandlungszeitraum.

### 2.2.2 Trypanblaufärbung

Hierfür werden 24 Wellplatten mit 100.000 SH-SY5Y Zellen pro Well belegt. Anschließend wird mit Mangelmedien auf 500  $\mu$ L pro Well Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach dem entsprechenden Behandlungszeitraum im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> werden 400  $\mu$ L Medium pro Well vorsichtig abgenommen und 100  $\mu$ L Trypanblau hinzugegeben (Abbildung 7). Dadurch färben sich tote Zellen dunkelblau bis schwarz, da Trypanblau nur durch eine poröse Membran diffundieren kann, während die lebenden Zellen ungefärbt bleiben (Abbildung 8).



**Abbildung 7: Versuchsschema Trypanblaufärbung.** Nach der Aussaat der Zellen in das jeweilige Mangelmedium wird die Hälfte der Wells einer 3stündigen Mangelbehandlung ausgesetzt, die andere Hälfte einer 24 stündigen Mangelbehandlung.

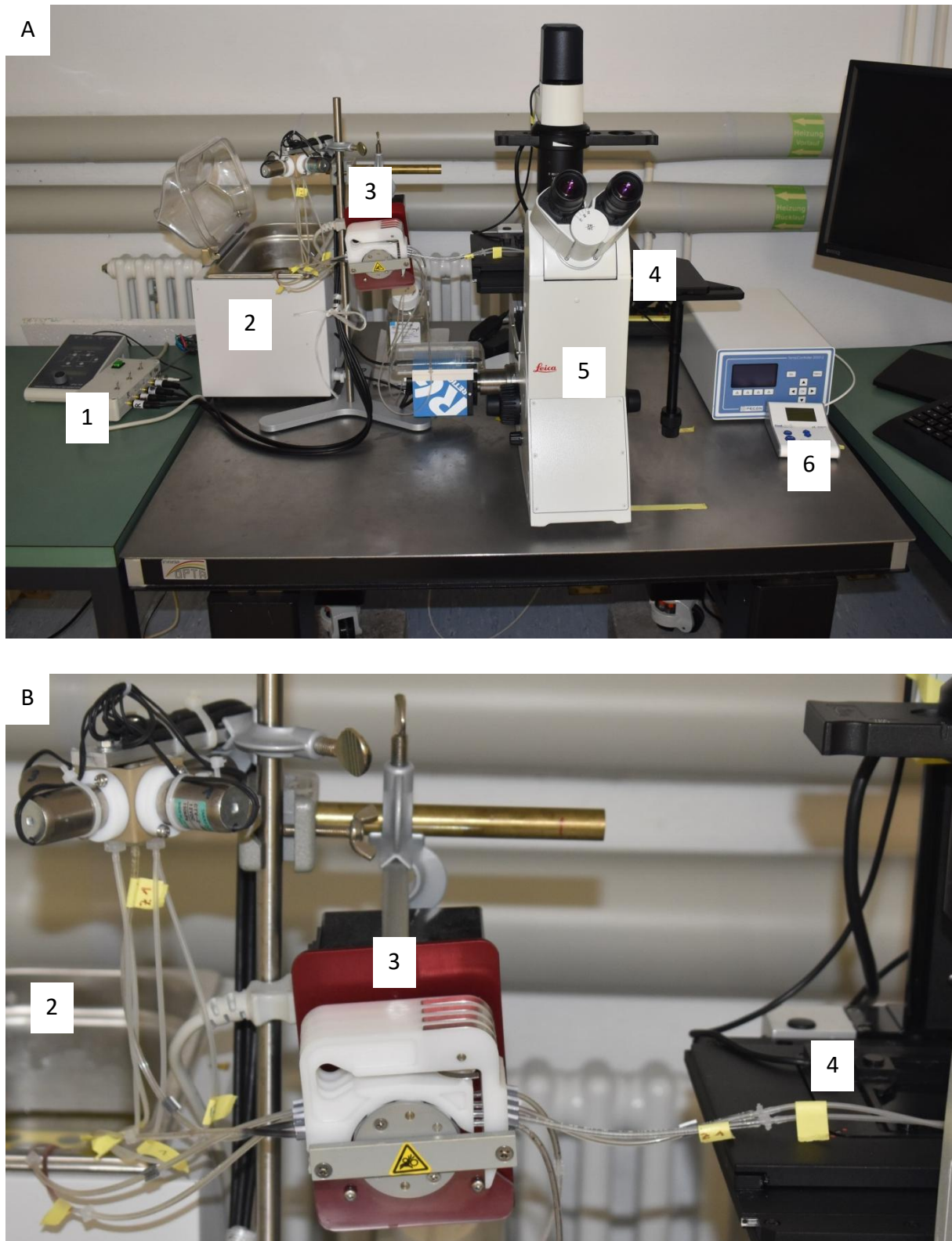


**Abbildung 8: Beispiel einer Trypanblau Färbung von SH-SY5Y Zellen.** Pfeile zeigen tote Zellen mit entsprechender schwarzer Färbung an. Bei den ungefärbten Zellen handelt es sich um lebende Zellen mit intakter Membran. (200 fache Vergrößerung).

Zur Auswertung werden mit dem Mikroskop pro Well drei repräsentative Ausschnitte aufgenommen (200 fache Vergrößerung) und sowohl die Gesamtzellzahl sowie der Anteil der gefärbten Zellen ausgezählt. Hierbei werden die drei repräsentativen Bildausschnitte eines Wells zusammengefasst, sodass folglich  $n$  der Anzahl von Wells pro Behandlung entspricht. Die so ermittelten Zellzahlen werden durch die ermittelte Zellzahl des Vollmediums dividiert, um sie so auf das Vollmedium zu normieren. Die statistische Auswertung erfolgt mittels ANOVA zum Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . Da hierbei mehrere Behandlungen mit dem Vollmedium verglichen werden, wird zum Ausschluss von Effekten durch Fehlerkumulierung eine Bonferroni – Korrektur angeschlossen, welche bei dem Vergleich von 5 verschiedenen Mangelbedingungen mit dem Vollmedium zu dem adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$  führt.

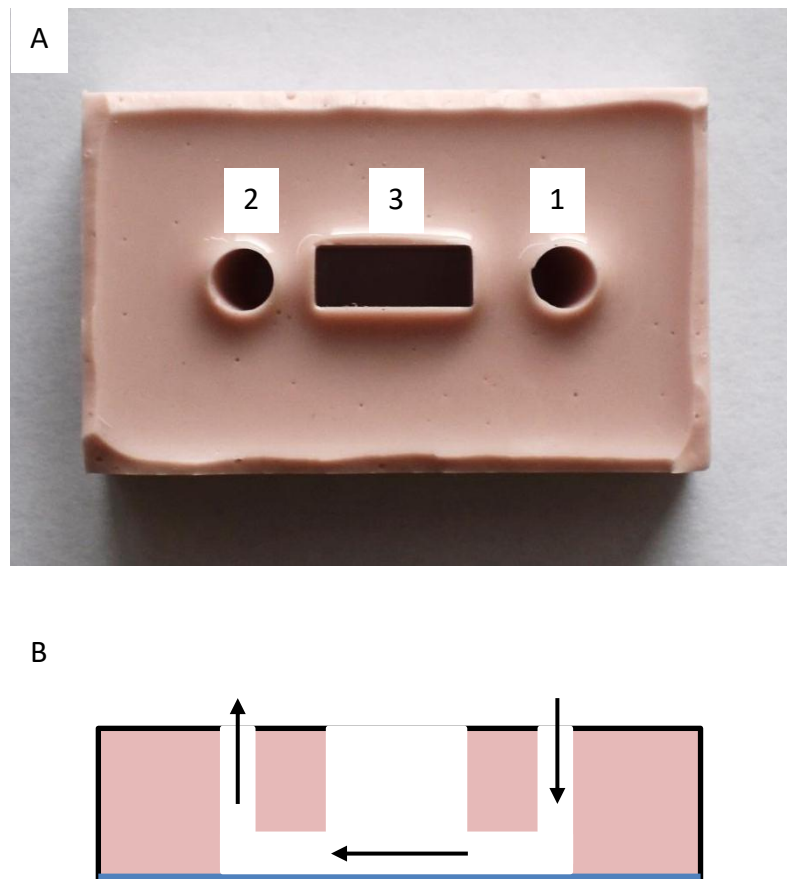
### 2.2.3 Calcium Imaging

Ein Durchflusssystem (Abbildung 9) wird verwendet, um den Verlauf des Calciumsignals aufzeichnen und kurze Acetylcholinpulse applizieren zu können. In diesem Versuch werden für das Durchflusssystem zur Verminderung des Hintergrundsignals Humanringerlösungen verwendet, welche die gleichen Konzentrationen an Glucose, Glutamin und Pyruvat besitzen wie die zur 24 stündigen Inkubation verwendeten Mangelmedien. Im Wärmebad (Abbildung 9 A & B; 2) werden jeweils ein Reservoir mit Humanringer und Humanringer mit Acetylcholin pro Bedingung vorgewärmt. Durch Relais können per Schalter (Abbildung 9 A; 1) zwischen Humanringer und dem Humanringer mit Acetylcholin umgeschaltet werden. Die Zwei – Wege – Wälzpumpe (Abbildung 9 B; 3) transportiert den Humanringer durch den Silikonschlauch des Zulaufs zum Objektisch mit der Silikonkammer (Abbildung 9 B; 4) und transportiert gleichzeitig mit dem Silikonschlauch des Ablaufs den Humanringer auf der anderen Seite der Silikonkammer ab (vergleiche Abbildung 10 B). Mit der Kamera des Mikroskops und dem elektronischen Shutter (Abbildung 9 A; 5 & 6) werden während des Versuchs Serienbilder im Abstand von zwei Sekunden aufgenommen, wobei die Belichtung nur während der Bildaufnahme erfolgt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden.



**Abbildung 9: Aufbau des Durchflusssystems für Calcium Imaging.** A) Übersicht des Aufbaus mit 1 = Schalter zur Gabe von Acetylcholinpulse; 2= Wärmebad zum Temperieren der verwendeten Lösungen; 3 = 2 – Wege – Wälzpumpe; 4 = Objektisch mit Silikonkammer; 5 = Mikroskop mit Kamera; 6 = elektronischer Shutter und Lichtquelle. B) Nahaufnahme der 2 – Wege – Wälzpumpe mit Silikonschläuchen zum Applizieren der Lösungen.

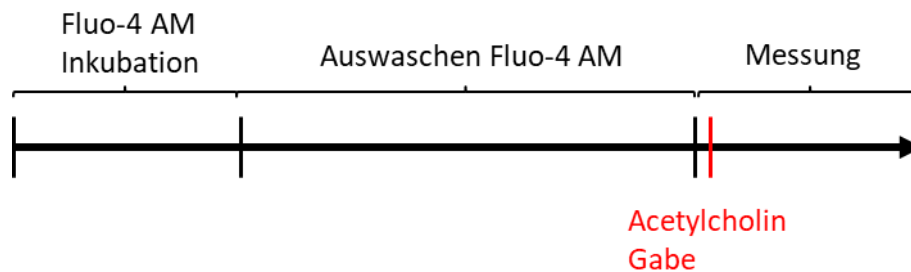
Hierfür werden spezielle Silikonkammern (Abbildung 10) und Deckgläser (22 x 40 mm) mit 99 %igem Ethanol von Kontaminationen gereinigt und entfettet. Nach 30 min abdampfen haften Deckgläser und Silikonkammern durch leichtes Andrücken flüssigkeitsdicht aneinander.



**Abbildung 10: Verwendete Silikonkammer für das Durchflusssystem.** A) Aufsicht der Silikonkammer mit 1 = Zulauföffnung; 2 = Ablauföffnung und 3 = Mikroskopierfeld. B) Schematischer Querschnitt durch Silikonkammer mit Flussrichtung des Mediums (Pfeile) und Deckglas (blau).

Pro Kammer werden 60.000 Zellen ausgesät. Mit den Mangelmedien wird auf 300  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen pro Kammer aufgefüllt. Es folgt eine 24 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ . Zur Vermeidung von Konzentrationsprüngen werden für das Durchflusssystem Humanringer mit entsprechender Glucose-, Glutamin- und Pyruvatkonzentrationen an Stelle der Mangelmedien verwendet. Zur Stimulation wird ein zusätzliches Reservoir des jeweiligen Humanringers mit 5  $\mu\text{M}$  Acetylcholin angesetzt. Alle

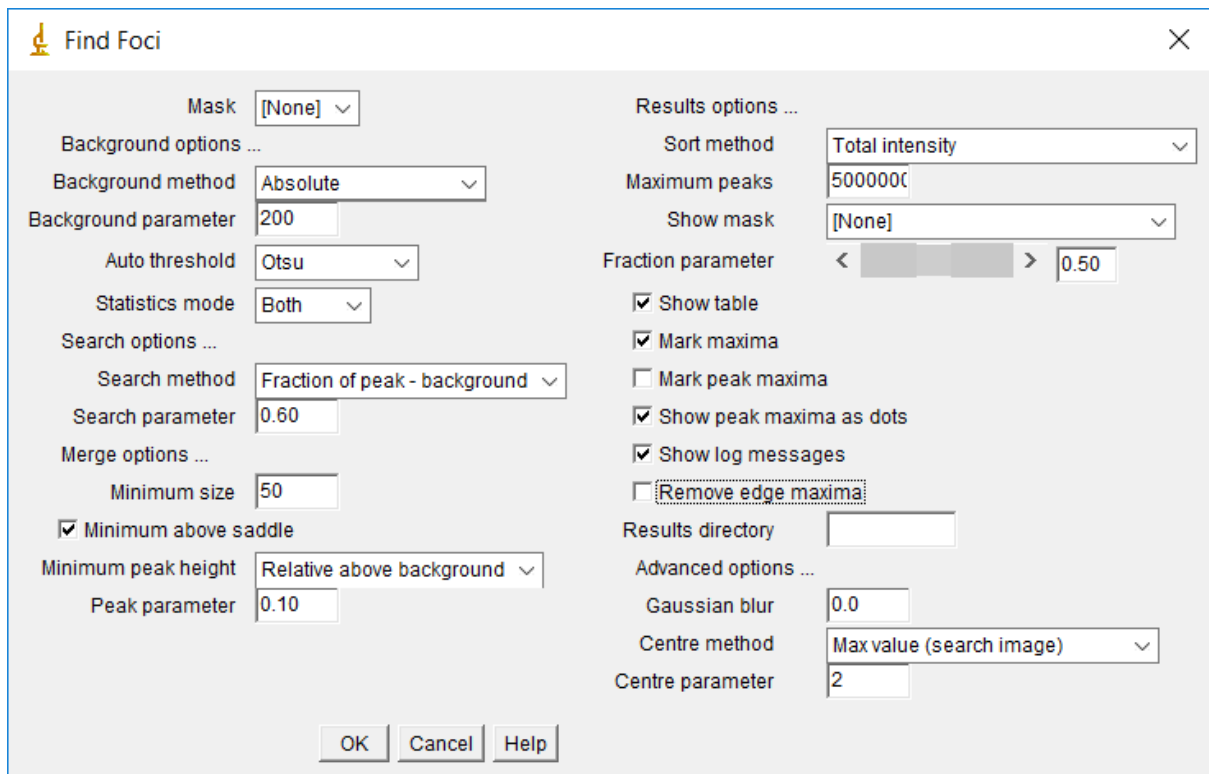
Lösungen sind im Wasserbad vorzuwärmen und während des Versuches auf 37 °C zu temperieren. Die Beladung der Zellen mit Fluo-4 AM und das Waschen mit Humanringer wird nach einem gestaffelten Zeitschema vorgenommen (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Zeitschema des Calcium Imagings Versuchsablauf.** Der Versuch beginnt mit der Fluo-4 AM Gabe. Nach dem Auswaschen des Fluo-4 AM Farbstoffes wird die Kammer an das Durchflusssystem angeschlossen und die Aufzeichnung der Messung begonnen. Zum Zeitpunkt 20 nach Beginn der Messung wird ein Acetylcholinpuls bis Zeitpunkt 22 gegeben. Die Messung wird bis zum Zeitpunkt 50 fortgesetzt.

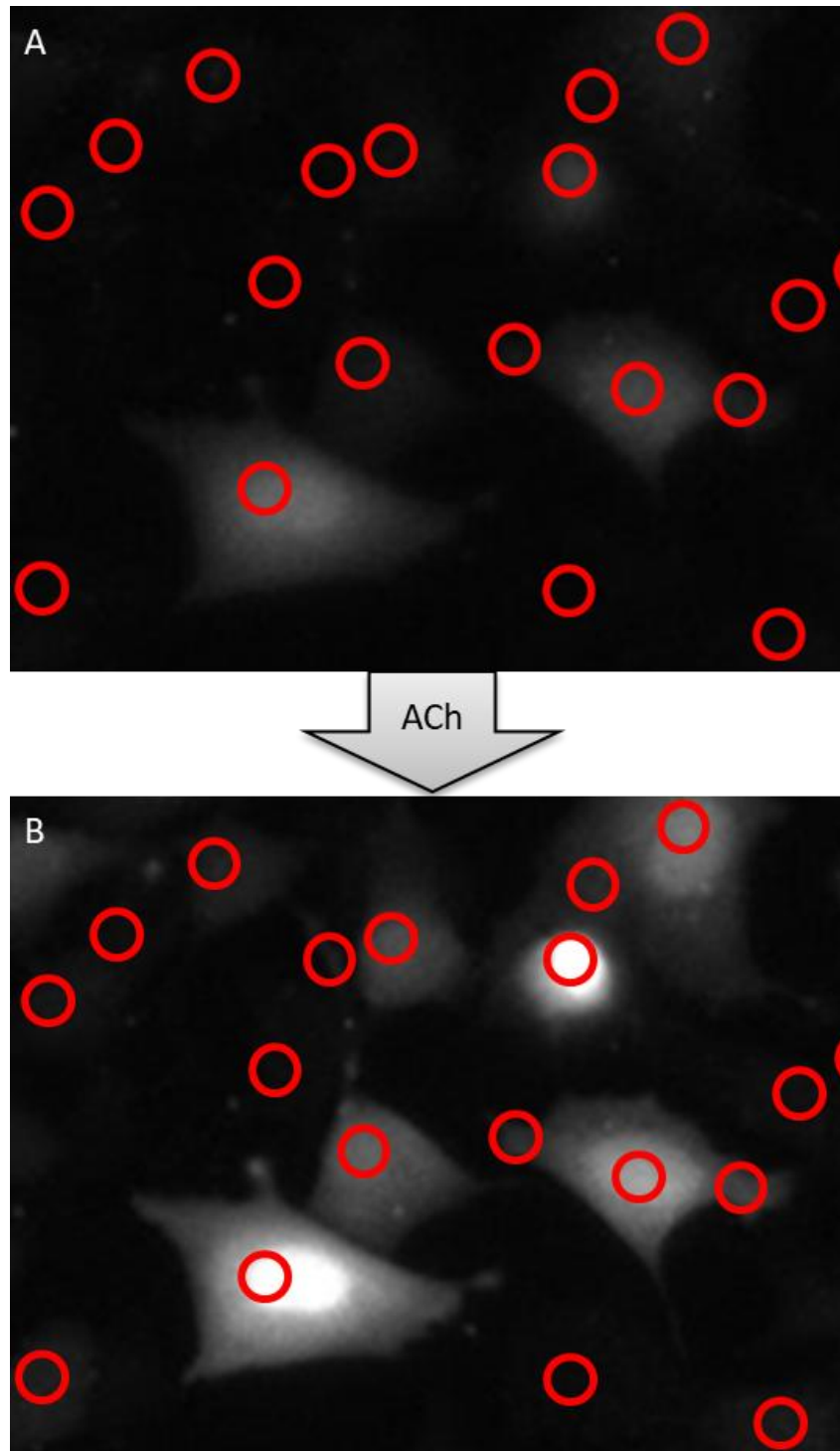
Hierbei wird zunächst das Medium vorsichtig abgenommen und 150  $\mu\text{L}$  Fluo-4 AM Lösung (2  $\mu\text{M}$  in Humanringer) hinzugegeben. Es folgt eine 15 minütige Inkubation bei 37 °C. Anschließend wird die Fluo-4 AM Lösung durch 150  $\mu\text{L}$  Humanringer ersetzt. Die Kammer wird bei 37 °C 30 min gewaschen. Unmittelbar vor der Messung werden die Zuläufe des Durchflusssystems zum Entlüften mit den temperierten Humanringer und Humanringer mit Acetylcholin gefüllt. Die Kammer wird an Zu- und Ablauf angeschlossen und gespült. Es wird ein Bild (400 fache Vergrößerung) im Durchlicht angefertigt. Anschließend wird die Serienbildaufnahme (400 fache Vergrößerung) unter Fluoreszenzlicht gestartet, wobei jedes Einzelbild als Zeitpunkt betrachtet wird. Zum Zeitpunkt 20 bis 22 wird mittels Relais zwischen Humanringer und Humanringer mit Acetylcholin umgeschaltet. Danach wird bis Zeitpunkt 50 Humanringer verwendet. Zur Auswertung der Serienbilder wird *ImageJ* verwendet. Zunächst werden in der Serienbildaufnahme zum Zeitpunkt der Reaktion mit dem *ImageJ* PlugIn „GDSC“ der Universität Sussex<sup>2</sup> und dessen *Find Foci* Funktion (Abbildung 12) *regions of interest* (ROIs) ermittelt und mit dem zugehörigen Durchlichtbild abgeglichen.

<sup>2</sup> [http://www.sussex.ac.uk/gdsc/intranet/microscopy/UserSupport/AnalysisProtocol/imagej/gdsc\\_plugins/](http://www.sussex.ac.uk/gdsc/intranet/microscopy/UserSupport/AnalysisProtocol/imagej/gdsc_plugins/)



**Abbildung 12: Grundeinstellungen der *Find Foci* Funktion bei *ImageJ* zur Ermittlung der ROIs.** Mithilfe dieser Einstellungen werden die Grauwerte jeder Zelle im Bildausschnitt über den experimentellen Zeitraum erfasst.

Dies dient der Eliminierung von Artefakten und der Ermittlung nicht reaktiver Zellen. Das PlugIn erkennt mit den gezeigten Einstellungen automatisch den hellsten Pixel einer jeden Zelle und legt je eine ROI mit dem Durchmesser 12 Pixel um diese lokalen Maxima. Diese ROIs werden anschließend auf alle Bilder einer Serienaufnahme übertragen und der mittlere Grauwert einer jeden Zelle zu jedem Zeitpunkt der Messung ermittelt. Von jeder Zelle wird die maximale Zunahme des Fluoreszenzsignals nach Stimulation im Vergleich zu ihrem Fluoreszenzsignal vor der Stimulation erfasst (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Berechnung der relativen Signalstärke.** A: Mit Fluo-4 AM beladene Zellen vor Acetylcholinstimulation; B: durch Acetylcholinstimulation reagierende Zellen. Die ROIs (rot) der mit Fluo-4 AM beladenen Zellen vor und bei Stimulation ist gelb hervorgehoben. (400 fache Vergrößerung).

Mithilfe der ROI wird von jeder Zelle die relative Helligkeitszunahme ermittelt, indem der mittlere Grauwert der ROI bei der Acetylcholinstimulation durch den mittleren Grauwert der ROI vor der Stimulation dividiert wird:

$$\frac{\text{Grauwert (ROI B)}}{\text{Grauwert (ROI A)}} = \text{relative Signalstärke}$$

Diese relative Signalstärke wird als Maß für die Stärke des Calciumeinstroms der Zellen auf Acetylcholin genutzt. Aus diesen Werten wird für jede Mangelbedingung eine kumulative Häufigkeitsverteilung erstellt, durch welche Aufschluss darüber gegeben wird, welcher Anteil der Zellen mit welcher relativen Signalzunahme auf den Acetylcholin Stimulus reagieren.

## 2.2.4 Quantitative Real Time PCR

Mit Hilfe der Nukleotid Datenbank<sup>3</sup> des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) wird zunächst die mRNA Sequenz der zu untersuchenden humanen Glucose- und Lactattransporter ermittelt. Zu diesen Sequenzen werden mittels der *Pick Primer* Funktion die Parameter Lage, PCR Produktlänge und Exon überspannende Sequenz festgelegt. Die so erhaltenen Primersequenzen werden anschließend mit der *RefSeqGene Nucleotide BLAST* Funktion von NCBI<sup>4</sup> mit der *Human genomic plus transcript* Datenbank abgeglichen, um Fremdübereinstimmungen auszuschließen. Durch die so generierten Exon - Exon überspannenden Primerpaare (Tabelle 5) ist es möglich im Folgenden die mRNA Menge verschiedener Transportproteine mittels Real Time PCR zu quantifizieren.

---

<sup>3</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>

<sup>4</sup>[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

**Tabelle 5: Verwendete Primerpaare in der qPCR.** Je ein Primer des angegebenen Primerpaares ist Exon – Exon überspannend, um eine mRNA spezifische Amplifizierung zu garantieren. Die Produktlänge liegt jeweils zwischen 150 und 260 Basenpaaren.

<b>Transporter</b>	<b>Forward Primer 5' -&gt; 3'</b>	<b>Reverse Primer 5' -&gt; 3'</b>
GLUT 1	TCATCAACCGCAACGAGGAG	GAAGACAGCGTTGATGCCAG
GLUT 3	TGGCTGCTTTATGGGACTGT	AGACCAAAGATCTGGGCCAC
MCT 1	GTCATTGGAGGTCTTGGGCT	ATGAGGGCTCCAGCAACAC
MCT 2	GGATGGGGTTGGATTGTGGT	TACAGGACCTCCTGCGTACA

Als Referenz dient ein ausreichender Vorrat an in cDNA umgeschriebenes Homogenat aus unbehandelten SH-SY5Y Zellen. In einer 24 Wellplatte werden 200.000 Zellen ausgesät und mit den Mangelmedien auf 500  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen pro Well aufgefüllt. Es erfolgt eine Inkubation für 24 Stunden im Brutschrank (37 °C; 5 % CO<sub>2</sub>). Anschließend wird das Medium sorgfältig abgenommen und mit sterilem PBS gespült.

Pro Well werden 300  $\mu\text{L}$  Trizol zugegeben. Der Bodensatz wird mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 0,5 mL Eppendorf Gefäß mit *Safe Lock* Verschluss überführt, wobei jedes Well einer Probe entspricht. Nach 5 minütiger Inkubation im Dunkeln werden pro Probe 60  $\mu\text{L}$  Chloroform zugegeben. Durch vortexen werden die beiden Phasen durchmischt und die Proben für 3 *min* inkubiert. Es erfolgt eine Phasentrennung. Bei 4 °C und 12.000 g werden die Proben 15 *min* zentrifugiert. Die obere, klare Phase wird sorgfältig abgenommen und in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß überführt. Auf Eis werden 150  $\mu\text{L}$  Isopropanol und 1  $\mu\text{L}$  Glycogen jeder Probe zugegeben und gevortext. Bei -70 °C erfolgt die Fällung der RNA über Nacht. Die Proben werden für das weitere Vorgehen stets auf Eis gestellt. Bei 4 °C und 12.000 g wird die gefällte RNA 15 *min* abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 200  $\mu\text{L}$  Ethanol (75 % unvergällt in DEPC Wasser) gewaschen. Es folgen zwei weitere Waschschrte bei 4 °C und 7.600 g für 7 *min*. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur 30 *min* getrocknet. Das Pellet wird in 20  $\mu\text{L}$  DEPC Wasser gelöst und 5 *min* bei 65 °C inkubiert. Nach kurzem vortexen werden die Proben direkt auf Eis gestellt und bei -70 °C gelagert.

Zur Bestimmung des RNA Gesamtgehalts werden die Proben mit dem Nanodrop Verfahren gemessen. Von jeder Probe werden 1  $\mu\text{g}$  RNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wird das entsprechende Volumen Probe mit DEPC Wasser auf 11  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen aufgefüllt.

Anschließend wird 1  $\mu\text{L}$  OligoDT Primer an den Rand des Eppendorf Gefäßes gesetzt und in die Probe zentrifugiert. Bei 65 °C werden die Proben 5 *min* inkubiert. Die Proben werden ein bis zwei Minuten auf Eis gestellt und 8  $\mu\text{L}$  Reverse Transkriptase Mix bestehend aus 1  $\mu\text{L}$  Ribolock, 4  $\mu\text{L}$  5x Reaktionspuffer, 2  $\mu\text{L}$  10 mM dNTP Mix und 1  $\mu\text{L}$  Reverse Aid Transcriptase werden jeder Probe zugegeben. Bei 42 °C werden die Proben auf dem Schüttler für eine Stunde inkubiert.

Für die quantitative Real-Time PCR werden die Proben mit DEPC Wasser 1:1 vorverdünnt. Als Standard wird die Referenz cDNA aus unbehandelten SH-SY5Y 1:10 in DEPC Wasser verdünnt eingesetzt. In eine PCR Platte werden pro Well ein 1  $\mu\text{L}$  Probe und ein technisches Replikat aufgetragen. Bei der No Template Control wird die Probe durch 1  $\mu\text{L}$  DEPC Wasser ersetzt. Pro Tube werden 9  $\mu\text{L}$  Master Mix bestehend aus 6,2  $\mu\text{L}$  DEPC Wasser, je 0,4  $\mu\text{L}$  Forward und Reverse Primer und 2  $\mu\text{L}$  Eva Green zugegeben. Abschließend wird die PCR Platte anzentrifugiert und mit Folie verschlossen. Die Messung erfolgt im Cyclyer unter Zuhilfenahme der *BioRad CFX Manager* Software. Aus den gemessenen  $C_t$  – Werten werden mit Hilfe der Gleichung

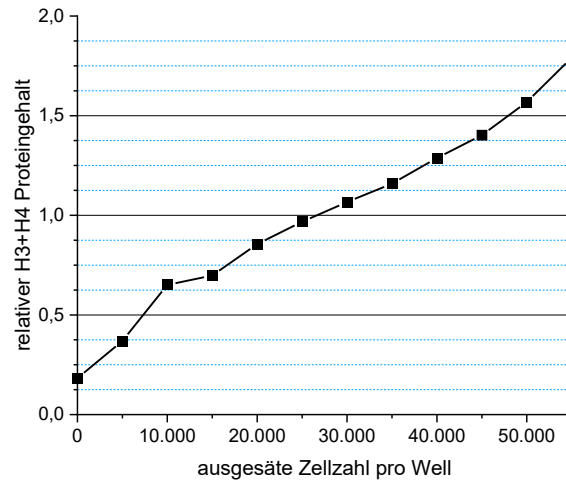
$$\Delta C_t = C_t(\text{Probe}) - C_t(\text{Standard})$$

die jeweiligen  $\Delta C_t$  Werte berechnet. Die statistische Auswertung erfolgt mit dem nicht parametrisierten Kruskal – Wallis – Test wobei „n“ der Anzahl anfänglicher Wells je Behandlung entspricht.

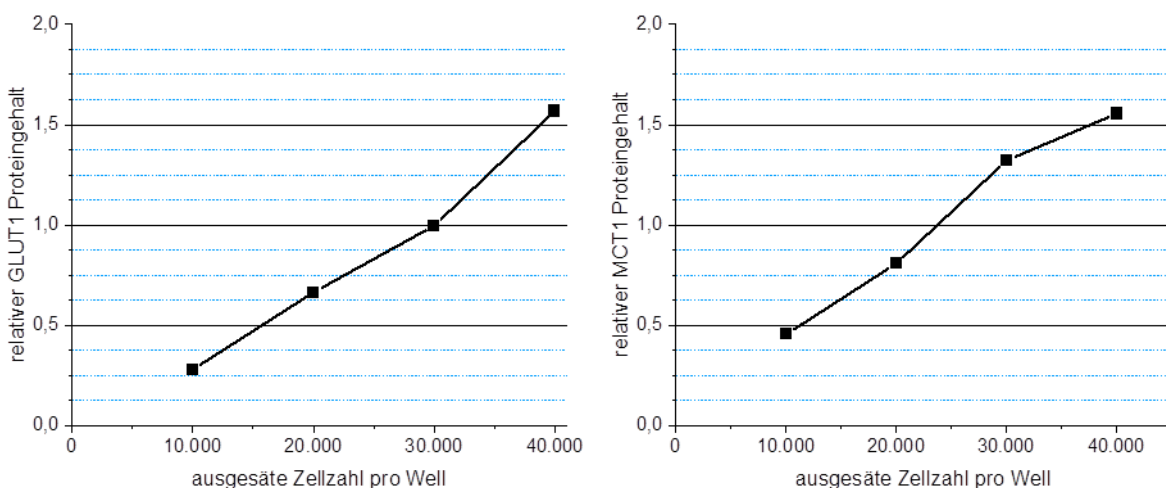
### 2.2.5 ELISA

Zunächst werden für die Primärantikörper Eichgeraden im Vollmedium erstellt, um den linearen Messbereich und somit die auszusäende Zellzahl und die Inkubationszeit der Färbelösung zu bestimmen. Es wird die geeignete Zellzahl (Abbildung 14 und Abbildung 15)

in transparente 96 Wellplatten ausgesät und mit Mangelmedien auf  $100 \mu\text{L}$  pro Well Gesamtvolumen aufgefüllt.



**Abbildung 14: Eichgerade Histon 3+Histon 4 Färbung für ELISA.** Es zeigt sich eine linearer Kurvenverlauf mit der Gleichung  $y = 3 \cdot 10^{-5}x + 0,2748$  zwischen 15.000 und 45.000 Zellen, daher können für die Histonmessungen die gleiche Zellzahlen eingesetzt werden wie in den Messungen der Transporter. Dies erlaubt eine Detektion sowohl von erhöhter wie erniedrigter Zellzahlen im Versuch. Die Färbezeit beträgt hierbei  $50 \text{ min}$  bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .



**Abbildung 15: Eichgeraden für Glucose- und Lactattransporter.** Zur Ermittlung des geeigneten Messbereichs wird stellvertretend für Glucose- und Lactattransporter der Proteingehalt von GLUT1 (links) und MCT1 (rechts) in Abhängigkeit der ausgesäten Zellzahl gemessen. Ein geeigneter linearer Bereich findet sich zwischen 20.000 und 40.00 Zellen und einer Färbung über Nacht.

Die Proteinmenge von Glucose- und Lactattransportern wird unter der systematischen Vorenthaltung von Glutamin und Glucose untersucht. Zudem werden verschiedene Inhibitoren zur Blockade potentieller Regulationskaskaden eingesetzt und deren Einfluss auf die Transportermenge gemessen. Dies wird jeweils im Versuchszeitraum drei Stunden oder 24 Stunden durchgeführt, um eine etwaige Abhängigkeit der Transportermenge zur Dauer des Energiemangels feststellen zu können. Auf die gleiche Weise wird die HIF1 $\alpha$  Proteinmenge ermittelt, da dies Rückschlüsse auf die Beteiligung von HIF1 als potentieller Regulator erlaubt.

Zur Bestimmung der Proteinmenge von GLUT1, GLUT3 und MCT1 werden 30.000, für HIF1 $\alpha$  werden 40.000 Zellen pro Well ausgesät und für drei oder 24 Stunden im Brutschrank bei 36 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit Mangelmedien in An- und Abwesenheit von Inhibitoren inkubiert. Die Wellplatten werden 3 *min* bei 1.100 *g* für 3 *min* abzentrifugiert und bei den transparenten Platten das Medium durch 50  $\mu$ L Paraformaldehyd (4 % in Aqua dest) ersetzt. Nach 15 minütiger Fixierung werden die Platten je einmal mit 200  $\mu$ L PBS / 0,1 % Triton X-100 gespült und zweimal 5 *min* gewaschen. Anschließend werden die Wellplatten mit 100  $\mu$ L Citratpuffer (10 *mM* in Aqua dest.) pro Well im vorgeheizten Wärmeschrank bei 90 °C 15 *min* demaskiert. Anschließend kühlen diese bei Raumtemperatur 5 *min*, ab bevor sie mit PBS 5 *min* gewaschen werden. Mit 300  $\mu$ L pro Well frisch angesetztem Blockpuffer (5 % BSA in PBST) wird 30 *min* blockiert, es folgt die Zugabe der Primärantikörper. Es wird einmal mit PBS gespült und zweimal 5 *min*, gewaschen bevor 50  $\mu$ L Sekundärantikörper (1:4000 in Blockpuffer) für 1 *h* pro Well zugegeben wird. Anschließend wird erneut einmal mit PBS gespült und zweimal gewaschen. Pro Well werden 200  $\mu$ L NPP (1 *mM* in RxN Puffer) bei 36 °C inkubiert. Es folgt die Absorptionsmessung am safire<sup>2</sup> Reader.

Um die Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Versuchstagen zu gewährleisten, werden die Werte aller gefärbten Wells gemittelt. Anschließend werden die gemessenen Werte durch den Mittelwert der ELISA – Platte dividiert, um sie so zu normieren. Im Falle der Histon 3 und Histon 4 Färbung wird zunächst anhand der Eichgerade auf die Zellzahl der einzelnen Wells zurückgerechnet. Die so ermittelten Zellzahlen der Behandlungen werden durch den Mittelwert der Zellzahl des Vollmediums dividiert, um sie so auf das Vollmedium zu normieren.

Die statistische Auswertung erfolgt in allen Fällen mittels ANOVA zum Signifikanzniveau  $p < 0,05$ , wobei „n“ der Anzahl gemessener Wells je Behandlung entspricht. Da hierbei

mehrere Behandlungen mit dem Vollmedium verglichen werden, wird zum Ausschluss von Effekten durch Fehlerkumulierung eine Bonferroni – Korrektur angeschlossen, welche bei dem Vergleich von fünf verschiedenen Mangelbedingungen mit dem Vollmedium zu dem adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$  führt, bei einem Vergleich von drei verschiedenen Behandlungen mit dem Vollmedium ergibt sich ein adjustiertes Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0125$ .

### 2.2.6 Biotinylierungsassay

Für den Versuch werden in 6 Wellplatten 1,5 Mio Zellen pro Well ausgesät und mit Mangelmedien auf 3 mL pro Well Gesamtvolumen aufgefüllt. Es werden Rapamycin oder AZD8055 mit einer Endkonzentration von 10 nM bzw. 1 nM pro Well entsprechend hinzugegeben und 0,001 % bzw. 0,0001 % DMSO als Lösemittelkontrolle in die Wells ohne Inhibitor gegeben. Die Inkubation erfolgt für drei Stunden oder 24 Stunden bei 36 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Zunächst werden die Zellen zweimal mit je 3 mL 4 °C kaltem PBS gewaschen. Es folgt die Kopplung der Oberflächenproteine an Biotin durch Zugabe von 1 mL Sulfo-NHS-SS-Biotin Lösung (0,5 mg / mL PBS) pro Well. Die Inkubation erfolgt auf Eis für 30 min auf dem Schüttler. Die Lösung wird sorgfältig abgenommen und pro Well zweimalig bei 4 °C auf dem Schüttler 2 mL Quenchingpuffer (50 mM in PBS) für je 5 min zugegeben. Anschließend erfolgt ein dreimaliges Waschen mit je 2 mL PBS pro Well. Es werden 300 µL Homogenisierungspuffer (2,5 mM EDTA/ EGTA in PBS) pro Well zugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 0,5 mL Safe Lock Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zugabe von je 10 Keramik Kügelchen pro Gefäß werden die Zellen zunächst 1 min mit dem Schüttler und anschließend 30 s mittels Ultraschallsonde homogenisiert.

Für die Selektion der biotinkoppelten Proteine werden 96 Wellplatten (*high bind protein*) mit einer Avidinlösung (10 µg/ mL PBS) für 2 h auf dem Schüttler beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit je 400 µL PBS pro Well wird mit 400 µL Blockpuffer (5 % BSA in PBS) pro Well für 1 h auf dem Schüttler geblockt. Anschließend wird eine Verdünnungsreihe der Proben in Blockpuffer mit 50 µL Gesamtvolumen pro Well aufgetragen. Die Biotin-

Avidin Kopplung erfolgt auf dem Schüttler für 1,5 h bei Raumtemperatur. Die Wells werden dreimal mit je 400  $\mu\text{L}$  PBS gewaschen. Es werden analog 50  $\mu\text{L}$  Primärantikörper (anti-GLUT1, anti-GLUT3 oder anti-MCT1 1:500 in Blockpuffer) pro Well zugegeben. Die Inkubation erfolgt bei 4 °C über Nacht. Durch dreimaliges Waschen mit je 400  $\mu\text{L}$  PBS pro Well wird der überschüssige Primärantikörper entfernt. Es folgt die Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Sekundärantikörper (1:4000 in Blockpuffer) pro Well auf dem Schüttler für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit 400  $\mu\text{L}$  PBS pro Well, wird pro Well je 200  $\mu\text{L}$  NPP (1 mM in RxN Puffer) zugegeben. Die Färbung erfolgt bei 4 °C über Nacht.

Um die Gesamtmenge an Protein, sowohl membranständig als auch intrazellulär, zu bestimmen werden die Homogenate als Verdünnungsreihe in 50  $\mu\text{L}$  PBS direkt auf die 96 Wellplatten (*high bind protein*) aufgetragen. Die Bindung an die 96 Wellplatten erfolgt ebenfalls 1,5 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Es folgen drei Waschschritte mit je 400  $\mu\text{L}$  PBS pro Well und das Blocken mit 400  $\mu\text{L}$  Blockpuffer (5 % BSA in PBS) für 1 h auf dem Schüttler. Anschließend werden pro Well 50  $\mu\text{L}$  Primärantikörper zugegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Der überschüssige Primärantikörper wird durch dreimaliges Waschen mit 400  $\mu\text{L}$  PBS pro Well entfernt. Es werden bei Raumtemperatur für 1 h pro Well 50  $\mu\text{L}$  Sekundärantikörper zugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit je 400  $\mu\text{L}$  PBS pro Well, wird je 200  $\mu\text{L}$  NPP (1 mM in RxN Puffer) zugegeben. Die Färbung erfolgt bei 4 °C über Nacht.

Die Auswertung erfolgt analog zu ELISA (siehe 2.2.5 ELISA). Dabei wird zunächst der relative Gesamtproteingehalt und der membranständige Transportergehalt ermittelt. Anschließend wird die Ratio aus biotinyliertem Transportprotein und Gesamtprotein ermittelt. Die statistische Auswertung mittels ANOVA zum Signifikanzniveau  $p < 0,05$ , wobei „n“ der Anzahl gemessener Wells je Behandlung entspricht. Da hierbei mehrere Behandlungen mit dem Vollmedium verglichen werden, wird zum Ausschluss von Effekten durch Fehlerkumulierung eine Bonferroni – Korrektur angeschlossen, wodurch sich bei einem Vergleich von fünf verschiedenen Behandlungen mit dem Vollmedium ein adjustiertes Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  ergibt.

### 2.2.7 Immunzytochemische Färbung

Hierfür werden Objektträger und Silikonwells (Abbildung 16) zunächst in 99 %igem Ethanol gewaschen und trocknen für mindestens 30 *min* bei Raumtemperatur. Durch leichtes Andrücken haften die Silikonwells und der Objektträger flüssigkeitsdicht aneinander.

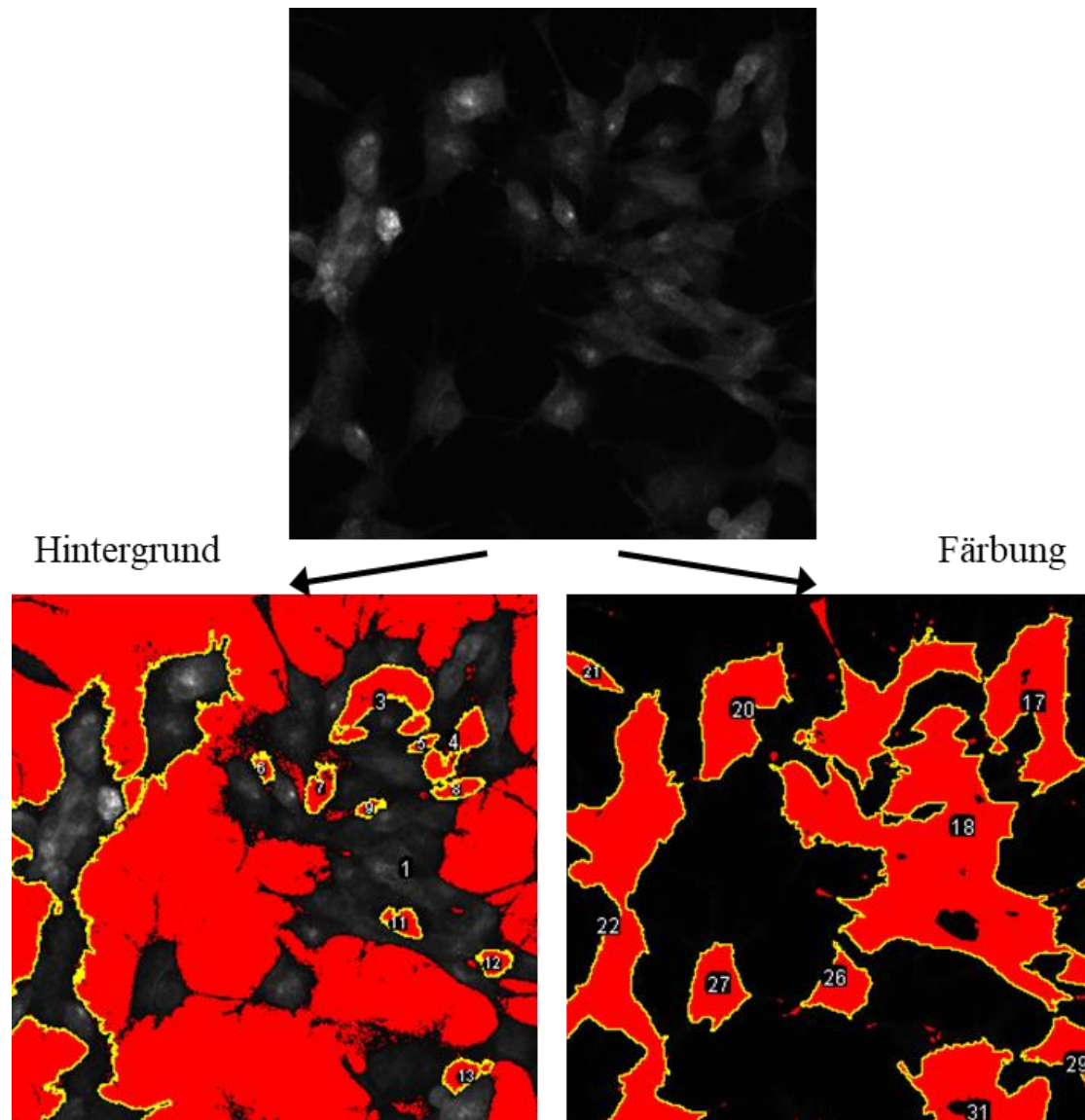


**Abbildung 16: Silikonwells auf einem Objektträger.** Die flüssigkeitsdichte Abgrenzung zwischen den Wells erlaubt den Auftrag verschiedener Behandlungen auf einem Objektträger.

Pro Well werden 20.000 Zellen ausgesät und mit Mangelmedien auf 100  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen pro Well aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 24 *h* bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wird das Medium vorsichtig abgenommen und pro Well wird mit 100  $\mu\text{L}$  Paraformaldehyd (4 % in PBS) 15 *min* fixiert.

Das Paraformaldehyd wird abgenommen, die Silikonwells entfernt und die Objektträger in Aqua dest. gespült. Die Demaskierung erfolgt bei 80 - 90 °C in Citratpuffer (10 *mM* in Aqua dest.) für 10 *min*. Anschließend kühlen Citratpuffer und Objektträger bei Raumtemperatur für 20 *min*. Es folgt ein 5 minütiger Waschschrift in destilliertem Wasser. Mit Blockpuffer (5 % BSA in PBST $\uparrow$ ) werden die Objektträger für 30 *min* inkubiert. Die Primärantikörper (1:200 in Blockpuffer) werden für 90 *min* zugegeben. Nach drei Waschschriften mit PBST $\uparrow$  zu je 2 *min* werden die Sekundärantikörper (1:500 in Blockpuffer) für 1 *h* zugegeben. Abschließend wird der Sekundärantikörper abgenommen und der Objektträger dreimal für 2 *min* mit PBST $\uparrow$  gewaschen. Die Objektträger werden mit einer wässrigen Glycerinlösung (1:1 in Aqua dest.) eingedeckt und es werden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (200 fache Vergrößerung) angefertigt.

Die Auswertung dieser Aufnahmen erfolgt mit dem Programm *ImageJ*. Mit Hilfe zweier selbst erstellter Makros wird für jedes Bild der mittlere Grauwert ( $GW_{\text{Hintergrund}}$ ) des Hintergrundes sowie der mittlere Grauwert ( $GW_{\text{Färbung}}$ ) der Färbung ermittelt (Abbildung 17). Gleiches wird für die Negativkontrolle (entspricht Färbung ohne Primärantikörper) vorgenommen.



```

un("Set Scale...", "distance=0
known=0 pixel=1 unit=pixel");

run("Threshold...");

setAutoThreshold("Mean");

run("Analyze Particles...",
"size=600-Infinity display clear
add");

String.copyResults();
    
```

```

run("Set Scale...", "distance=0
known=0 pixel=1 unit=pixel");

run("Gaussian Blur...",
"sigma=2");

setAutoThreshold("Huang dark");

call("ij.plugin.frame.ThresholdAd
juster.setMode", "Red");

run("Analyze Particles...",
"size=1000-Infinity display clear
include add");
    
```

**Abbildung 17: Exemplarische Ermittlung der Grauwerte einer immunzytochemischen Färbung.** Mit Hilfe der Makros (Unten) werden aus dem Originalbild (Oben) Hintergrund (Mitte, links) und Färbung (Mitte, rechts) ermittelt und als ROIs gekennzeichnet (rot). Für jede ROI wird der Mittlere Grauwert der Fläche (rot) durch *ImageJ* berechnet. (20x Objektiv).

---

Die Differenz dieser Grauwerte wird durch den Grauwert der Negativkontrolle dividiert, um das Signal – Rausch – Verhältnis der spezifischen zur unspezifischen Färbung zu quantifizieren:

$$\text{Signal - Rausch - Verhältnis} = \frac{(\text{GW}_{\text{Färbung}} - \text{GW}_{\text{Hintergrund}})}{(\text{GW}_{\text{unspez. AK-Bindung}} - \text{GW}_{\text{Hintergrund NK}})}$$

### 3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkungen eines Energiemangels durch den Vorenthalt von Energieträgern auf Neurone und insbesondere deren Glucose- und Lactattransporter zu untersuchen. Neurone können sowohl Glucose und Pyruvat als auch Glutamin als Energiequelle nutzen (McKenna, 2007; Amaral *et al.*, 2011). Die Untersuchung der Auswirkungen eines Glutaminentzugs wird meist im Rahmen von Tumorerkrankungen durchgeführt und die verwendeten Zelllinien haben keinen neuronalen Ursprung (Bernfeld *et al.*, 2018; Kappler *et al.*, 2019). Daher legt die vorliegende Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Rolle von Glutamin in der verwendeten neuronalen Zelllinie gelegt. In den folgenden Experimenten wird daher der Zusammenhang zwischen Glucose- und Pyruvatangebot in Kombination mit Glutaminverfügbarkeit auf die Regulation diverser Glucose- und Lactattransporter anhand von SH-SY5Y Zellen untersucht. Die Auswirkungen auf Transkription, Translation und Translokalisierung der Glucose- und Lactattransporter stehen hierbei im Vordergrund. Abschließend werden potentielle Regulationsmechanismen, welche diesen Auswirkungen zugrunde liegen können, mittels Inhibitoren identifiziert.

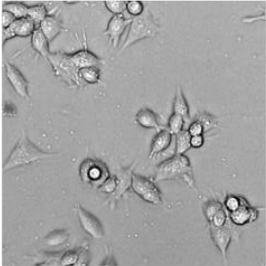
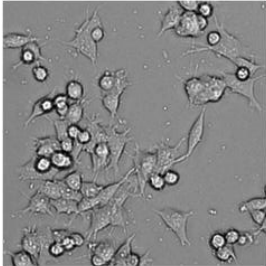
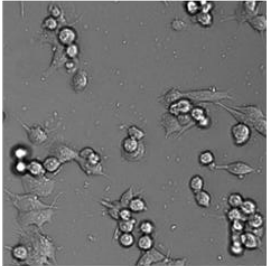
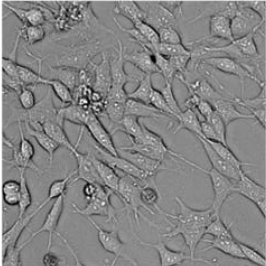
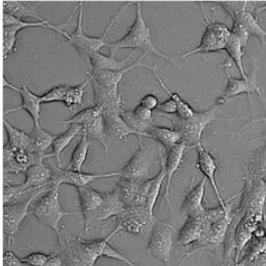
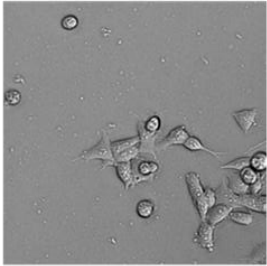
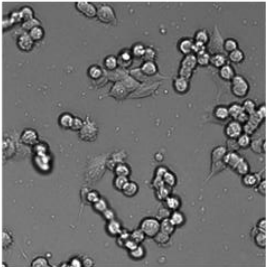
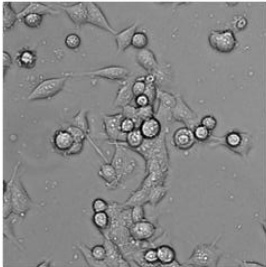
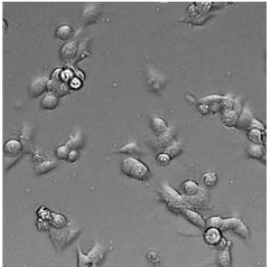
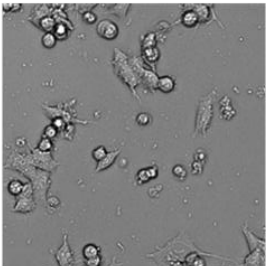
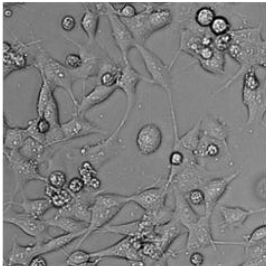
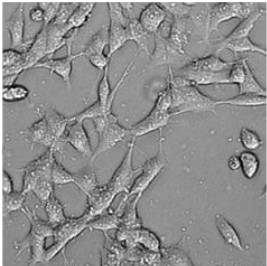
#### 3.1 Beeinträchtigung der Proliferation durch langfristigen Glucoseentzug

Neben der vorliegenden Arbeit haben Ding *et al.*, 2018, Dravid *et al.*, 2021 und Kourti *et al.*, 2022 mit SH-SY5Y Zellen gearbeitet. In den Arbeiten von Ding *et al.* 2018 und Kourti *et al.* 2022 wurde bereits an SH-SY5Y Zellen mit Glucoseentzug von bis zu 24 Stunden gearbeitet. Hierbei wurden die Zellen stets auch einer Hypoxie ausgesetzt um als *in vitro* Modell für eine Ischämie zu dienen. Im Rahmen dessen haben Ding *et al.* 2018 bereits nach sechs Stunden ein verstärktes Absterben der Zellen beobachtet. Es ist unklar in welchem Ausmaß hierfür der Glucoseentzug oder die zusätzliche Hypoxie ursächlich war. Es ist insbesondere nicht auszuschließen, dass bereits ein alleiniger Glucoseentzug von länger als sechs Stunden zu einer Beeinträchtigung der Vitalität und Proliferation von SH-SY5Y Zellen führen kann.

Aufgrund dessen wird zunächst untersucht, inwieweit die verwendeten Mangelbehandlungen Auswirkungen auf Vitalität und Proliferation der Zellen haben.

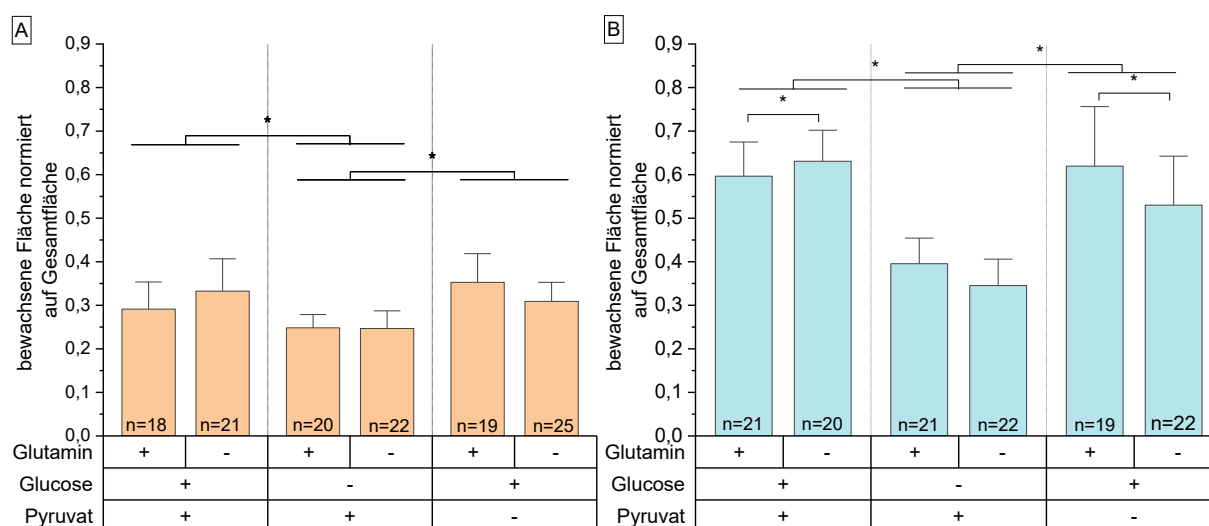
Mittels Trypanblaufärbung kann die Gesamtzahl sowie die Zahl lebender und toter Zellen bestimmt werden (Tennant, 1964). Trypanblau kann nicht über intakte Zellmembranen diffundieren und färbt somit tote Zellen mit poröser Membran an. Da Trypanblau längerfristig toxisch für die Zellen ist (Tennant, 1964), kann die Anzahl der lebenden und toten Zellen kurz nach dem Aussäen und nach 24 Stunden nicht an denselben Zellen durchgeführt werden. Führt eine der Mangelbehandlungen zu einem vermehrten Absterben der SH-SY5Y Zellen im Vergleich zum Vollmedium wäre dies durch einen signifikanten Anstieg Trypanblau gefärbter Zellen gekennzeichnet. Eine Beeinträchtigung der Proliferation der Zellen würde sich in einer geringeren Zellzahl abbilden. Dies ist für die Auswertung der Kernexperimente dieser Arbeit wichtig, um alterierte Zellzahlen gegebenenfalls mittels Korrekturfaktoren in den Messwerten abbilden zu können.

Hierfür werden die Zellen sowohl für drei Stunden als auch für 24 Stunden unter entsprechenden Bedingungen inkubiert und abschließend mit Trypanblau angefärbt (Abbildung 18). Für jedes Well wird eine repräsentative mikroskopische Aufnahme angefertigt. Mittels *Image J* wird die bewachsene Fläche dieser Bildausschnitte gemessen und der Mittelwert der bewachsenen Fläche aller Wells der gleichen Behandlung berechnet.

3 Stunden			
			
Glutamin	+	-	+
Glucose	+	+	-
Pyruvat	+	+	+
3 Stunden			
			
Glutamin	-	+	-
Glucose	-	+	+
Pyruvat	+	-	-

**Abbildung 18: Mikroskopische Aufnahmen von SH-SY5Y Zellen nach drei und 24 stündiger Behandlung mit Mangelmedien.** Die dargestellten Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte der Aufnahmen, welche der Auswertung der Wachstumsfläche und der Versuche mit Trypanblau zugrunde liegen (200 fache Vergrößerung).

Bereits in den mikroskopischen Durchlichtaufnahmen (Abbildung 18) zeigen sich Unterschiede bezüglich der bewachsenen Fläche zwischen glucosehaltigen Medien und Glucosemangelmedien. Während der dreistündigen Mangelbehandlungen sind keine auffälligen Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen erkennbar. Im 24 stündigen Versuchszeitraum erscheinen die Zellzahlen bei Glucosemangel deutlich reduziert. Dieser Eindruck wird durch die statistische Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen hinsichtlich ihrer bewachsenen Fläche mittels ANOVA bestätigt (Abbildung 19). Neurone nutzen bei Mangel an Glucose und Pyruvat Glutamin als Energiequelle um ihr Überleben zu sichern (McKenna, 2007; Amaral *et al.*, 2011). Daher werden in den folgenden Darstellungen Glutaminan- und -abwesenheit direkt gegenübergestellt.



**Abbildung 19: Durchschnittliche bewachsene Fläche normiert auf die Gesamtfläche (Area Pixelanzahl/ Gesamtpixel Bild) nach Mangelbehandlung.** A: Normierte Mittelwerte der bewachsenen Flächen nach 3 stündiger Behandlung mit Mangelmedien. B: Normierte Mittelwerte der bewachsenen Flächen nach 24 stündiger Behandlung mit Mangelmedien. Die statistische Auswertung erfolgt mittels zweifaktorieller ANOVA zu dem durch Bonferroni Korrektur adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ . Glutamin wird als ein Faktor betrachtet, Glucose und Pyruvat als zweiter Faktor. Als „n“ gilt die Anzahl ausgewerteter Wells pro Versuchsbedingung.

Von zentraler Bedeutung sind die Unterschiede der Glucosemangelmedien nach drei und 24 stündiger Behandlungsdauer. Im Vergleich zu der Kontrollbedingung zeigt sich hier eine bis zu 50 % geringer bewachsene Fläche. Die auftretenden Effekte durch Glutaminmangel nach 24 Stunden zeigen im Vergleich dazu minimale Änderungen der bewachsenen Fläche ohne

einheitliche Tendenz. Dies deutet auf ein geändertes Proliferationsverhalten hin. Um dies zu bestätigen wurde der Anteil toter Zellen nach drei und nach 24 Stunden Mangelbehandlung ermittelt. Hierfür wird die durchschnittliche Fläche bestimmt, welche eine Zelle belegt. So wird anhand der bewachsenen Gesamtfläche die Zellzahl in jedem Well berechnet. Daraus wird mit der Anzahl gefärbter Zellen der Anteil toter Zellen an der Zellgesamtheit bestimmt (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl nach Mangelbehandlung und Versuchszeitraum.** Als „n“ gilt die Anzahl der Wells je Versuchsbedingung.

Glutamin	+	-	+	-	+	-
Glucose	+	+	-	-	+	+
Pyruvat	+	+	+	+	-	-
3 Stunden	0,33 %	0,04 %	0,32 %	0,43 %	1,06 %	0,56 %
	n = 18	n = 21	n = 20	n = 22	n = 19	n = 25
24 Stunden	0,46 %	0,14 %	0,62 %	0,21 %	0,02 %	2,43 %
	n = 21	n = 20	n = 21	n = 22	n = 19	n = 22

**Tabelle 7: Zusammenfassung der ermittelten Korrekturfaktoren für zellzahlabhängige Methoden.** Die Tabelle basiert auf den gleichen Daten wie Abbildung 2 und listet die normierten Mittelwerte der bewachsenen Flächen für alle Behandlungen auf.

Glutamin	+	-	+	-	+	-
Glucose	+	+	-	-	+	+
Pyruvat	+	+	+	+	-	-
3 Stunden	0,29	0,33	0,25	0,25	0,35	0,31
24 Stunden	0,60	0,63	0,40	0,35	0,62	0,53

Der Anteil toter Zellen an der Zellgesamtheit wird mit unter 3 % als vernachlässigbar für die Auswertung der zellzahlabhängigen Messmethoden betrachtet. Hinsichtlich der unterschiedlichen Proliferation in den verschiedenen Mangelmedien bedarf es Korrekturfaktoren für jene Experimente, welche methodisch keine Änderung oder

Quantifizierung der Zellzahl zwischen Abschluss der Behandlung und Beginn der Messung erlauben. Folglich werden die normierten Mittelwerte der bewachsenen Fläche (Tabelle 7) zur Kompensation zellzahlinduzierter Effekte verwendet. Dies eliminiert Effekte, welche einzig auf einer alterierten Zellzahl basieren und ermöglicht den Vergleich der verschiedenen Mangelmedien innerhalb des gleichen Versuchszeitraums.

### **3.2 Langfristige Mangelbehandlungen beeinflussen Transkription und Translation von GLUT1 und MCT1**

Zunächst werden mit der Datenbank der *National Library of Medicine des National Center for Biotechnology Information* Artikel in Fachzeitschriften ermittelt, welche die Regulation und Expression von Glucose- und Lactattransporter behandeln. Anhand dieser Literatur wird eine Vorauswahl an potentiellen Transportern getroffen. Untersucht werden als Resultat dieser Recherche

- GLUT1 aufgrund seines ubiquitären Auftretens in Geweben (Zhao and Keating 2007)
- GLUT3 als Neuron spezifischer Glucosetransporter und wegen seines beschriebenen Translokationsmechanismus (Ferreira et al. 2011; Weisova et al. 2009; Zhao and Keating 2007)
- GLUT4 wegen seiner Assoziation mit Diabetes (Hajiaghaalipour et al. 2015)
- MCT1 als ubiquitär auftretender Lactattransporter (Halestrap and Meredith 2004)
- MCT2 aufgrund seiner Expression in Neuronen (Halestrap and Meredith 2004).

Diese Transporter werden in den nachfolgenden Experimenten hinsichtlich einer möglichen übergeordneten Koordination verschiedener Regulationsmechanismen und –prozessen untersucht. Die genannte Literatur hat einzelne Transporter unter verschiedensten Versuchsbedingungen, in verschiedenen Versuchszeiträumen, an unterschiedlichen Zellen und vor dem Hintergrund verschiedener Krankheitsbilder untersucht. Die vorliegende Arbeit hat das Ziel Auswirkungen durch den systematischen Entzug von Energieträgern auf die

genannten Transportern unter einheitlichen Bedingungen zu untersuchen um somit eine mögliche übergeordnete Regulation nachweisen zu können. Aus diesem Grund wird zunächst experimentell überprüft, ob die ausgewählten Transporter durch den systematischen Entzug verschiedener Energieträger beeinflusst werden, sowohl auf transkriptionaler als auch translationaler Ebene.

Um mögliche Auswirkungen auf die transkriptionale Regulation von Glucose- und Lactattransporter zu untersuchen, wird durch quantitative Real Time PCR der Gehalt an mRNA der jeweiligen Transporter unter den verschiedenen Mangelbedingungen ermittelt. Zur Erfassung transkriptorischer Änderungen werden Primerpaare für die jeweilige mRNA des untersuchten Transporters verwendet. Es wird stets die gleiche Menge der gesamten cDNA eingesetzt, wodurch der Endpunkt nach unterschiedlichen Zykluszahlen eintritt, je nach Anteil des untersuchten Transporters. Dies gibt ein relatives Verhältnis von mRNA Menge zueinander an. Hierdurch entfällt die Notwendigkeit der Kompensation von unterschiedlichen Zellzahlen. Es ist zu berücksichtigen, dass die Zykluszahl ein exponentielles Verhältnis angibt (Wen *et al.*, 2018).

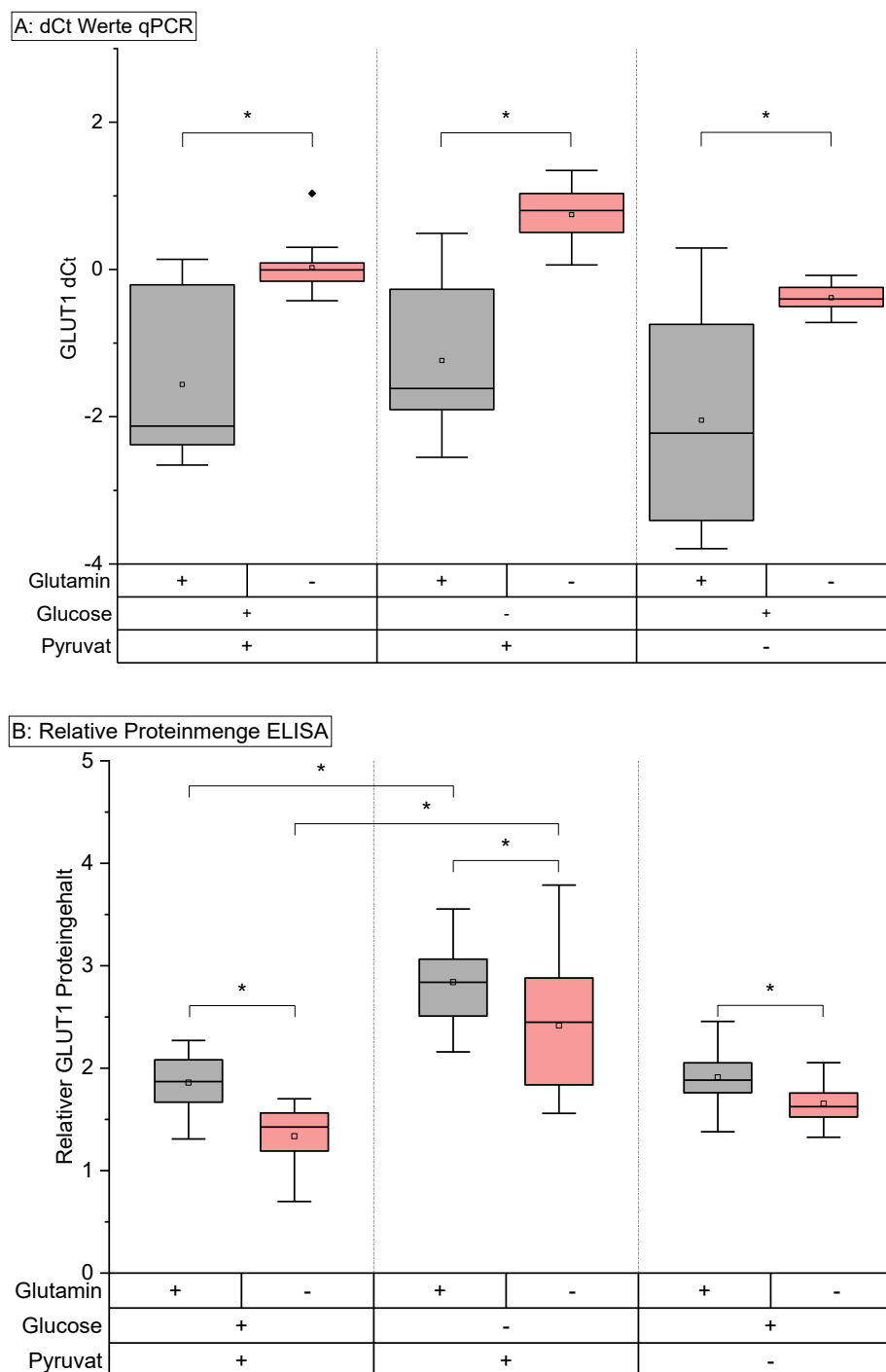
Die genannten Transporter wurden in vorherigen Arbeiten je nach Zelltyp und Fragestellung in Zeiträumen von 30 Minuten (Benomar *et al.*, 2006) bis zu 72 Stunden untersucht (Kappler *et al.*, 2019). Diese Arbeiten befassten sich jedoch nicht mit Glucose- oder Glutaminentzug. Arbeiten mit diesen Fragestellungen behandeln meist einen Versuchszeitraum von 24 Stunden (Dibble *et al.*, 2009; Bernfeld *et al.*, 2018). Deshalb wird die qPCR Analyse in der vorliegenden Arbeit nach 24 Stunden durchgeführt. Da keine Normalverteilung der Werte vorliegt, werden mögliche statistische Unterschiede mittels Kruskal-Wallis Test untersucht. Da es sich hier um multiple Vergleiche zwischen sechs verschiedenen Versuchsbedingungen handelt, erfolgt die statistische Auswertung zum mittels Bonferroni – Korrektur adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$ . Transporter, welche signifikante Änderungen in ihrem mRNA Gehalt aufweisen, werden zusätzlich auf translationaler Ebene mithilfe von ELISA untersucht.

Mit der ELISA Methode lassen sich durch spezifische Primärantikörper deren Antigene quantifizieren. Bei dieser Methode werden die Proteine aller Zellen detektiert, unabhängig davon, ob sie zum Zeitpunkt der Fixierung noch lebend oder bereits tot waren. Das Versuchsprotokoll wurde für die verwendeten Antikörper hinsichtlich Antikörperkonzentration und Inkubationszeit nach den Vorgaben von Pruslin *et al.*, 1991

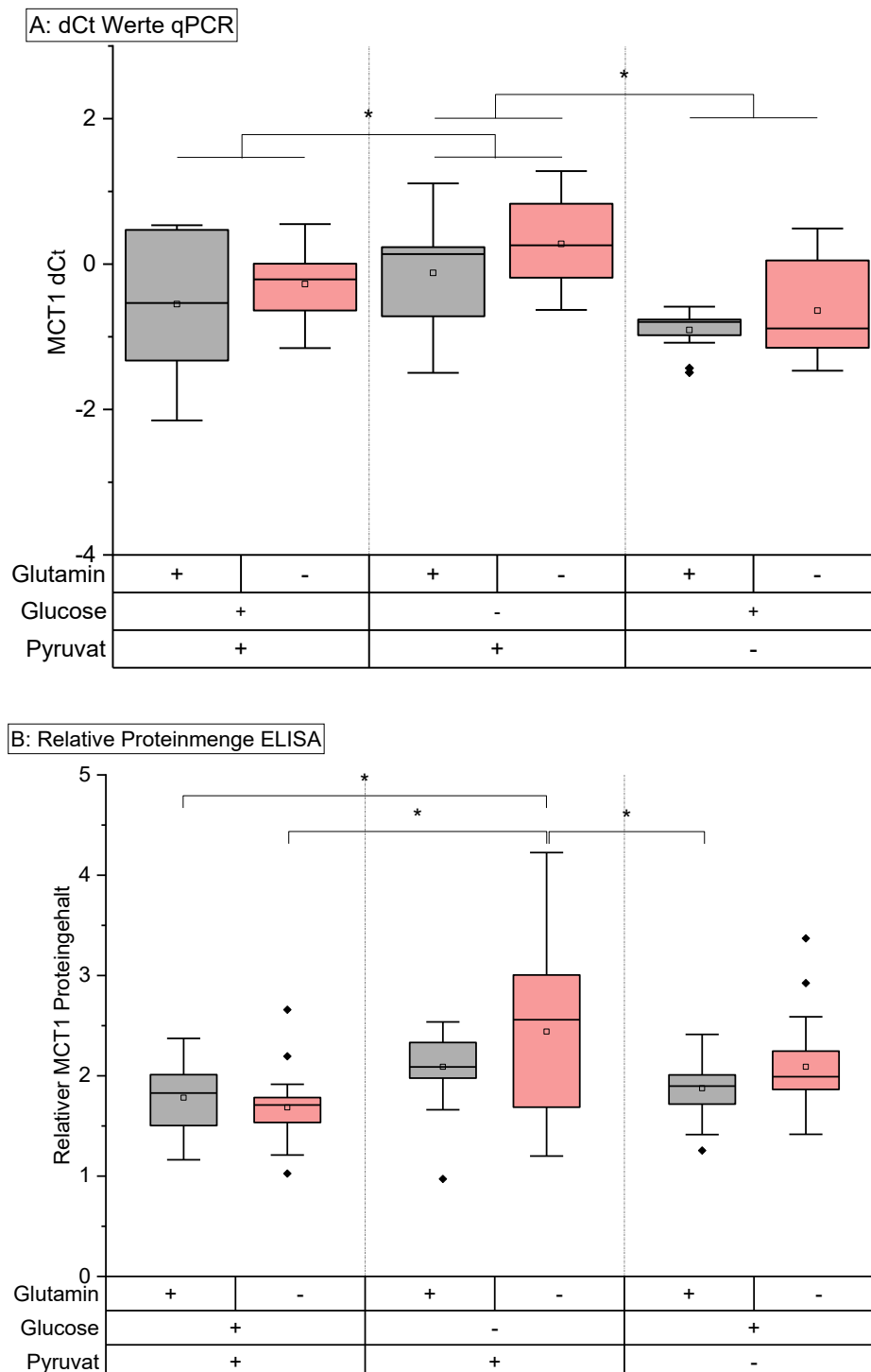
optimiert. Dies bedeutet, dass das Hintergrundsignal der Messungen unter 0,1 liegt und die Messkurven der Antikörper einen linearen, proportionalen Bereich aufweisen (siehe Kapitel 2.2.6 ELISA). Die relative Proteinmenge der Transporter wird nach 24 stündiger Mangelbehandlung bestimmt.

Die unterschiedlichen Zellzahlen zwischen den verwendeten Mangelbehandlungen werden durch die in Kapitel 3.1 ermittelten Faktoren korrigiert. Hierfür werden die ELISA Werte zunächst durch den Mittelwert der ELISA Platte dividiert und anschließend durch den für die vorliegende Mangelbehandlung ermittelten Korrekturfaktor.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Änderung der Regulation verschiedener Transporter bei auftretendem Energiemangel zu untersuchen. Statistisch erfolgt die Überprüfung mittels zweifaktorieller ANOVA, wobei jeder Energieträger als ein Faktor betrachtet wird. Da hierbei stets sechs verschiedene Bedingungen miteinander verglichen werden, wird zum Ausschluss von Effekten durch Fehlerkumulierung eine Bonferroni – Korrektur angeschlossen, welche zu dem adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$  führt.



**Abbildung 20: dCt Werte und Proteinmenge von GLUT1 nach 24 Stunden Mangelbehandlungen.** A: dCt Werte der qPCR. Der jeweilige dCt Wert ist die Differenz der Ct Werte von den experimentell genutzten Zellen und dem Standard, bestehend aus Zellhomogenat aus kultivierten SH-SY5Y. Für alle Bedingungen gilt  $n = 12$ , aufgrund einer Probenkontamination gilt für den kombinierten Glutamin- und Pyruvatmangel  $n = 11$ . Die statistische Auswertung erfolgt mit Kruskal – Wallis ANOVA hinsichtlich der beiden Faktoren Glutamin und Glucose bzw. Pyruvat. B: ELISA Proteinmenge GLUT1 mit für jede Bedingung  $n = 36$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgt mittels zweifaktorieller ANOVA. Glutamin wird hierbei als ein Faktor betrachtet, Glucose und Pyruvat als zweiter Faktor. Durch eine Bonferroni – Korrektur ergibt sich in beiden Fällen ein adjustiertes Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$ .



**Abbildung 21: dCt Werte und Proteinmenge von MCT1 nach 24 Stunden Mangelbehandlungen.** A: dCt Werte der qPCR. Der jeweilige dCt Wert ist die Differenz der Ct Werte von den experimentell genutzten Zellen und dem Standard. Für alle Bedingungen gilt  $n = 12$ . Die statistische Auswertung erfolgt mit Kruskal – Wallis ANOVA hinsichtlich der beiden Faktoren Glutamin und Glucose bzw. Pyruvat. B: ELISA Proteinmenge MCT1 mit für jede Bedingung  $n = 33$  für die beiden Medien mit Glucose und Pyruvat,  $n = 36$  für alle übrigen Bedingungen aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgt mittels zweifaktorieller ANOVA. Glutamin wird hierbei als ein Faktor betrachtet, Glucose und Pyruvat als zweiter Faktor. Durch eine Bonferroni – Korrektur ergibt sich in beiden Fällen ein adjustiertes Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$ .

GLUT 1 zeigt sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene einen Glutamineffekt, unabhängig von zusätzlichen Mangelbehandlungen (Abbildung 20). Auf Proteinebene ist zudem eine Abhängigkeit von Glucose und Pyruvat nachzuweisen. Während der Glutaminmangel sowohl GLUT1 mRNA als auch Proteingehalt senkt, erhöht ein Glucosemangel hauptsächlich den Proteingehalt. Auf mRNA Ebene ist für MCT1 ein Effekt durch die Glucosemangelbehandlung nachweisbar (Abbildung 21). Auf Proteinebene tritt zusätzlich eine Glutaminabhängigkeit auf.

Die beiden Glucosetransporter GLUT3 und GLUT4 zeigen durch keine der Mangelbedingungen signifikante Änderungen auf mRNA Ebene (Tabelle 8 und Tabelle 9). Die Zykluszahl der mRNA des Lactattransporters MCT2 liegt außerhalb des von Burns and Valdivia, 2008 ermittelten Detektionsbereiches ( $C_t > 36$ ), wodurch dieser Transporter in den verwendeten Zellen nicht nachweisbar ist.

**Tabelle 8: Verteilung der dCt Werte von GLUT3 nach 24 stündigen Mangelbehandlungen.** Für alle Bedingungen gilt  $n = 12$  aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgt durch Kruskal – Wallis ANOVA, zu dem adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  ergeben sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungen.

Behandlung		Median	Minimum	Maximum	p - Wert
Mit Glutamin	Mit Glucose	-1,715	-2,58	-1,12	1
	Ohne Glucose	-1,619	-2,745	-0,943	0,4884
	Ohne Pyruvat	-1,695	-2,52	0,372	0,9081
Ohne Glutamin	Mit Glucose	-1,3475	-2,22	-0,498	0,0282
	Ohne Glucose	-1,375	-1,91	-0,177	0,0885
	Ohne Pyruvat	-1,675	-2,52	-0,708	0,4983

**Tabelle 9: Verteilung der dCt Werte von GLUT4 nach 24 stündigen Mangelbehandlungen.** Für alle Bedingungen gilt  $n = 12$  aus drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgt durch Kruskal – Wallis ANOVA, zu dem adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,008$  ergeben sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungen.

Behandlung		Median	Minimum	Maximum	p - Wert
Mit Glutamin	Mit Glucose	-1,5665	-1,817	-1,327	1
	Ohne Glucose	-2,384	-2,627	-1,267	0,0243
	Ohne Pyruvat	-1,614	-3,372	-0,386	0,8852
Ohne Glutamin	Mit Glucose	-1,8045	-2,197	-0,921	0,0209
	Ohne Glucose	-1,6045	-1,997	-1,222	0,7289
	Ohne Pyruvat	-2,032	-2,947	-1,286	0,0139

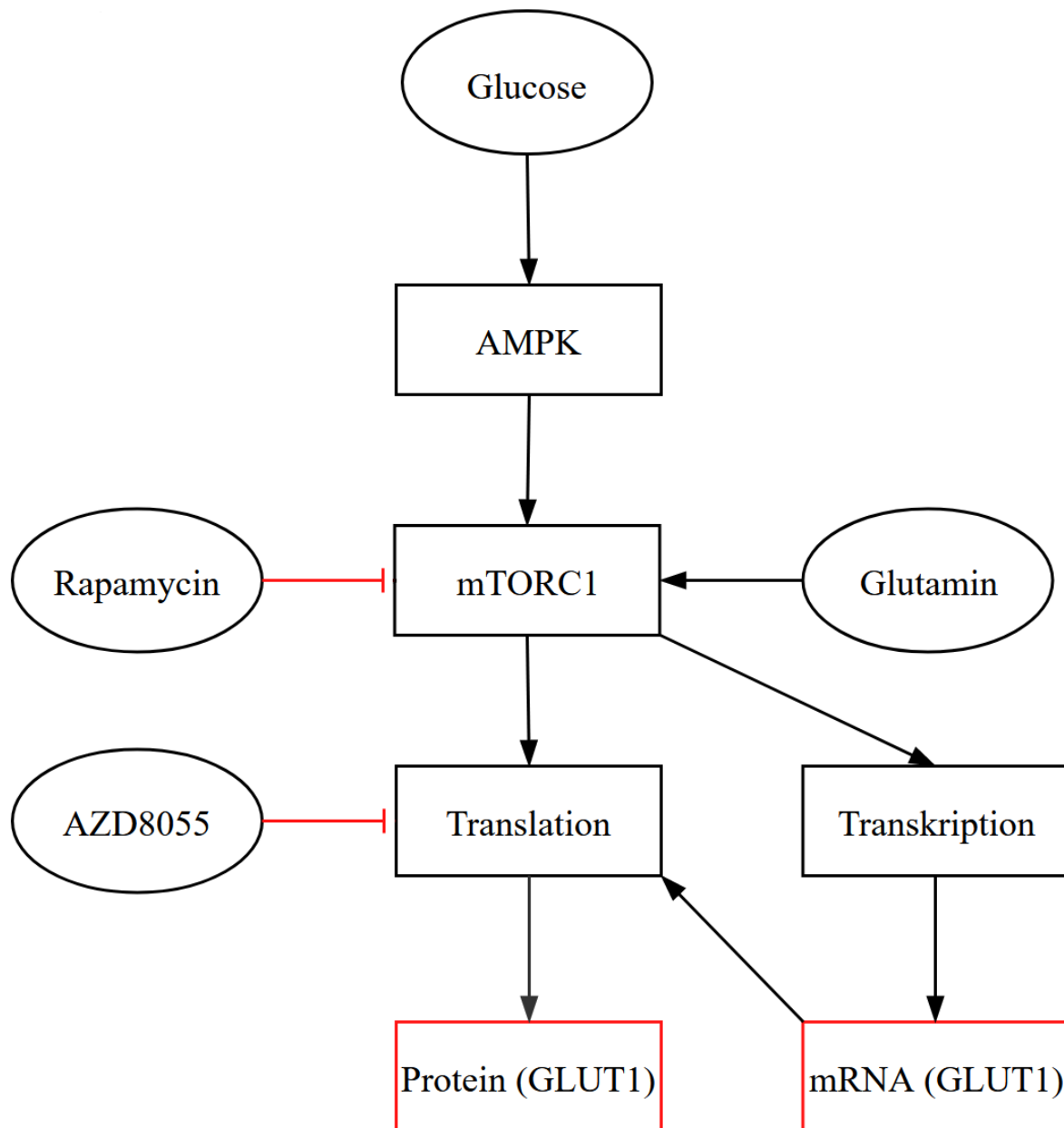
Zusammenfassend erweisen sich Glutamin und Glucose als die Energieträger, welche den größten Einfluss auf die Glucose- und Lactattransporter nehmen. So weist GLUT1 auf mRNA und Proteinebene eine Glutaminabhängigkeit auf, sowie eine Glucoseabhängigkeit bei der Translation. Gleiches ist bei dem Lactattransporter MCT1 auf Proteinebene zu beobachten. Die Pyruvatmangelbedingungen haben im Vergleich hierzu keinen nennenswerten Einfluss. Daher werden im Folgenden diese beiden Transporter vor dem Hintergrund von Glucose- und Glutaminmangel sowie der Kombination beider Mängel hinsichtlich ihrer Regulationskaskaden untersucht. Hierfür werden anhand der Literatur potentielle Regulatoren vorselektiert. Anschließend werden durch Versuche mit Inhibitoren, welche diese potentiellen Regulatoren inhibieren, untersucht, ob und welche Auswirkungen diese auf die beiden Transporter GLUT1 und MCT1 haben.

### 3.3 Glutamin und Glucose beeinflussen Glucose- und Lactattransporter über mTORC1 und HIF1 $\alpha$

Die vorangegangenen Versuche haben Glucose und Glutamin als Einflussfaktoren der beiden Transporter GLUT1 und MCT1 nachgewiesen. Hierbei zeigte GLUT1 vornehmlich Effekte auf Transkriptionsebene, MCT1 eher auf Translationsebene. Daher kommt anhand der

Literatur mTOR, insbesondere mit seinem Komplex mTORC1 (RAPTOR), als potentieller Teil einer Regulationskaskade in Betracht. Hier laufen in einer Zelle sowohl das Glutamin- als auch das Glucosesignal zusammen (Bernfeld et al. 2018). Daher wird mTORC1 als „Glutaminsensor“ der Zelle bezeichnet und reguliert zudem Translationsmechanismen (Zaza et al. 2018) (Abbildung 22).

Auf Grund dieser Hypothese zur translationalen Regulation der Glucose- und Lactattransporter, befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Untersuchung der mTORC1 vermittelten Translationswege. Ziel ist es herauszufinden, ob einer dieser Translationsmechanismen Einfluss auf die Proteinmenge eines oder mehrerer der untersuchten Transporter bei Glutamin- oder Glucosemangel hat. Hierfür werden die Inhibitoren Rapamycin und AZD8055 eingesetzt. Rapamycin inhibiert mTORC1 selektiv (Neasta et al. 2014), während AZD8055 unspezifisch die mTORC1 hemmt (Chresta et al. 2010).

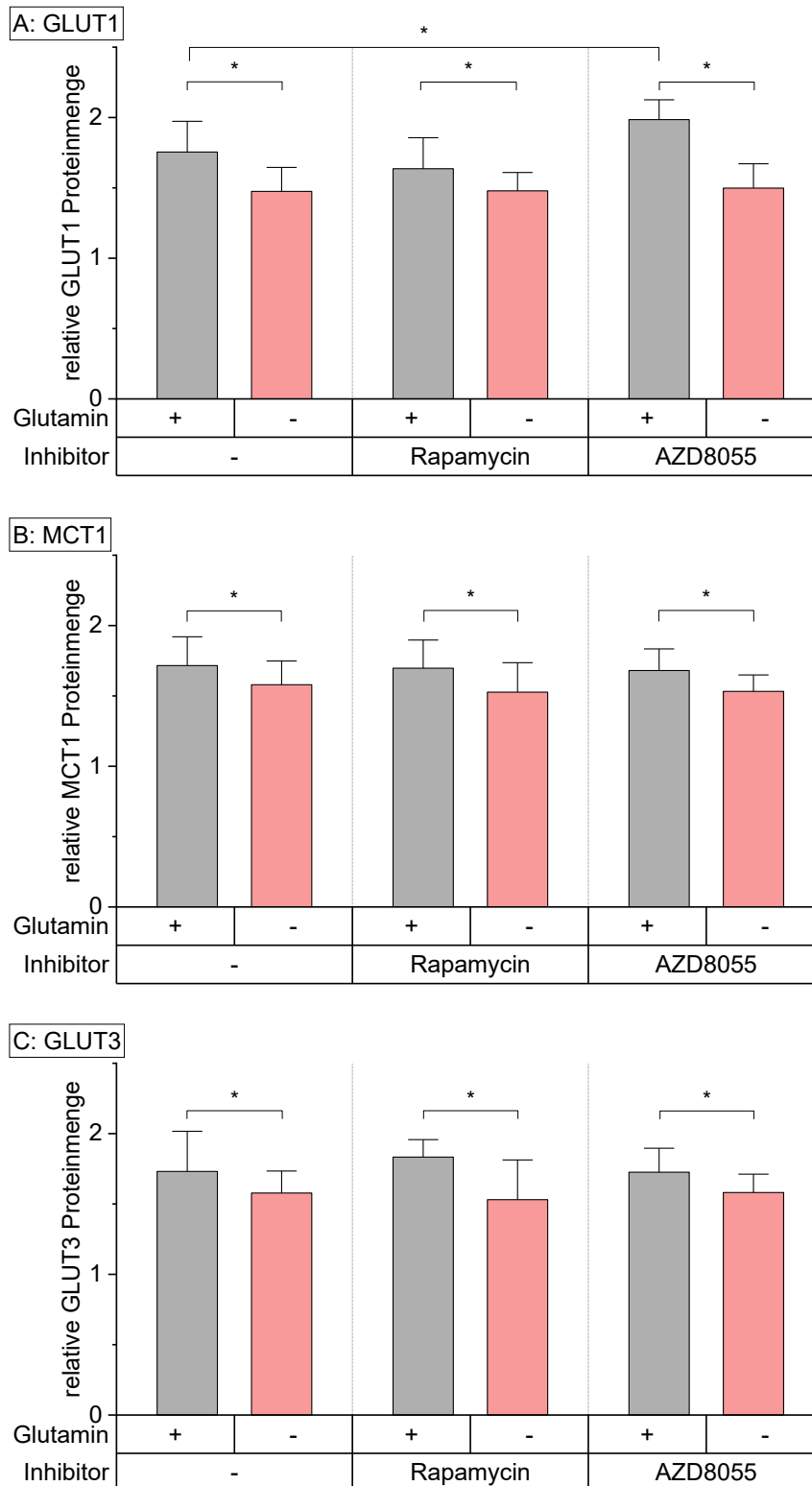


**Abbildung 22: Arbeitshypothese des Zusammenhangs zwischen Glutamin, Glucose, mTORC1 und Proteingehalt.** Glutamin kann laut Bernfeld et al. 2018 direkten Einfluss auf mTORC1 nehmen, während Glucose indirekt über AMPK Einfluss auf mTORC1 nimmt. Rot dargestellt sind die experimentell messbaren Größen sowie die experimentelle Beeinflussung mittels der verwendeten Inhibitoren.

### 3.3.1 AZD 8055 erhöht den GLUT1 Proteingehalt bei Glutamingabe

Zunächst wird der Glutamineffekt auf Proteinebene von GLUT1 aus den vorangegangenen Experimenten näher untersucht. Sollte mTORC1 Einfluss auf die Transkription von GLUT1 mRNA nehmen könnte sich dies langfristig auf die Proteinmenge niederschlagen. In diesem speziellen Fall müsste durch den Einsatz der Inhibitoren Rapamycin und AZD8055 ein Effekt ähnlich des bereits beobachteten Glutamineffektes bei der GLUT1 Proteinmenge in Kapitel 3.2 auftreten (Abbildung 22).

Da MCT1 und GLUT3 keine Effekte bezüglich ihres mRNA Gehaltes auf die Glutaminmangelbehandlung zeigen, werden diese Transporter zum Vergleich auf die gleiche Weise untersucht. Hierfür werden ELISA der verschiedenen Behandlungsmedien durchgeführt, in den Behandlungen ohne Rapamycin oder AZD8055 erfolgt eine Lösemittelkontrolle mit DMSO. Die statistische Auswertung erfolgt zunächst mittels zweifaktorieller ANOVA. Werden hierbei Signifikanzen nachgewiesen, wird mittels einfaktorieller ANOVA ermittelt welche Effekte im speziellen hierfür ursächlich sind. Die Ergebnisse der abschließenden einfaktoriellen ANOVA werden grafisch dargestellt.



**Abbildung 23: Relativer Gehalt an GLUT1, MCT1 und GLUT3 nach 24 h Behandlung mit AZD 8055 (A) oder Rapamycin (R).** Mit ELISA bestimmte relative Proteinmenge von GLUT1 (A), MCT1 (B) und GLUT3 (C) mit jeweils n = 102 für Behandlungen ohne Inhibitoren, n = 54 für die Rapamycinbehandlung und n = 48 für die AZD8055 Behandlung aus drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die, mittels einfaktorieller ANOVA zu dem, aus der Bonferroni – Korrektur resultierenden, adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  signifikanten, Glutamin- und Glucoseeffekte.

Mittels zweifaktorieller ANOVA, bei der Glutamin als ein Faktor und die Inhibitoren als zweiter Faktor angesehen werden, ist sowohl mit als auch ohne Inhibitoren ein Glutamineffekt nachweisbar. Der Glutamineffekt ist bei allen untersuchten Transportern auch nach Inhibitorgabe messbar (Abbildung 23 A bis C). Bei GLUT1 lässt sich ein Effekt durch AZD8055 auf den Proteingehalt nachweisen, der Proteingehalt der anderen getesteten Transporter bleibt bei Inhibitorgabe unbeeinflusst. AZD8055 hat Einfluss auf den GLUT1 Proteingehalt und erhöht diesen, entgegen der Erwartung, bei Glutamingabe (Abbildung 23 A). Folglich muss angenommen werden, dass die glutaminabhängigen Änderungen des GLUT1 Proteingehalts nicht von mTORC1 verursacht werden.

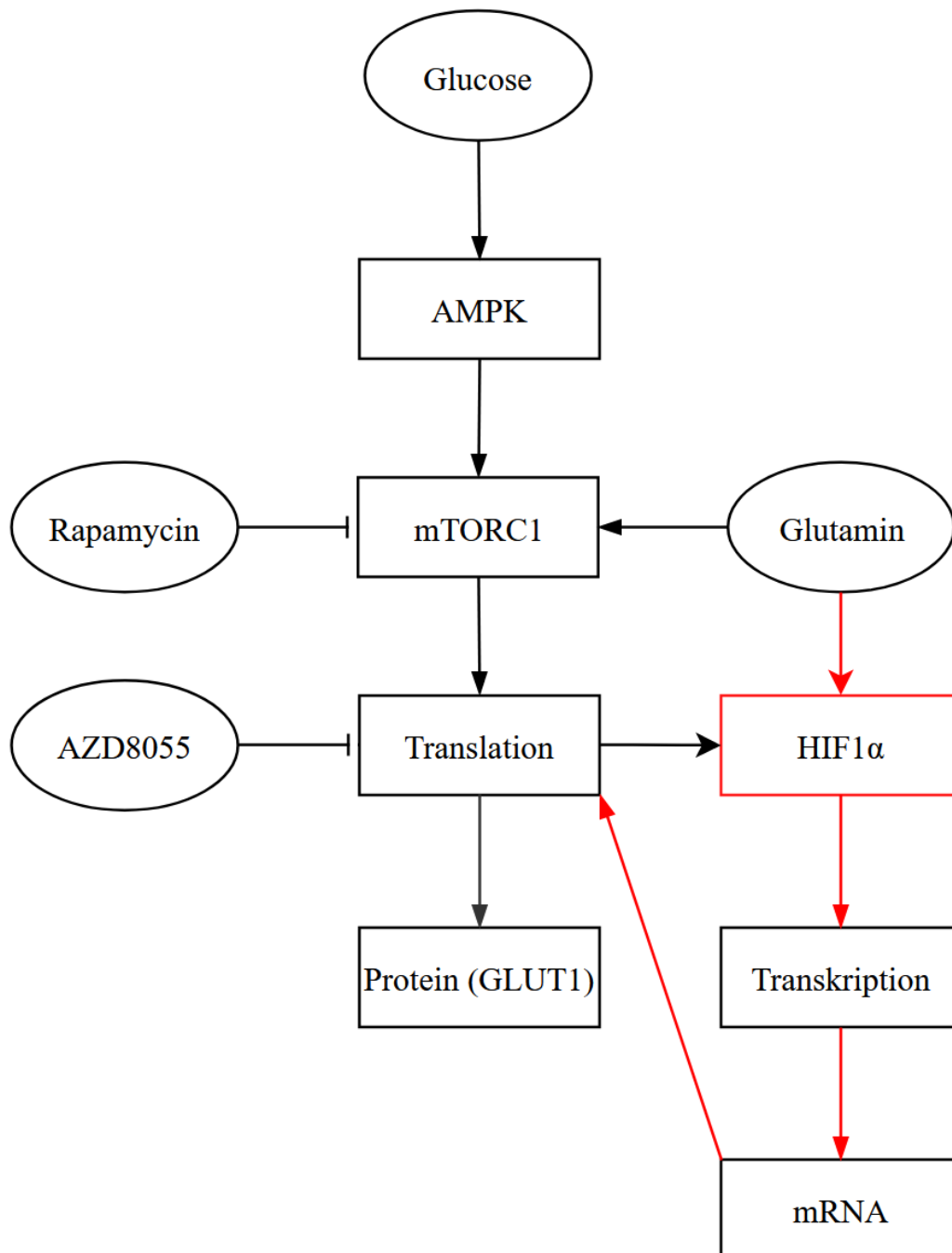
### **3.3.2 Glutamin stabilisiert HIF1 $\alpha$ und Glucose beeinflusst die mTORC1 / S6K1 vermittelte HIF1 $\alpha$ Translation**

Zusammenfassend beeinflusst Rapamycin die glutaminabhängigen Änderungen auf Proteinebene bei den getesteten Transportern nicht. Lediglich AZD 8055 kann den Glutamineffekt auf Proteinebene beeinflussen, dies gilt jedoch ausschließlich für GLUT1. Diese Beobachtungen sprechen für mindestens einen weiteren glutaminabhängigen Regulator von GLUT1.

In die Regulation der mTORC1 vermittelten Transkription von GLUT1 Protein ist der Transkriptionsfaktor HIF1 eingebunden, die exakte Beteiligung an dem Regulationsmechanismus ist aber weitestgehend unbekannt (Guo et al. 2008; Hao et al. 2019). Gesichert ist, dass die mTORC1 vermittelte Phosphorylierung von S6K1 die Translation von HIF1 $\alpha$  erhöht und somit auch die Konzentration des Transkriptionsfaktors HIF1 (Laughner et al. 2001; Semenza 2010). Durch Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  durch Glutamin (Kappler *et al.*, 2019) könnte somit mTORC1 als Regulator umgangen werden (Abbildung 24). Daher wird als nächster Schritt der Zusammenhang zwischen Glutamin und HIF1 $\alpha$  bei den verwendeten Mangelbedingungen näher untersucht.

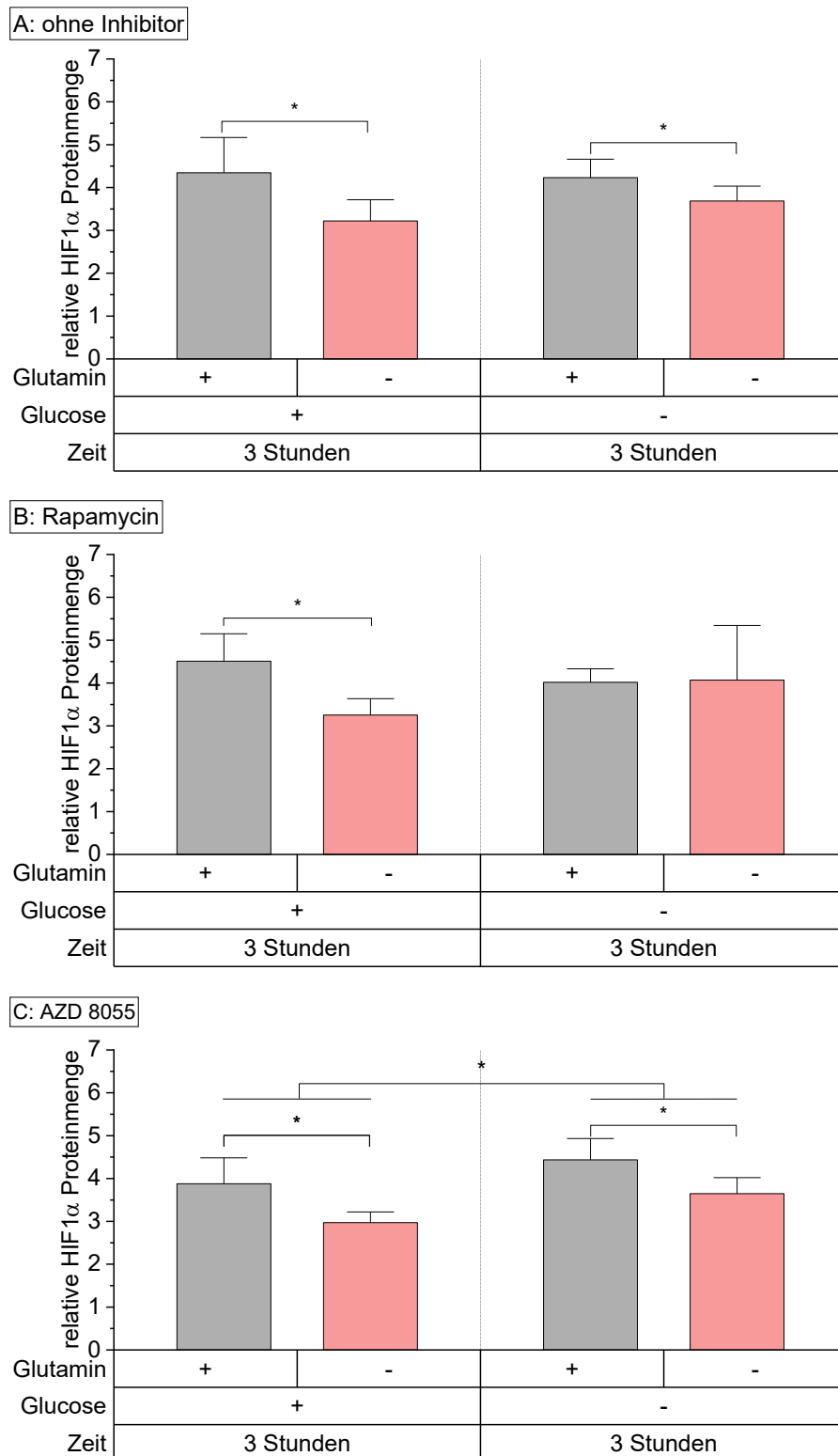
Da HIF1 bekannt für drastische Konzentrationsänderungen innerhalb kürzester Zeit ist, werden alle Experimente mit Mangelmedien und Inhibitoren zusätzlich mit einem dreistündigen Versuchszeitraum durchgeführt welcher auch in der Literatur mehrfach für die

Untersuchung von HIF1 abhängigen Prozessen verwendet wurde (Guo *et al.*, 2008; Ramamoorthy and Shi, 2014).



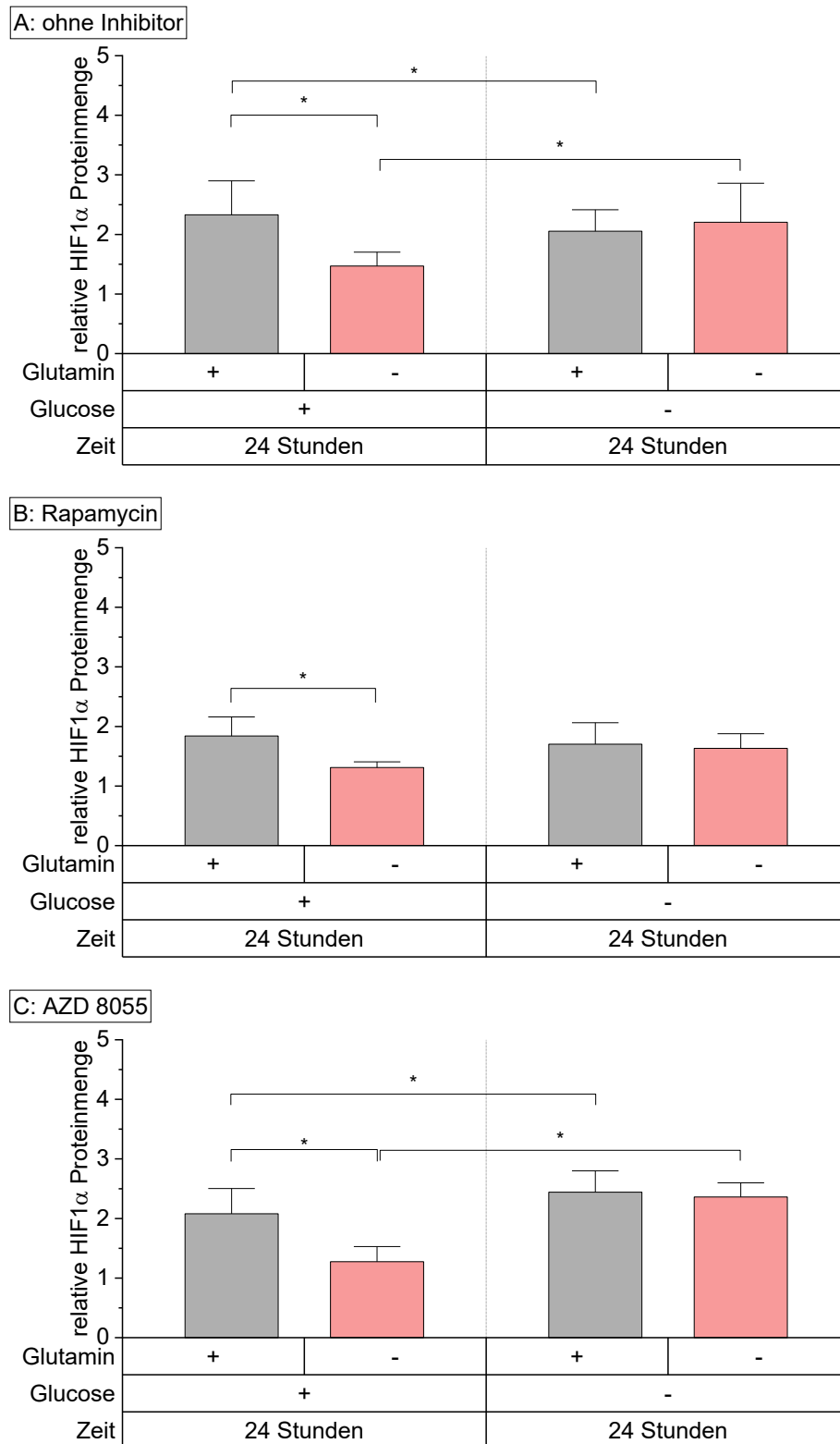
**Abbildung 24: Schema der vermuteten Beteiligung von HIF1 $\alpha$  an der Regulation von GLUT1.** Die Beteiligung von mTORC1 wird durch die Gabe von Rapamycin untersucht, die mTORC1 vermittelte Translation durch die Gabe von AZD8055. Die hypothetische Umgehung von mTORC1 mittels HIF1 $\alpha$  Stabilisierung durch Glutamin ist rot dargestellt.

Wie in den vorangegangenen Experimenten werden mit Rapamycin und AZD8055 die Translationskaskaden untersucht. Hierbei wird der Einfluss von Glucose- und Glutaminmangel untersucht, in den Behandlungen ohne Inhibitoren erfolgt eine Lösemittelkontrolle mit DMSO. Ist die mTORC1 / S6K Kaskade für die Translation von HIF1 $\alpha$  verantwortlich, so sollte der HIF1 $\alpha$  Proteingehalt bei Rapamycingabe sinken, AZD8055 hingegen sollte hingegen keine Auswirkungen haben. Sollte eine glutaminvermittelte Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  erfolgen, so sollte keiner der Inhibitoren einen Effekt auf den HIF1 $\alpha$  Proteingehalt bei Glutaminmangel haben.



**Abbildung 25: Relative Proteinmenge von HIF1 $\alpha$  nach drei stündigem Behandlungszeitraum.** A: Jede Behandlung mit  $n = 36$  aus drei unabhängigen Versuchen. B: Rapamycinbehandlung mit  $n = 18$  aus drei unabhängigen Versuchen. C: AZD8055 Behandlung mit  $n = 18$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA ergab keinen signifikanten Glucoseeffekt. Dargestellt sind die, mittels einfaktorieller ANOVA zu dem aus der Bonferroni – Korrektur resultierenden, adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  signifikanten, Glutamin- und Glucoseeffekte.

Mittels zweifaktorieller ANOVA, bei der Glutamin als ein Faktor und Glucose als zweiter Faktor angesehen wird kann ein allgemeiner Glutamineffekt auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 25 A). Bereits nach drei Stunden führt der Glutaminmangel zu einem signifikant geringeren HIF1 $\alpha$  Proteingehalt. Einzelvergleiche zeigen, dass unter Rapamycingabe Glutamin bei Glucoseentzug keinen zusätzlichen Effekt mehr hat (Abbildung 25 B). Bei Verwendung von AZD8055 tritt entgegen der Erwartungen neben dem Glutamineffekt ein Glucoseeffekt auf (Abbildung 25 C). Dies spricht für einen Regulationsmechanismus des HIF1 $\alpha$  Proteingehalts unter akutem Glucosemangel, welcher nicht mTORC1 / S6K assoziiert ist.



**Abbildung 26: Relative Proteinmenge von HIF1 $\alpha$  nach 24 stündigem Behandlungszeitraum.** A: Jede Behandlung mit  $n = 36$  aus drei unabhängigen Versuchen. B: Rapamycinbehandlung mit  $n = 18$  aus drei unabhängigen Versuchen. C: AZD8055 Behandlung mit  $n = 18$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA ergab einen signifikanten Glucose- und Glutamineffekt. Dargestellt sind die, mittels einfaktorieller ANOVA zu dem aus der Bonferroni – Korrektur resultierenden, adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  signifikanten, Glutamin- und Glucoseeffekte.

---

Mittels zweifaktorieller ANOVA, bei der Glutamin als ein Faktor und Glucose als zweiter Faktor angesehen wird, lassen sich im 24 stündigen Versuchszeitraum sowohl ein allgemeiner Glutamineffekt als auch ein Glucoseeffekt nachweisen. Dieser Glutamineffekt wird nicht durch die Inhibitorgabe beeinflusst. Der Glucoseeffekt ist bei Rapamycingabe nicht mehr nachweisbar. Nach 24 Stunden sind vergleichbare Glutamineffekte wie bereits nach 3 Stunden messbar (Abbildung 26 A & B). Bei kombiniertem Glucose- und Glutaminmangel ist der HIF1 $\alpha$  Proteingehalt gegenüber dem bei alleinigem Glutaminmangel erhöht, was durch Rapamycingabe nicht mehr nachweisbar ist (Abbildung 26 A & B). Dies spricht für eine Beteiligung der mTORC1 / S6K Kaskade an der Translation von HIF1 $\alpha$  bei Glucosemangel und für eine Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  durch Glutamin.

Zusammenfassend zeigt sich eine Regulation von HIF1 $\alpha$ , welche sowohl von Glutamin als auch von Glucose abhängig ist. Die Arbeitshypothese, dass eine glutaminabhängige Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  die Transkription von GLUT1 mRNA bei Glutaminmangel reguliert, wird durch diese Ergebnisse bekräftigt.

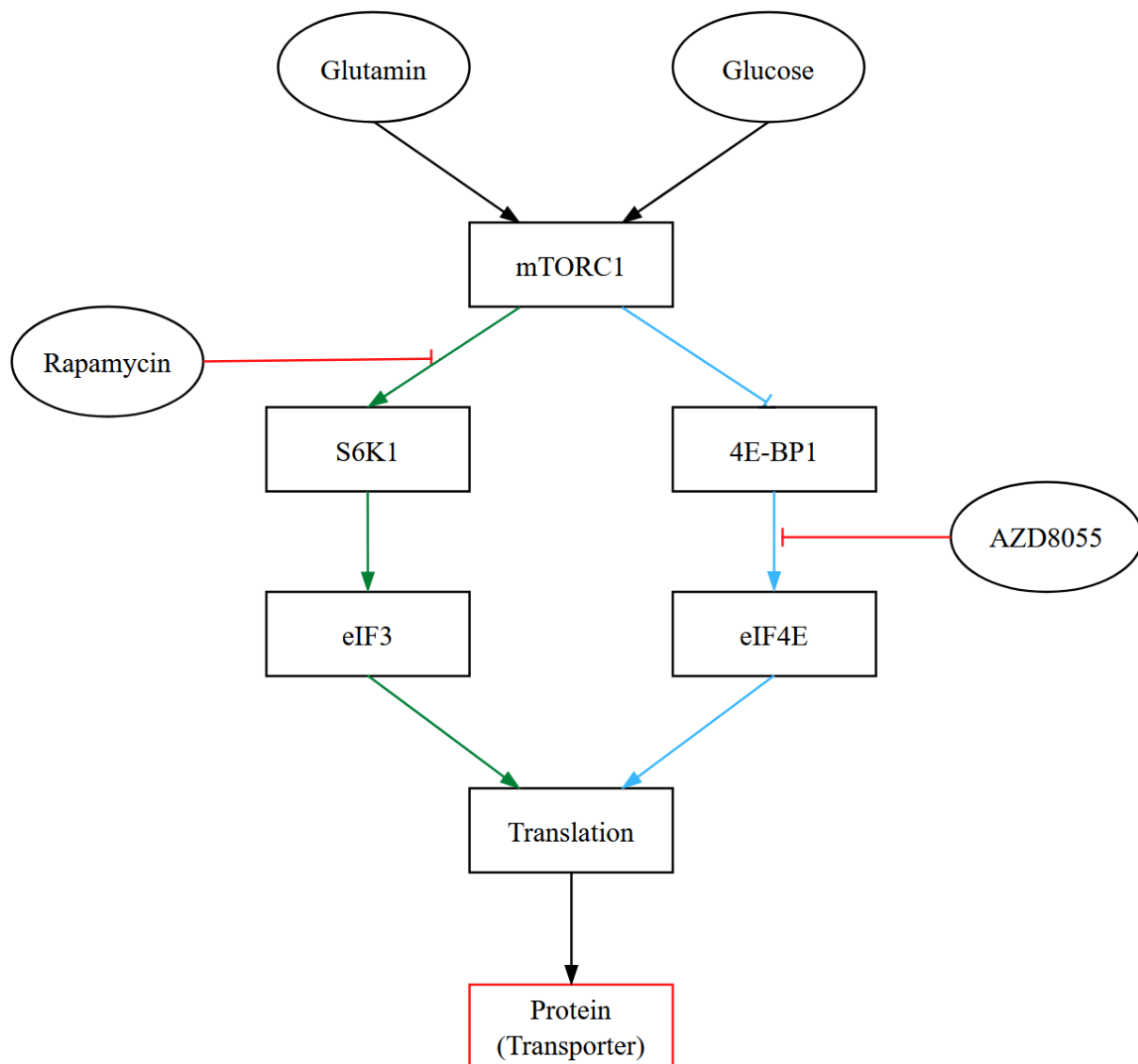
Der Effekt auf die HIF1 $\alpha$  Proteinmenge durch die Glucosemangelbehandlung und Rapamycin bestätigt die aufgestellte Arbeitshypothese, dass der bereits von Laughner et al. 2001 und Semenza 2010 beschriebene Zusammenhang von HIF1 $\alpha$  Translation mit der mTORC1 / S6K1 Kaskade auch glucoseabhängig ist. Dieses Ergebnis rückt die mTORC1 / S6K1 Kaskade als zentrale Regulationskaskade der Translation bei Glucosemangel in den Fokus.

Bei HIF1 $\alpha$  tritt der Glutamineffekt auf Proteinebene bereits im drei stündigen Versuchszeitraum auf während ein Glucoseeffekt erst im 24 stündigen Versuchszeitraum nachweisbar ist. Zusammenfassend stellen sich die Fragen, ob GLUT1, MCT1 und GLUT3 wie HIF1 $\alpha$  bei Glucosemangel auf Proteinebene von mTORC1 / S6K1 reguliert werden und in welchem Zeitraum die Regulation erfolgt. Aufgrund dessen werden die Proteinmengen der Transporter GLUT1, MCT1 und GLUT3 ebenfalls im drei stündigen Versuchszeitraum und hinsichtlich einer Regulation durch mTORC1 / S6K1 bei Glucosemangel untersucht.

---

### 3.3.3 mTORC1 vermittelte Translationsmechanismen beeinflussen GLUT1, MCT1 und GLUT3

Bei der Ermittlung der durch Glucose- und Glutaminentzug regulierten Glucose- und Lactattransporter zeichnen sich MCT1 und GLUT3 durch Effekte auf Proteinebene aus. Bei den anschließenden Experimenten zur mTORC1 und HIF1 Beteiligung an der GLUT1 Transkription lassen sich durch Glucosemangel verursachte Effekte auf den von mTORC1 vermittelten S6K Translationsmechanismus zurückführen. Der Translationsmechanismus, welcher für den Glutamineffekt auf Proteinebene insbesondere bei MCT1 und GLUT3 verantwortlich ist, wird näher betrachtet. In der Literatur finden sich verschiedene Hypothesen und Hinweise auf die mTORC1 vermittelten Translationskaskaden mTORC1 / S6K und mTORC1 / 4E-BP1 in Bezug auf Glucose- und Lactattransporter. So korreliert die Translationsrate von MCT1 unter Umständen mit der Phosphorylierungsrate von 4E-BP1 (Halestrap and Wilson 2012). Neben seiner ATP kompetitiven Wirkweise ist AZD8055 in der Lage die 4E-BP1 abhängige Translation zu hemmen, Rapamycin kann dies nicht (Chresta et al. 2010) (Abbildung 27).

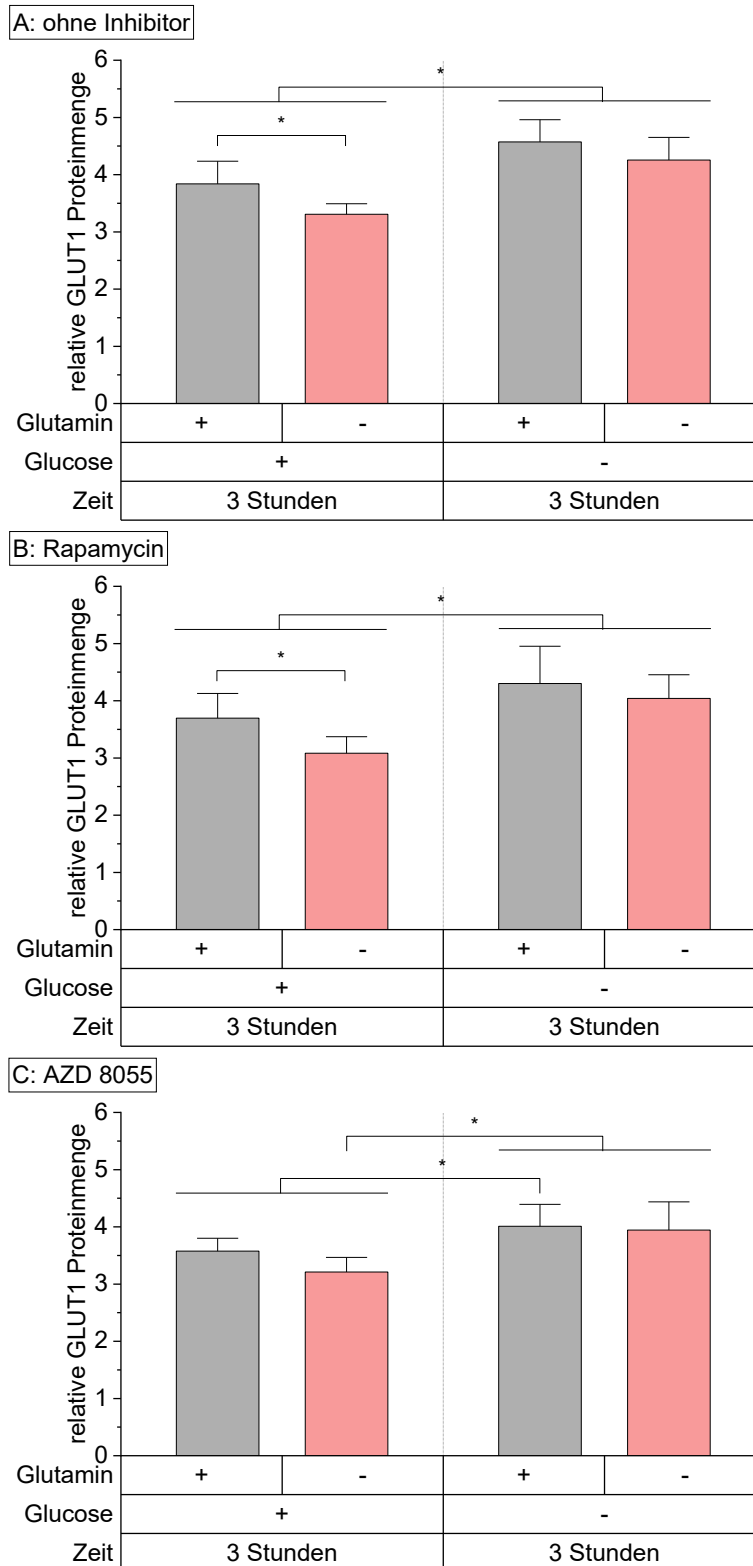


**Abbildung 27: Arbeitshypothese zu den mTORC1 vermittelten Translationsmechanismen.** Der hypothetische mTORC1 / S6K1 vermittelte Translationsmechanismus ist grün dargestellt, der hypothetische mTORC1 / 4E-BP1 vermittelte Translationsmechanismus blau. Rot dargestellt sind die Wirkweisen der experimentell verwendeten Inhibitoren und die experimentell messbare Größe. Die beiden Inhibitoren erlauben somit eine Unterscheidung zwischen der 4E-BP1 und der S6K1 vermittelten Translation.

Da die bisherigen Untersuchungen dieser Regulationskaskaden in der Literatur sich mit verschiedenen Krankheitsbildern (Guo *et al.*, 2008; Ramamoorthy and Shi, 2014; Bernfeld *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2018; Kourti *et al.*, 2022), einzelnen Transportern (Hao *et al.* 2019; Moldogazieva *et al.* 2020; Wincewicz *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2017) und unterschiedlichen Versuchszeiträumen (Guo *et al.*, 2008; Kourti *et al.*, 2022) befasst haben, können bisher keine

Rückschlüsse auf eine mögliche übergeordnete Regulationskaskade für Glucose- und Lactattransporter gezogen werden. Da dies Ziel der vorliegenden Arbeit ist, werden die in den vorangegangenen Versuchen untersuchten Transporter GLUT1, GLUT3 und MCT1 unter einheitlichen Versuchsbedingungen hinsichtlich ihrer Regulation durch die mTORC1 / S6K und mTORC1 / 4EBP1 abhängige Translation untersucht.

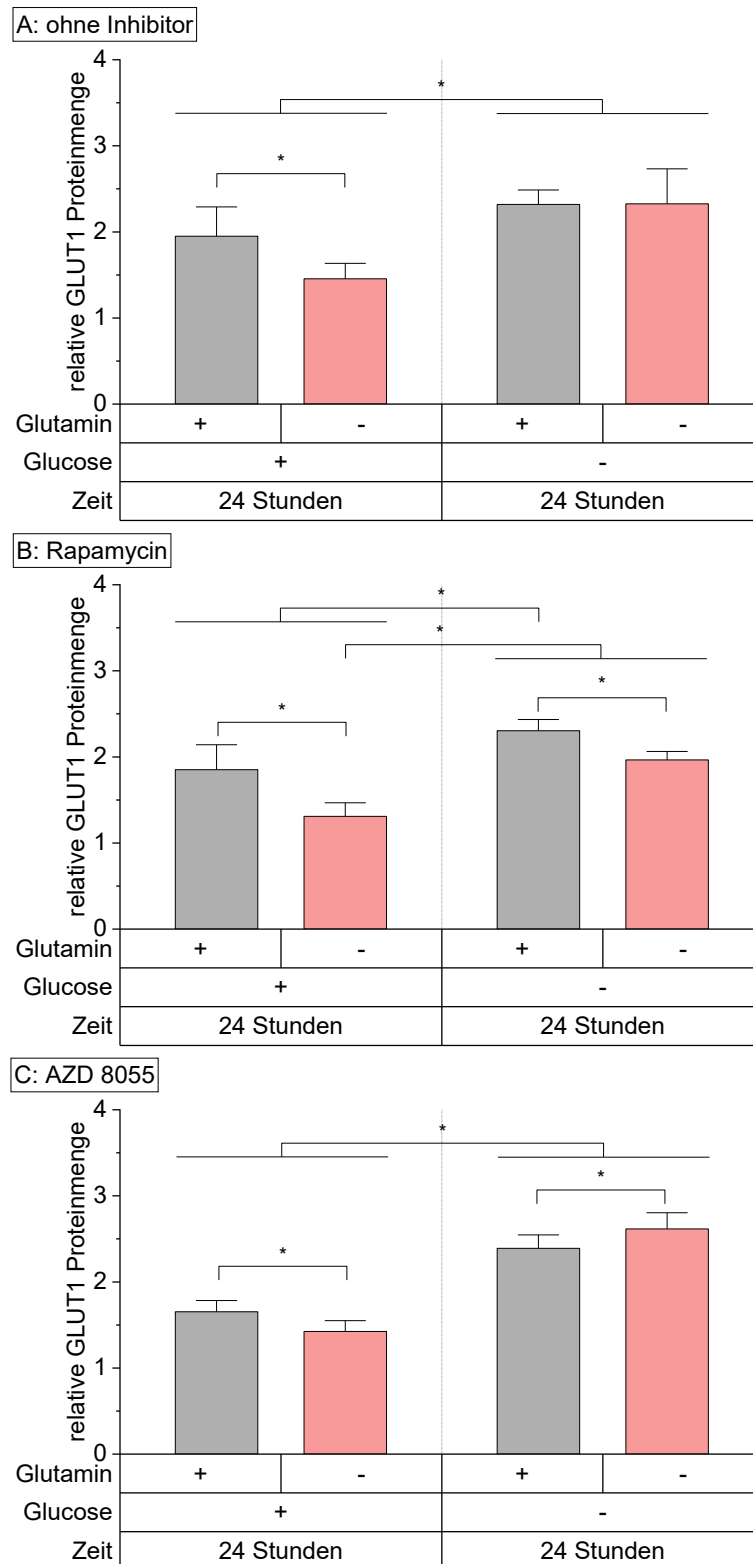
Um die schnellen Effekte abbilden zu können, werden die folgenden Versuche für die Transporter sowohl im drei als auch im 24 stündigen Versuchszeitraum durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist identisch mit dem Versuchsaufbau der ELISA Messung von HIF1 $\alpha$  in Kapitel 3.3.2., ebenso erfolgt die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA zu dem durch Bonferroni Korrektur adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .



**Abbildung 28: Relative Proteinmenge von GLUT1 nach drei stündigem Behandlungszeitraum.** A: Jede Behandlung mit  $n = 36$  aus drei unabhängigen Versuchen. B: Rapamycinbehandlung mit  $n = 18$  aus drei unabhängigen Versuchen. C: AZD8055 Behandlung mit  $n = 18$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA ergab einen signifikanten Glucose- und Glutamineffekt. Dargestellt sind die, mittels einfaktorieller ANOVA zu dem aus der Bonferroni – Korrektur resultierenden, adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  signifikanten, Glutamin- und Glucoseeffekte.

Mittels zweifaktorieller ANOVA, bei der Glutamin als ein Faktor und Glucose als zweiter Faktor angesehen werden weist GLUT1, einen allgemeinen Glutamin- und Glucoseeffekt bereits nach drei stündiger Mangelbehandlung auf (Abbildung 28 A). Entsprechend der Erwartung ist durch drei stündige Rapamycingabe der Glutamineffekt noch immer nachweisbar, ebenso der Glucoseeffekt (Abbildung 28 B). Bei AZD 8055 bleibt der Glucoseeffekt erhalten während ein Glutamineffekt nicht mehr nachweisbar ist (Abbildung 28 C). Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von S6K1 und 4E-BP1 bei Glutaminmangel hin. Der Glucoseeffekt wird nicht durch die Inhibitoren beeinflusst, was gegen eine Beteiligung von S6K1 und 4E-BP1 spricht.

Da bereits nach drei Stunden eine Änderung der GLUT1 Proteinmenge an Glucosemangel erfolgt ist, spricht dies für eine schnelle Regulation. Der Glutamineffekt ist ebenfalls bereits messbar, kann aber durch Inhibitorgabe noch beeinflusst werden.

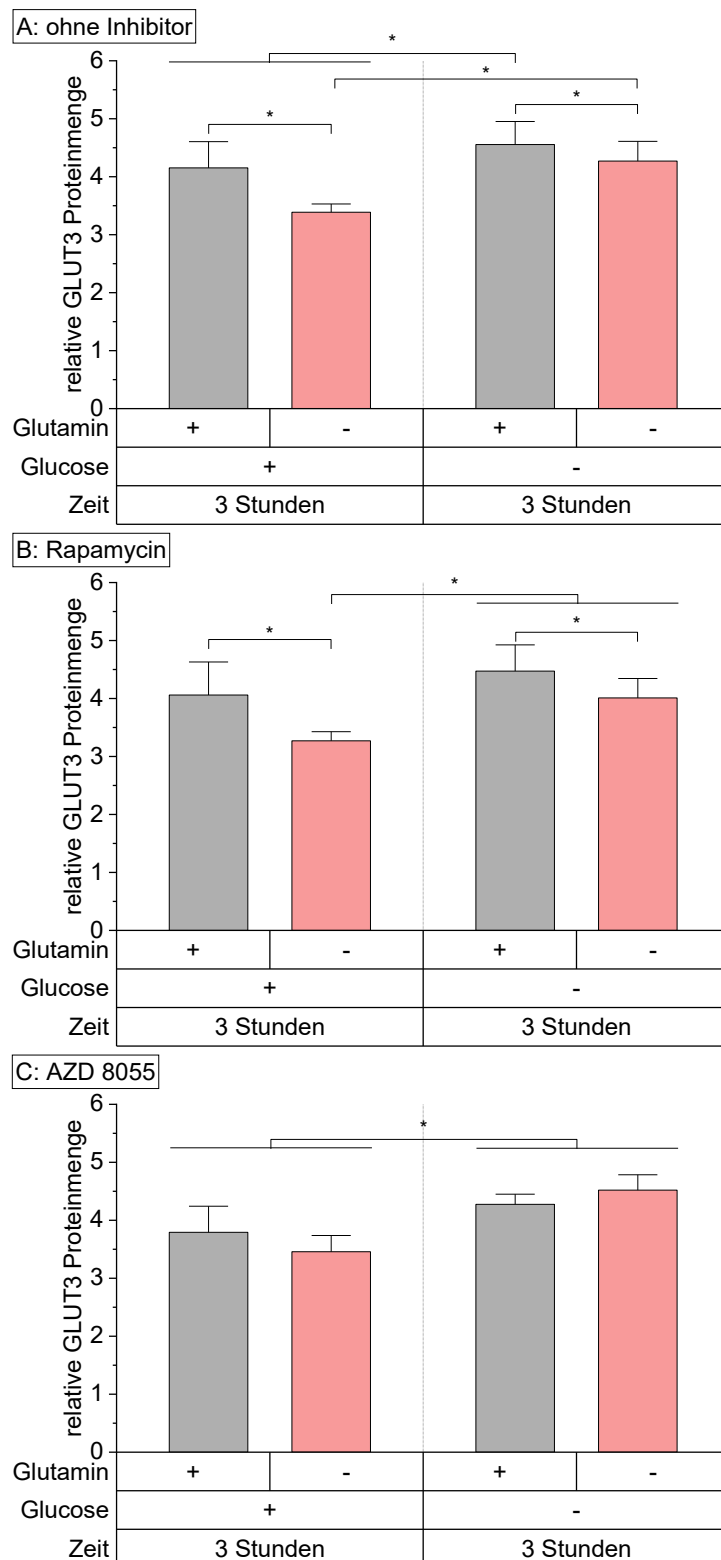


**Abbildung 29: Relative Proteinmenge von GLUT1 nach 24 stündigem Behandlungszeitraum.** A: Jede Behandlung mit  $n = 36$  aus drei unabhängigen Versuchen. B: Rapamycinbehandlung mit  $n = 12$  aus drei unabhängigen Versuchen. C: AZD8055 Behandlung mit  $n = 18$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA ergab einen signifikanten Glucose- und Glutamineffekt. Dargestellt sind die, mittels einfaktorieller ANOVA zu dem aus der Bonferroni – Korrektur resultierenden, adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  signifikanten, Glutamin- und Glucoseeffekte.

---

Mittels zweifaktorieller ANOVA, bei der Glutamin als ein Faktor und Glucose als zweiter Faktor angesehen werden können für GLUT1 auf Proteinebene GLUT1 ein Glutamin- und ein Glucoseeffekt nach 24 stündigem Behandlungszeitraum nachgewiesen werden (Abbildung 29 A). Diese können bereits nach drei stündiger Mangelbehandlung nachgewiesen werden (Abbildung 28 A). Die 24 stündige Rapamycingabe senkt den GLUT1 Proteingehalt bei kombinierter Mangelbehandlung (Abbildung 29 B). AZD8055 führt bei der zweifaktoriellen ANOVA statistisch gesehen zu einem Verlust des Glutamineffektes. Einzelvergleiche der Mangelbehandlungen mittels einfaktorieller ANOVA zeigen jedoch, dass der Glutamineffekt sehr wohl vorhanden ist und bei Glucoseentzug invertiert ist (Abbildung 29 C).

Der Glutamineffekt ist nach 24 stündiger Mangelbehandlung wie bereits in Kapitel 3.3.1 nicht mehr durch Inhibitorgabe beeinflussbar. Bei drei stündiger Mangelbehandlung und Inhibitorgabe ist dies noch möglich. Langfristig wird offenbar der Glutamineffekt unabhängig von S6K1 und 4E-BP1 vermittelter Translation stabilisiert. Auch ist der Glucoseeffekt weitestgehend unabhängig von S6K1 und 4E-BP1. Der GLUT1 Proteingehalt wird durch das langfristige hemmen der 4E-BP1 vermittelten Translation bei kombiniertem Glutamin- und Glucoseentzug erhöht, während eine Hemmung der S6K1 vermittelten Translation unter diesen Bedingungen den Proteingehalt senkt.

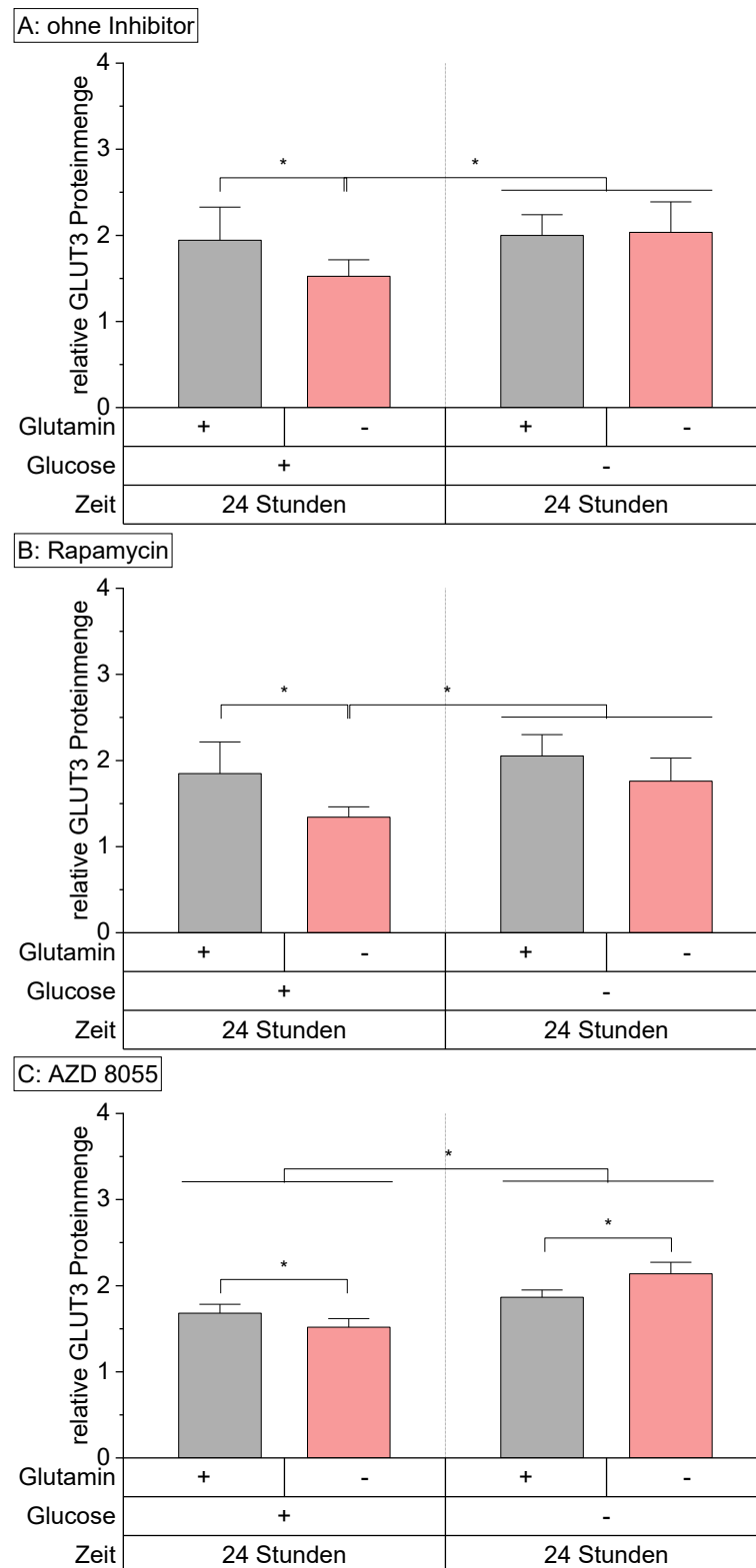


**Abbildung 30: Relative Proteinmenge von GLUT3 nach drei stündigem Behandlungszeitraum.** A: Jede Behandlung mit  $n = 36$  aus drei unabhängigen Versuchen. B und C: Jede Behandlung mit  $n = 18$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA ergab einen signifikanten Glucose- und Glutamineffekt. Dargestellt sind die, mittels einfaktorieller ANOVA zu dem aus der Bonferroni – Korrektur resultierenden, adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  signifikanten, Glutamin- und Glucoseeffekte.

GLUT3 zeigt in den vorangegangenen Experimenten keine Effekte auf mRNA Ebene. Mittels zweifaktorieller ANOVA bei der Glutamin als ein Faktor und Glucose als zweiter Faktor angesehen werden, können für GLUT3 ohne Inhibitorgabe Glutamin- und Glucoseeffekte bereits im drei stündigen Versuchszeitraum nachgewiesen werden (Abbildung 30 A).

Durch eine dreistündige Rapamycingabe bleiben Glucose- und Glutamineffekt weitestgehend unbeeinflusst (Abbildung 30 B). AZD 8055 führt nach drei Stunden zu einem Verlust des Glutamineffektes, der Glucoseeffekt bleibt erhalten. Die einfaktorielle ANOVA verdeutlicht, dass unabhängig von Glucose der GLUT3 Proteingehalt bei Glutaminmangel an das Niveau bei Glutamingabe angeglichen wird (Abbildung 30 C).

Diese Ergebnisse lassen entgegen der Arbeitshypothese vermuten, dass durch Hemmung von 4E-BP1 bei kombiniertem Glucose- und Glutaminmangel der Proteingehalt gesteigert wird. Die Hemmung von S6K1 hat keinen Einfluss auf den GLUT3 Proteingehalt, auch ist der Glucoseeffekt nicht beeinflussbar.

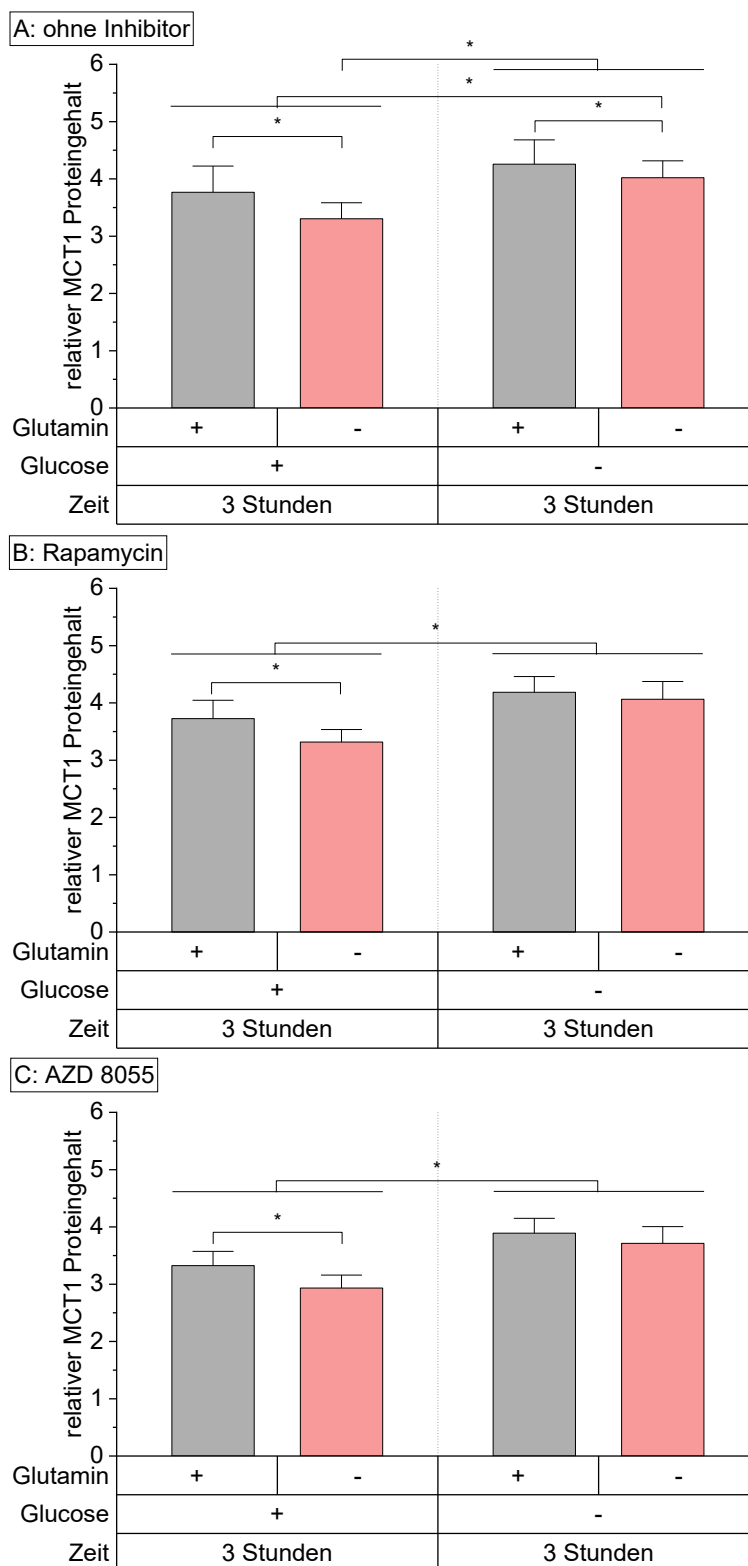


**Abbildung 31: Relative Proteinmenge von GLUT3 nach 24 stündigem Behandlungszeitraum.** A: Jede Behandlung mit  $n = 36$  aus drei unabhängigen Versuchen. B und C: Jede Behandlung mit  $n = 18$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA ergab einen signifikanten Glucose- und Glutamineffekt. Dargestellt sind die, mittels einfaktorieller ANOVA zu dem aus der Bonferroni – Korrektur resultierenden, adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  signifikanten, Glutamin- und Glucoseeffekte.

Mittels zweifaktorieller ANOVA bei der Glutamin als ein Faktor und Glucose als zweiter Faktor angesehen werden können die für GLUT3 bereits im drei stündigen Versuchszeitraum nachgewiesenen Glutamin- und Glucoseeffekte im 24 stündigen Versuchszeitraum bestätigt werden. Die Effekte begründen sich auf einen geringeren GLUT3 Proteingehalt bei Glutaminmangel und Glucosegabe (Abbildung 31 A).

Durch Rapamycin bleiben Glucose- und Glutamineffekt unbeeinflusst wie bereits im drei stündigen Versuchszeitraum nachgewiesen (Abbildung 31 B). AZD 8055 führt bei der Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA zu einem Verlust des Glutamineffektes (Abbildung 30 C), was bei Betrachtung mittels einfaktorieller ANOVA in einem erhöhten GLUT3 Proteingehalt bei kombiniertem Mangel begründet ist (Abbildung 31 C). Der Glucoseeffekt bleibt von den Inhibitoren unbeeinflusst.

Diese Ergebnisse reproduzieren die Beobachtungen des dreistündigen Versuchszeitraumes, dass durch Hemmung der 4E-BP1 vermittelten Translation bei kombiniertem Glucose- und Glutaminmangel der GLUT3 Proteingehalt erhöht wird und S6K1 keinen Einfluss auf den GLUT3 Proteingehalt hat.

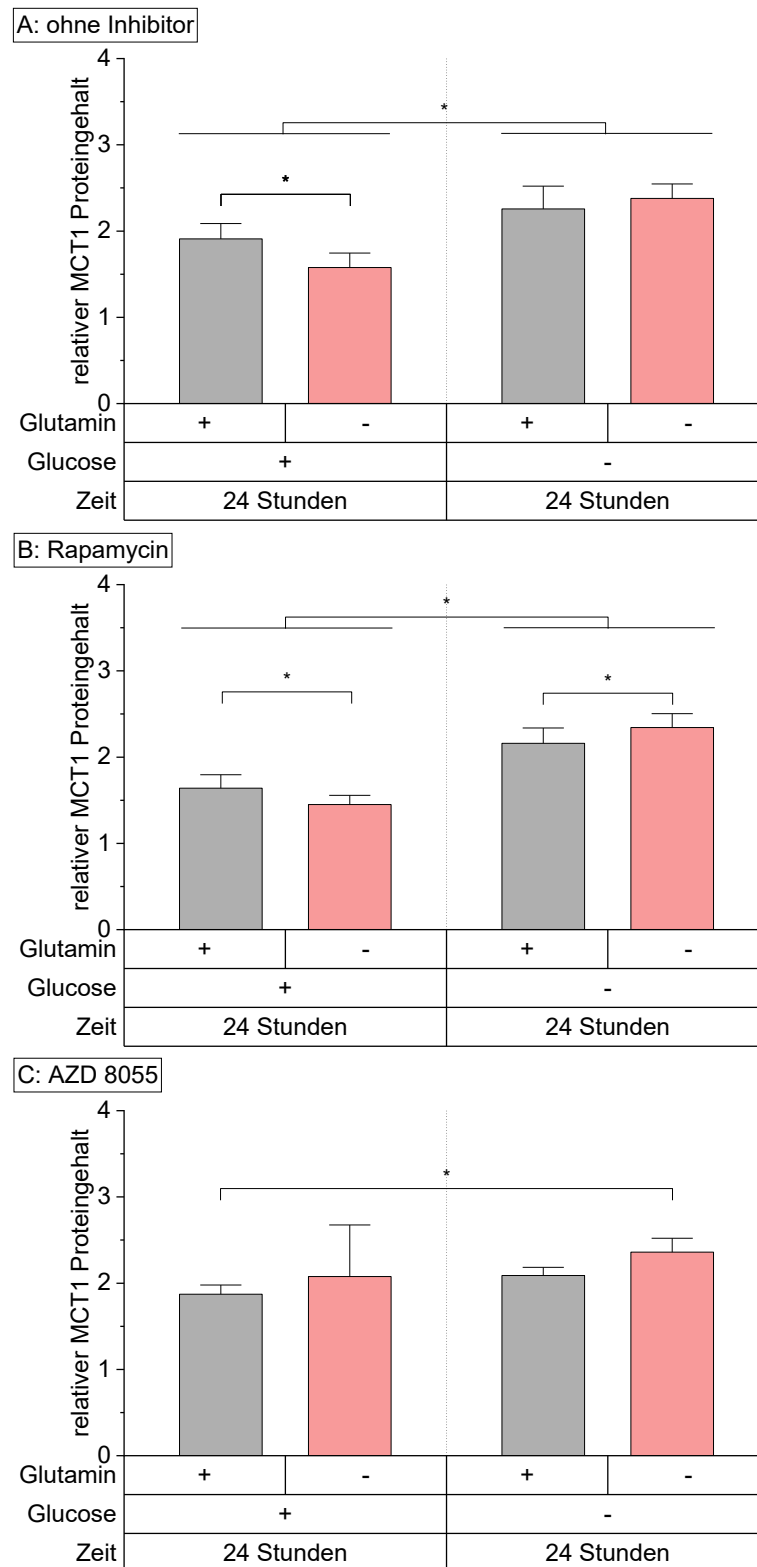


**Abbildung 32: Relative Proteinmenge von MCT1 nach drei stündigem Behandlungszeitraum.** A: Jede Behandlung mit  $n = 36$  aus drei unabhängigen Versuchen. B und C: Jede Behandlung mit  $n = 18$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA ergab einen signifikanten Glucose- und Glutamineffekt. Dargestellt sind die, mittels einfaktorieller ANOVA zu dem aus der Bonferroni – Korrektur resultierenden, adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  signifikanten, Glutamin- und Glucoseeffekte.

Im dreistündigen Versuchszeitraum kann durch eine zweifaktorielle ANOVA bei der Glutamin als ein Faktor und Glucose als zweiter Faktor angesehen werden für den MCT1 Proteingehalt sowohl ein Glutamin- als auch ein Glucoseeffekt nachgewiesen werden. Durch Einzelvergleiche mittels einfaktorieller ANOVA zeigen sich, dass ein Glucosemangel den MCT1 Proteingehalt erhöht wobei ein Glutaminmangel unabhängig davon zu einem niedrigeren MCT1 Proteingehalt führt (Abbildung 32 A).

Durch die Rapamycingabe im dreistündigen Versuchszeitraum ist kein Glutamineffekt bei Glucosemangel mehr messbar. Alle übrigen Effekte bleiben unbeeinflusst (Abbildung 32 B). Dies kann auch bei dreistündiger AZD 8055 Gabe beobachtet werden (Abbildung 32 C).

Diese Ergebnisse lassen laut der Arbeitshypothese vermuten, dass sowohl 4E-BP1 als auch S6K1 den MCT1 Proteingehalt bei kombiniertem Glucose- und Glutaminentzug beeinflussen. Weder S6K1 noch 4E-BP1 haben Einfluss auf den Glucoseeffekt.



**Abbildung 33: Relative Proteinmenge von MCT1 nach 24 stündigem Behandlungszeitraum.** A: Jede Behandlung mit  $n = 36$  aus drei unabhängigen Versuchen. B und C: Jede Behandlung mit  $n = 18$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA ergab einen signifikanten Glucose- und Glutamineffekt. Dargestellt sind die, mittels einfaktorieller ANOVA zu dem aus der Bonferroni – Korrektur resultierenden, adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  signifikanten, Glutamin- und Glucoseeffekte.

Bereits im dreistündigen Versuchszeitraum kann durch eine zweifaktorielle ANOVA bei der Glutamin als ein Faktor und Glucose als zweiter Faktor angesehen werden für den MCT1 Proteingehalt sowohl ein Glutamin- als auch ein Glucoseeffekt nachgewiesen werden, dies ist auch im 24 stündigen Versuchszeitraum der Fall. Durch Einzelvergleiche mittels einfaktorieller ANOVA zeigt sich, dass ein Glucosemangel den MCT1 Proteingehalt erhöht. Der Glutamineffekt liegt in einem niedrigeren MCT1 Proteingehalt in Glucoseanwesenheit begründet (Abbildung 33 A).

Nach 24 Stunden ist der Glutamineffekt durch Rapamycingabe mittels zweifaktorieller ANOVA nicht mehr nachweisbar. Durch nähere Betrachtung durch Einzelvergleiche mittels einfaktorieller ANOVA zeigt sich jedoch, dass der Glutamineffekt in Glucoseanwesenheit vorhanden ist. Zusätzlich tritt eine signifikante Erhöhung des MCT1 Proteingehalts bei kombiniertem Glucose- und Glutaminmangel auf (Abbildung 33 B). Der Glucoseeffekt bleibt unbeeinflusst.

AZD 8055 hat laut zweifaktorieller ANOVA im 24 stündigen Versuchszeitraum keinen Einfluss auf Glutamin- und Glucoseeffekt. Einzelvergleiche mittels einfaktorieller ANOVA zeigen, dass dies sich lediglich auf einen signifikanten Unterschied zwischen dem MCT1 Proteingehalt bei kombinierter Glutamin- und Glucosegabe und kombiniertem Glutamin- und Glucoseentzug gründet (Abbildung 32 B).

Die Auswirkung von AZD8055 spricht laut Arbeitshypothese für eine Beteiligung von 4E-BP1 am MCT1 Proteingehalt bei Glucose- oder Glutaminmangel. Entgegen der Arbeitshypothese führt die Hemmung der S6K1 vermittelten Translation zu einer Steigerung des MCT1 Proteingehalts bei kombiniertem Glucose- und Glutaminmangel.

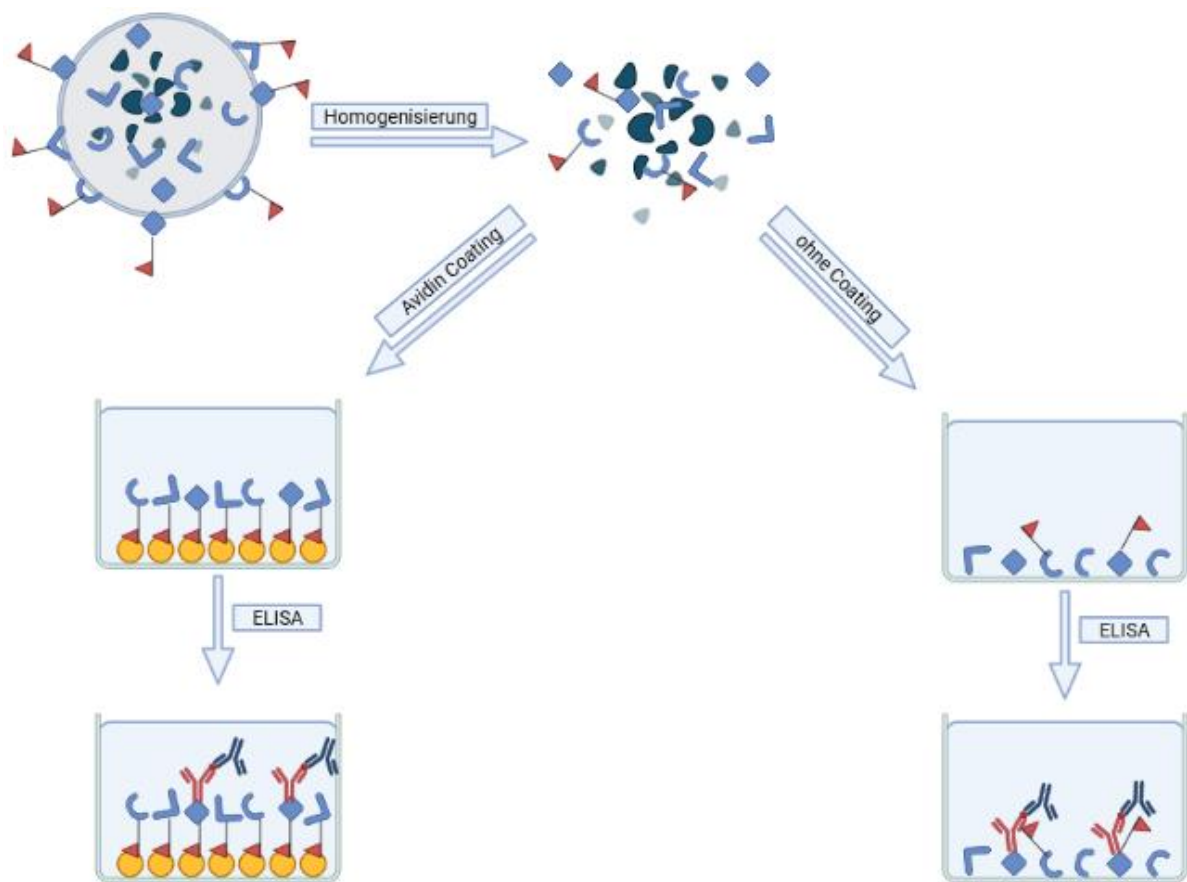
Zusammenfassend zeigen sich für alle drei untersuchten Transporter Auswirkungen durch die Inhibition des S6K1 oder des 4E-BP1 vermittelten Translationsmechanismus. Jeder Transporter zeigt hierbei individuelle Effektmuster in Abhängigkeit von Versuchszeitraum, Glucose oder Glutamin und Inhibitor. Auffällig ist, dass bei allen untersuchten Transportern eine langfristige Inhibition des 4E-BP1 vermittelten Translationsmechanismus zu einem erhöhten Proteingehalt bei kombiniertem Glucose- und Glutaminmangel führt. Die Auswirkungen von Mangelbehandlungen und Inhibitoren im dreistündigen Versuchszeitraum auf den Proteingehalt der untersuchten Transporter lassen aufgrund der geringen Zeitspanne eine Regulation mittels Translokation oder Stabilisierung bzw. Degradierung der Transporter

vermuten, da diese Mechanismen im Gegensatz zur Translation von Proteinen innerhalb kürzester Zeit erfolgen können.

### **3.3.4 Energiemangel induziert keine Translokation bei GLUT3, GLUT1 oder MCT1**

Neben Transkription und Translation ist in der Literatur der Mechanismus der Translokation insbesondere für GLUT3 in Neuronen beschrieben. Da es zu diesem Regulationsmechanismus verschiedene Hypothesen gibt, wie eingangs beschrieben, und eine Beteiligung von AMPK bisher nicht ausgeschlossen werden konnte, werden im Rahmen dieser Arbeit GLUT1, GLUT3 und MCT1 dahingehend untersucht (Weisova *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011).

Um zu ermitteln, ob sich der Anteil der membranständigen Transporter verändert wird ein Biotinylierungsassay vorgenommen. Hierbei lassen sich Menge der membranständigen Proteine und der Gesamtproteingehalt vergleichen. Diese Methode wurde ebenfalls von Ferreira *et al.*, 2011 angewendet, um den Anteil membranständiger GLUT3 Transporter in Neuronen nach Glutamat Stimulation zu ermitteln. Zunächst werden an den intakten Zellen alle Oberflächenproteine mit Biotin gekoppelt (Abbildung 34).

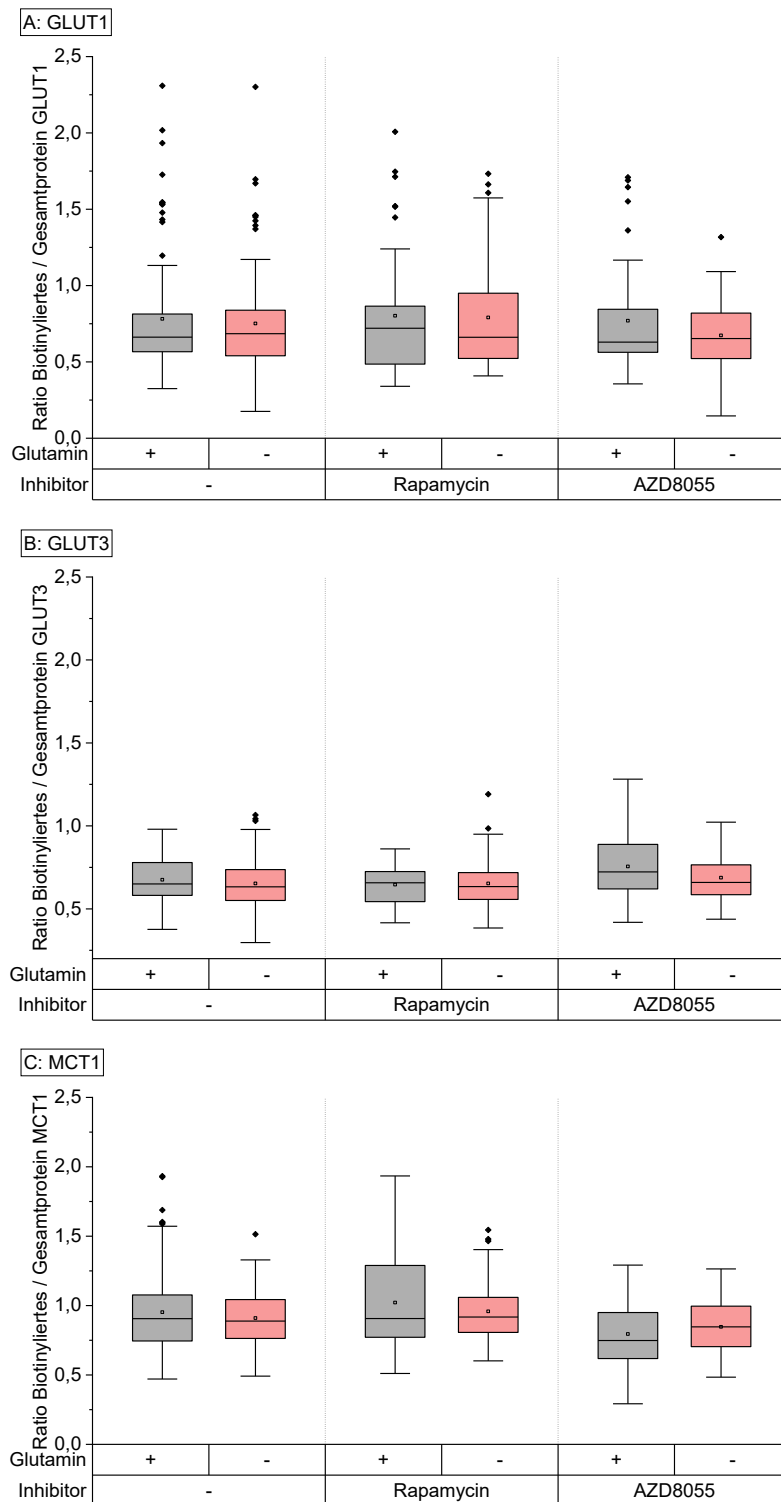


**Abbildung 34: Schematische Darstellung eines Biotinylierungsassays<sup>5</sup>.** Alle Oberflächenproteine der intakten Zellen werden mit Biotin (rotes Fähnchen) markiert. Anschließend werden die Zellen homogenisiert, wodurch eine Mischung aus Biotin markierten und unmarkierten Proteinen vorliegt. Ein Teil des Homogenats wird auf eine Avidin beschichtete Wellplatte aufgetragen (links), der andere Teil auf eine unbeschichtete Wellplatte (rechts). Das Avidin bindet bevorzugt die mit Biotin markierten Proteine, an der unbeschichteten Wellplatte binden alle Proteine. Mittels ELISA wird durch einen spezifischen Primärantikörper das gewünschte Protein bestimmt, im Falle der Avidin beschichteten Wellplatte wird der membranständige Anteil bestimmt, im Falle der unbeschichteten Wellplatte wird die Gesamtproteinmenge des zu detektierenden Proteins bestimmt.

Anschließend werden die Zellen homogenisiert, um die Gesamtheit der Proteine für Antikörper zugänglich zu machen. Eine Selektion der biotinkoppelten Proteine erfolgt mittels Bindung an Avidin. Das Verhältnis zwischen dem biotinylierten Transporteranteil und der Gesamtmenge, welche durch den Direktauftrag bestimmt wird, ermöglicht den membranständigen Anteil der Transporter zu bestimmen. Betrachtet wird der 24 stündigen Versuchszeitraum, die Experimente werden mit den Mangelmedien sowie den Inhibitoren

<sup>5</sup> Grafik erstellt mit BioRender.com.

durchgeführt. Liegt eine Translokation vor, ist dies durch eine Verschiebung des Verhältnisses biotinyliert zu Gesamtprotein messbar. Verschiebt sich das Verhältnis zugunsten des biotinylierten Anteils, so werden zusätzliche Transporter in die Zellmembran transloziert. Verschiebt sich das Verhältnis in Richtung Gesamtprotein, so liegen weniger membranständige Transporter vor. Bei GLUT3 sollten in der Kontrollbedingung ca. 75 % der Proteine biotinyliert und somit in der Membran lokalisiert sein (Ferreira *et al.*, 2011).



**Abbildung 35: Relativer Anteil membranständiger Transporter nach 24 stündigen Mangelbehandlungen.**

A und C: Ohne Inhibitorgabe mit  $n = 90$ , Rapamycin- und AZD 8055 Behandlung mit jeweils  $n = 45$  aus drei unabhängigen Versuchen. B: Ohne Inhibitorgabe mit  $n = 90$ , Rapamycin- und AZD 8055 Behandlung mit jeweils  $n = 45$  aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Auswertung mittels zweifaktorieller ANOVA ergab keinen signifikanten Glucose- oder Glutamineffekt. Auch mittels einfaktorieller ANOVA zu dem aus der Bonferroni – Korrektur resultierenden, adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  treten keine signifikanten Glutamin- oder Glucoseeffekte auf.

Der membranständige Anteil von GLUT1 und GLUT3 beträgt jeweils im Mittel zwischen 65 % und 80 % (Abbildung 35). Dies ist mit den 71 % membranständigen GLUT3 Proteinen bei Ferreira *et al.*, 2011 vergleichbar. Bei MCT1 zeigt sich, dass nahezu 100 % der Transporter in der Membran lokalisiert sind. Für keinen der betrachteten Transporter sind weder durch Mangelbehandlung, noch durch Inhibitorgabe signifikante Unterschiede erkennbar.

Zusammenfassen können keine Translokationen für die untersuchten Transporter nachgewiesen werden. Auch eine Beeinflussung durch die Inhibitoren liegt nicht vor, wodurch im vorliegenden Versuchsaufbau ebenfalls keine Beteiligung von mTORC1, S6K1 oder 4R-BP1 angenommen werden kann.

Abschließend werden die Resultate aus den durchgeführten Experimenten in Bezug auf mögliche Transkriptions- und Translationsmechanismen interpretiert und Hypothesen zu den potentiellen Regulationskaskaden anhand der Literatur diskutiert. Die Limitierungen des Versuchsmodells werden erläutert, sowie eine Einordnung der Arbeit in den aktuellen Stand der Forschung dieses Fachgebietes vorgenommen.

## 4 Diskussion

Über die autonome Energieversorgung von Neuronen ist aus bisherigen Forschungsarbeiten nur wenig bekannt. Zudem standen bei diesen Arbeiten hochspezifische Kankeitsbilder im Vordergrund und sie bedienten sich unterschiedlichen Modellorganismen. Einigkeit besteht bei McKenna, 2007; Falkowska *et al.*, 2015; Bergersen, 2015; Agostini *et al.*, 2016; Divakaruni *et al.*, 2017; Rehni and Dave, 2018 darüber, dass Neurone als alternative Energieträger neben Glucose auch Lactat und Ketone sowie Glutamin nutzen können.

Welche Auswirkungen dies auf die Glucose- und Lactattransporter – Ausstattung der Zelle hat, ist denoch bislang ungeklärt. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Untersuchung von übergeordneten Prozessen, welche eine koordinierte Regulation von Glucose- und Lactattransportern vermitteln. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Arbeiten dienen hierbei ausschließlich SH-SY5Y Zellen, eine Glioblastomzelllinie mit neuronalem Charakter, als experimentelles Modell.

### 4.1 Ausschluss von GLUT4 und MCT2 von weiteren Experimenten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Vorversuche bezüglich Energieträger und Transporter durchgeführt. Anhand dieser ELISA und qRT-PCR Daten konnten der Glucosetransporter GLUT4 sowie der Lactattransporter MCT2 für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit als nicht relevant eingestuft werden. Auch erwies sich der Lactatmangel als nicht zielführend.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von Benomar *et al.*, 2006 und Hajiaghaalipour *et al.*, 2015 weist GLUT4 in den durchgeführten Experimenten keine Beeinflussbarkeit durch Glucose-, Glutamin- oder Lactatmangel auf. Dies legt nahe, dass GLUT4 ohne einen Insulinstimulus nicht regulierbar und somit für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit nicht von Relevanz ist. Bekräftigt wird dieser Umstand durch Guo *et al.*, 2023, welche bei GLUT4 ebenfalls keine Veränderung des mRNA Gehalts feststellen konnten.

Der mRNA Gehalt von MCT2 lag in den qRT-PCR Messungen unterhalb der Detektionsgrenze. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Xu *et al.*, 2023 überein. So konnten die Autoren in SH-SY5Y MCT2 kaum detektieren. Aufgrund dessen erweist sich auch MCT2 aufgrund der verwendeten SH-SY5Y Zellen als ungeeignet.

Xu *et al.*, 2023 konnten nachweisen, dass Lactattransporter bei SH-SY5Y Zellen bei Änderungen der Lactatkonzentration nicht reguliert werden. Somit ist die Untersuchung von Lactatmangel in der vorliegenden Arbeit nicht zielführend.

## **4.2 SH-SY5Y Zellen regulieren GLUT1, GLUT3 und MCT1 unter langfristigem Glutamin- oder Glucosemangel**

Aus den durchgeführten Experimenten ergeben sich neue, essentielle Erkenntnisse über die Regulation von Glucose- und Lactattransportern von Neuronen:

- Ein Glutaminmangel führt bei GLUT1, GLUT3 und MCT1 zu einem niedrigeren Proteingehalt und mRNA Gehalt bei GLUT1.
- Ein Glucosemangel führt bei GLUT1, GLUT3 und MCT1 zu einem erhöhten Proteingehalt, unabhängig von der Glutaminkonzentration.
- Die Inhibitoren AZD8055 und Rapamycin legen die Beteiligung von mTORC1 an der Regulation von GLUT1, GLUT3 und MCT1 auf Proteinebene nahe.
- Rapamycin und AZD8055 wirken sich unterschiedlich auf den Proteingehalt der untersuchten Transporter aus. Dies hängt zusätzlich von dem Versuchszeitraum ab.
- Eine Translokation konnte bei keiner Versuchsbedingung nachgewiesen werden.

Diese Erkenntnisse werden im Folgenden detailliert erläutert und fundierte Hypothesen zu den regulatorischen Vorgängen anhand des aktuellen Forschungsstandes aufgestellt.

Die Verwendung der immergleichen Zelllinie in allen durchgeführten Experimenten erlaubt übergeordnete Hypothesen zur Regulation der betrachteten Glucose- und Lactattransporter aufzustellen. Hierbei werden die Abhängigkeiten von Glucose und Glutamin sowie die Auswirkungen von akutem und subchronischem Energiemangel erläutert.

#### 4.2.1 Glutamin reguliert den GLUT1 mRNA Gehalt mittels direkter HIF1 $\alpha$ Stabilisierung

Die vorliegende Arbeit konnte durch die systematische Vorenthaltung verschiedener Energieträger in den qRT-PCR und ELISA Experimenten neue Ergebnisse in Bezug auf die Regulation von Glucosetransportern gewinnen. Da in diesem Forschungsbereich bisher Glucose und Insulin als Hauptregulatoren im Vordergrund stehen, stellt die Glutaminabhängigkeit von GLUT1 auf mRNA Ebene sowie auf Proteinebene eine neue Erkenntnis dar.

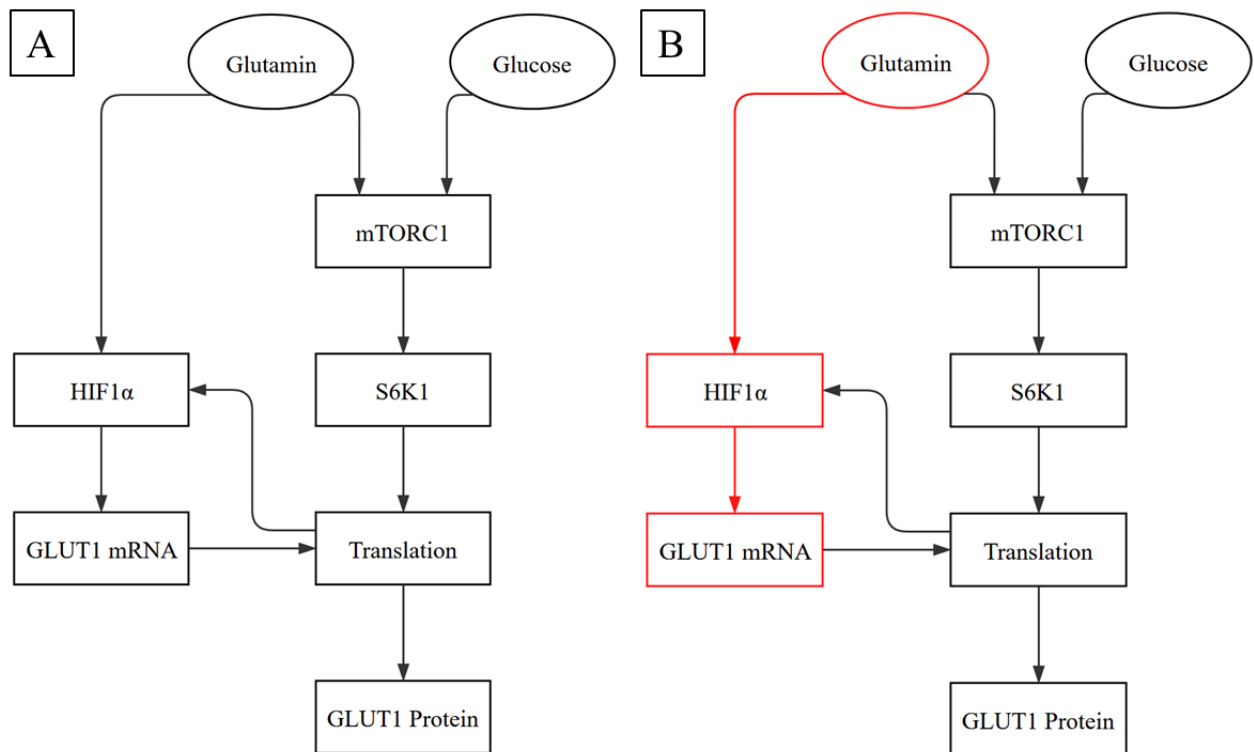
Bereits Bernfeld *et al.*, 2018 und Dibble *et al.*, 2009 erkannten, dass sowohl bei Änderungen der Glucosekonzentration als auch bei Änderungen von Aminosäurekonzentrationen mTORC1 aktiviert wird. So ist ausschließlich Glutamin als Aminosäure in der Lage mTORC1 maximal zu aktivieren. Auch benannten die Autoren S6K als einen Haupteffektor der Glutaminstimulation von mTORC1.

Daran anknüpfend erhöht, laut der Nobelpreis dotierten Forschung von G. L. Semenza in Laughner *et al.*, 2001 und Semenza, 2010, die mTORC1 vermittelte Phosphorylierung von S6K die Translation von HIF1 $\alpha$ . Dieser Mechanismus stellt einen wichtigen Baustein für die Regulation von GLUT1 auf mRNA Ebene dar, da der aus HIF1 $\alpha$  und HIF1 $\beta$  bestehende Transkriptionsfaktor HIF1 als entscheidender Transkriptionsfaktor für GLUT1 bekannt ist. Anhand dieser Hypothese müssten die verwendeten Inhibitoren Rapamycin und AZD8055 den HIF1 $\alpha$  Proteingehalt bei Glutaminanwesenheit in den ELISA Experimenten beeinflussen. Da dies nicht der Fall ist, muss von einer mTORC1/S6K unabhängigen Regulation von HIF1 $\alpha$  ausgegangen werden.

Eine eingehendere Betrachtung der Regulation von HIF1 $\alpha$  durch Kappler *et al.*, 2019 deckt einen solchen mTORC1/S6K unabhängigen Mechanismus auf. Die Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  erfolgt laut den Autoren einzig durch Glutamin. Die Metabolisierung von Glutamin führt in Tumorzellen zu einer Verringerung der cytoplasmischen Acetyl CoA Konzentration. HIF1 $\alpha$  akkumuliert, da dieses nicht mehr ausreichend acetyliert und abgebaut werden kann.

Zusammenfassend sind der verminderte GLUT1 mRNA Gehalt in den qRT-PCR Experimenten und der verminderte HIF1 $\alpha$  Proteingehalt in den ELISA Experimenten unter Glutaminmangel Ergebnisse ein und derselben Regulationskaskade. Diese

Regulationskaskade muss mTORC1/S6K unabhängig sein, da die verwendeten Inhibitoren den Glutamineffekt auf den HIF1 $\alpha$  Proteingehalt in den ELISA Experimenten nicht aufheben konnten. Anhand dieser Daten kann die von Kappler *et al.*, 2019 entdeckte Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  durch Glutamin der Hypothese der glutaminabhängigen GLUT1 mRNA Regulation zu Grunde gelegt werden, wie in Abbildung 36 dargestellt.



**Abbildung 36: Hypothese der glutaminabhängigen GLUT1 mRNA Regulation.** A) In Glutaminanwesenheit wird HIF1 $\alpha$  von Glutamin stabilisiert und S6K1 vermittelt translatiert. B) Unter Glutaminmangel erfolgt ein vermehrter Abbau von HIF1 $\alpha$  wodurch auch der GLUT1 mRNA sinkt (rot dargestellt).

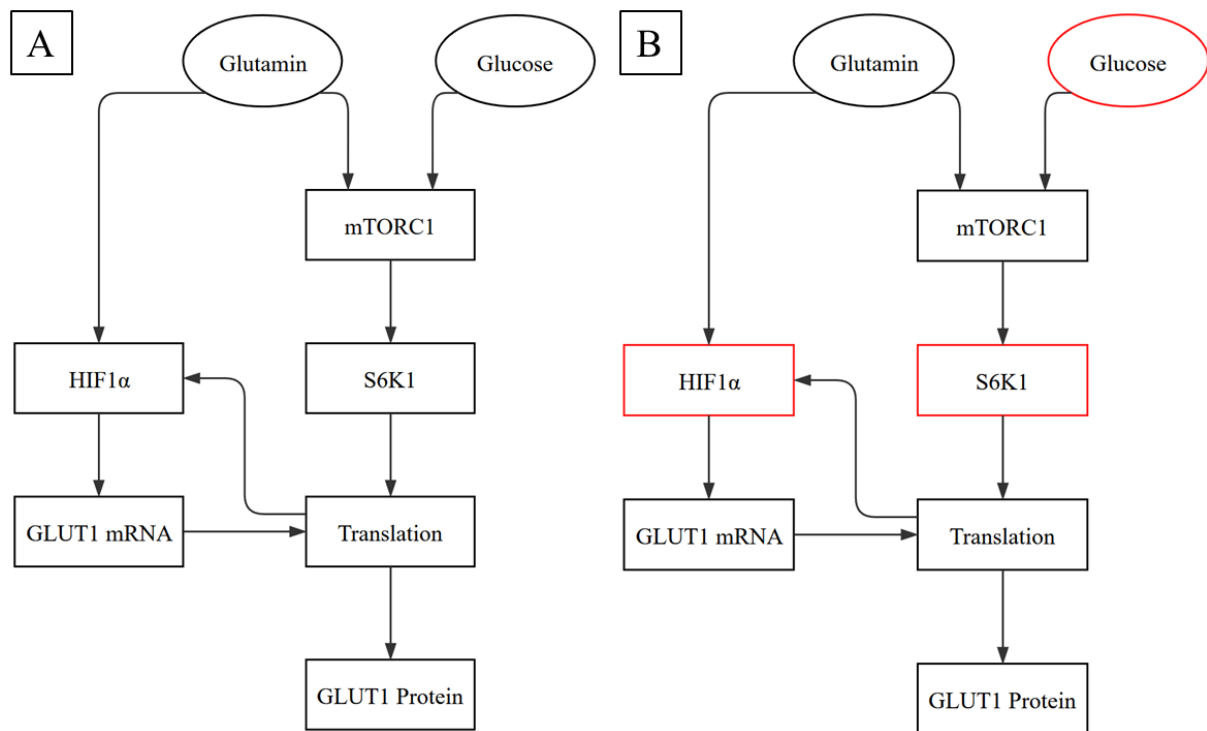
Durch qRT-PCR und ELISA Assays konnte in Gegensatz zu Guo *et al.*, 2023 eine Glucoseabhängigkeit von GLUT1 auf Proteinebene aber nicht auf mRNA Ebene nachgewiesen werden. Die Autoren beobachteten eine Erhöhung des GLUT1 mRNA Gehalts nach 24 stündiger Glucosemangelbehandlung. Allerdings betrachteten die Autoren Explantate der Retina und Organoide. Zudem wurde keine Aussage über den Proteingehalt von GLUT1 getroffen. Aufgründessen stellt die vorliegende Arbeit keinen Widerspruch zu Guo *et al.*, 2023 dar. Viel mehr ergänzen die vorliegenden Ergebnisse aus den ELISA Experimenten den Forschungsbereich der Regulation von Glucosetransporter um neuronale Zellen.

---

Eine Korrelation zwischen GLUT1 und HIF1 $\alpha$  auf Proteinebene wie unter Glutaminmangel zeigte sich in den vorliegenden Experimenten nicht. Während GLUT1 einen höheren Proteingehalt im Vergleich zu dem Kontrollmedium aufweist, zeigt HIF1 $\alpha$  einen niedrigeren Proteingehalt. Auch dies erscheint zunächst als Widerspruch zu bisherigen Arbeiten wie Guo *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2023 oder Liu *et al.*, 2024. Auch hier kann die vorliegende Arbeit als Ergänzung des Wissens um die Regulation von GLUT1 bei Normoxie versus Hypoxie und langfristigen Glucosemangel versus akuten Glucosemangel betrachtet werden.

Die fehlende Korrelation zwischen GLUT1 und HIF1 $\alpha$  Proteingehalt sowie der konstante GLUT1 mRNA Gehalt legen nahe, dass bei Glucosemangel eine andere Regulationskaskade aktiviert wird als bei Glutaminmangel. Zudem sprechen diese Beobachtungen für eine von HIF1 $\alpha$  weitestgehend unabhängige Regulation. Ein weiteres zentrales Ergebnis aus den ELISA Experimenten stellt der Verlust des Glucoseeffektes durch Rapamycin bei HIF1 $\alpha$  auf Proteinebene dar. Durch diese Beobachtung muss mTORC1/S6K als Teil der hypothetischen Regulationskaskade eingebunden werden.

Somit lassen sich für die Regulation des HIF1 $\alpha$  Proteingehalts und des GLUT1 mRNA Gehalts unter Glucosemangel die von Kappler *et al.*, 2019 beschriebenen Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  durch Glutamin und die in Laughner *et al.*, 2001 und Semenza, 2010 beschriebenen Abhängigkeit von HIF1 $\alpha$  und S6K1 zu Grunde legen. HIF1 $\alpha$  wird durch die Inhibierung von mTORC1/S6K zwar nur noch vermindert translatiert, die Anwesenheit von Glutamin erlaubt jedoch eine Stabilisierung. Somit könnte GLUT1 mRNA wie in Abbildung 37 dargestellt auch weiterhin transkribiert werden.

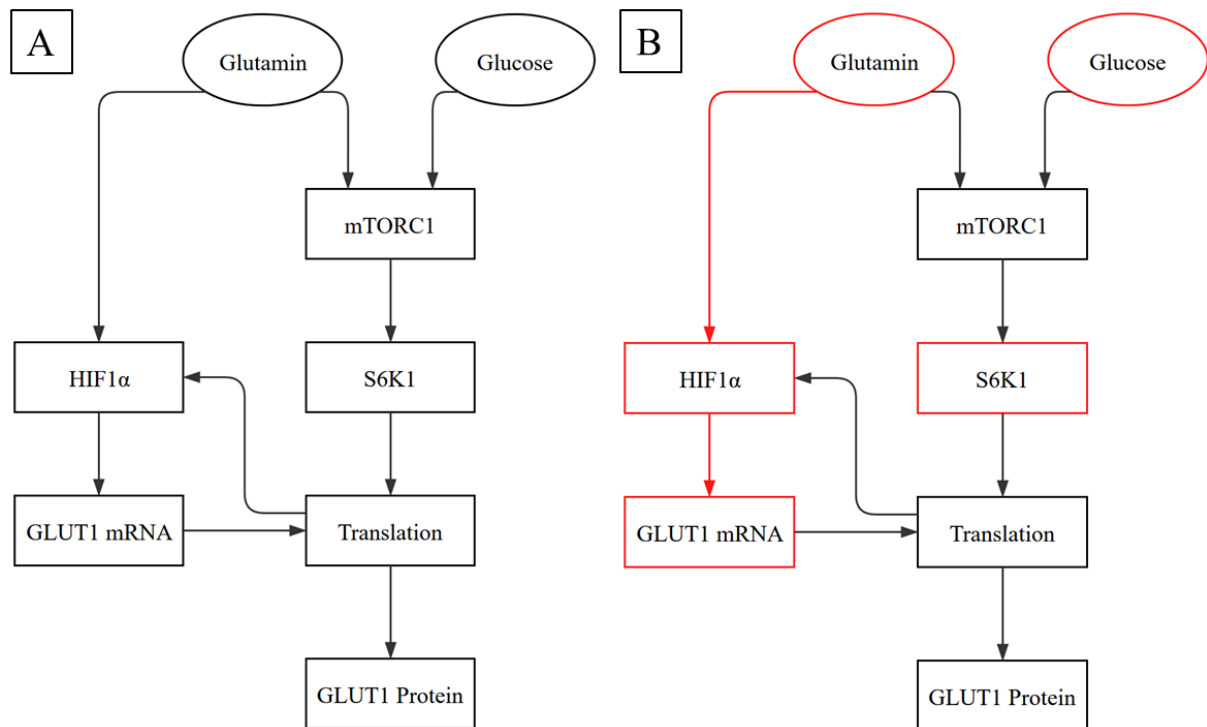


**Abbildung 37: Hypothese der glucoseabhängigen HIF1 $\alpha$  Regulation.** A) In Glucoseanwesenheit wird HIF1 $\alpha$  von Glutamin stabilisiert und S6K1 vermittelt translatiert. B) Unter Glucosemangel erfolgt eine verringerte S6K1 vermittelte Translation von HIF1 $\alpha$  (rot dargestellt), eine Stabilisierung mittels Glutamin ist möglich.

Bisherige Arbeiten betrachteten entweder Glucose- oder Glutaminmangel. Die Auswirkungen von kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel in SH-SY5Y Zellen auf GLUT1 sind somit als neue Erkenntnisse im Forschungsbereich der Glucosetransporter anzusehen.

Bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel ist ein Glutamineffekt in der qRT-PCR für GLUT1 aber nicht in den ELISA Experimenten sichtbar. Aufgrund des nicht nachweisbaren Glucoseeffektes bei Rapamycingabe und der Unbeeinflussbarkeit des Glucoseeffektes durch AZD8055 in den ELISA Experimenten ist davon auszugehen, dass sowohl eine verminderte S6K1 vermittelte Translation als auch eine Destabilisierung von HIF1 $\alpha$  stattfindet. Bekräftigt wird diese Hypothese durch den erniedrigten Proteingehalt von HIF1 $\alpha$  im Vergleich zur Kontrollbedingung.

Zusammenfassend scheint die glutaminabhängige Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  ausschlaggebend für den GLUT1 mRNA Gehalt zu sein. In Abbildung 38 erfolgt die schematische Darstellung der hypothetischen Regulation des GLUT1 mRNA Gehalts mittels S6K1 und HIF1 $\alpha$  bei kombiniertem Glucose- und Glutaminmangel.



**Abbildung 38: Hypothese der Regulation von HIF1 $\alpha$  Proteingehalt und GLUT1 mRNA Gehalt bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel.** A) In Glucoseanwesenheit wird HIF1 $\alpha$  von Glutamin stabilisiert und S6K1 vermittelt translatiert. B) Unter kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel ist die S6K1 vermittelte Translation von HIF1 $\alpha$  inhibiert, dennoch kann im Falle von HIF1 $\alpha$  eine S6K1 unabhängige Translation unter Stress, wie von Young *et al.*, 2008 beschreiben, nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund des Glutaminmangels kann HIF1 $\alpha$  nicht stabilisiert werden, wodurch die Transkription von GLUT1 mRNA ist vermindert ist.

Dass Glutamin und die damit einhergehende Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  hauptverantwortlich für den mRNA Gehalt von GLUT1 sind, stellt eine neue Erkenntnis im Bereich der Glucosetransporter dar.

#### 4.2.2 Glutaminmangel reguliert den Proteingehalt von GLUT1, GLUT3 sowie MCT1 über mTORC1 und 4EBP1

Ein Glutaminmangel führt in den ELISA Experimenten sowohl bei GLUT1 als auch bei GLUT3 und MCT1 zu einem niedrigeren Proteingehalt als im Kontrollmedium. Dies geschieht unabhängig von der jeweils gemessenen mRNA Menge in den qRT-PCR Experimenten.

Xu *et al.*, 2015 wiesen einen Zusammenhang zwischen mTORC1 Inhibition und GLUT3 Reduktion nach, auf mRNA und Proteinebene. Allerdings wurde hierbei eine Kombination aus Rapamycin und mTORC1 siRNA verwendet, um alle nachgeschalteten Prozesse von mTORC1 bei Trophoblasten zu inhibieren. In den qRT-PCR Experimenten dieser Arbeit wurde der GLUT3 mRNA Gehalt nach 24 Stunden bestimmt und keine Inhibitoren verwendet, sondern lediglich die Energieträger systematisch vorenthalten. Es ist wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Ergebnisse zu Xu *et al.*, 2015 in der Verwendung anderer Versuchszeiträume und Zellen begründet sind.

Da der Proteingehalt der untersuchten Transporter bei Glutaminmangel nicht mit der jeweils gemessenen mRNA Menge korreliert, ist von einer Regulation auf Translationsebene auszugehen. Aufgrunddessen ist ein detaillierter Blick auf die Translationsmechanismen notwendig.

Ma and Blenis, 2009 beschreiben mTOR mit seinen Komplexen als wichtigster Regulator der *cap-dependent* Translation in Säugetieren. Die Initiierung der *cap-dependent* Translation mittels mTOR erfolgt zunächst laut Fingar and Blenis, 2004 durch Phosphorylierung von S6K1 durch mTORC1. Parallel zur Phosphorylierung von S6K1 durch mTORC1 wird nach Gingras *et al.*, 2001 4E-BP1, ein Repressor von eIF4E, an den Stellen Thr 37 und Thr 46 von mTOR phosphoryliert, was die Phosphorylierung von Ser 65 und Thr 70 ermöglicht. Diese Phosphorylierungsstellen sind für die Freisetzung des an 4E-BP1 gebundenen eIF4E verantwortlich. Holz *et al.*, 2005 konnten nachweisen, dass die Freisetzung von 4E-BP1 für die Initiierung der *cap-dependent* Translation entscheidend ist.

Um die Rolle von mTORC1/S6K und 4E-BP1 in der Regulation von GLUT1, GLUT3 und MCT1 näher zu untersuchen bedient sich die vorliegende Arbeit der Inhibitoren Rapamycin und AZD8055. Rapamycin inhibiert laut Neasta *et al.*, 2014 mTORC1 selektiv in dem es

---

allosterisch die AMPK abhängige Regulation von mTORC1 hemmt. AZD8055 ist ein ATP – kompetitiver mTOR Inhibitor, welcher ähnlich wie Rapamycin an der mTOR – Bindungsdomäne bindet, wodurch ebenfalls mTORC1 und S6K laut Chresta *et al.*, 2010 inhibiert werden. Im Gegensatz zu Rapamycin ist AZD8055 in der Lage die mTORC1 abhängige mRNA Translation durch 4E-BP1 zu hemmen.

Die beiden Inhibitoren Rapamycin und AZD8055 können den Proteingehalt von GLUT1 und GLUT3 in den ELISA Assays in der Kontrollbedingung nicht auf das Niveau der Glutaminmangelbehandlung senken.

Ähnliches konnten Taha *et al.*, 1997 in ihren Experimenten mit Rapamycin feststellen. Im Versuchszeitraum von maximal einer Stunde stellten die Autoren aufgrunddessen die Hypothese einer S6K abhängigen Regulation der GLUT3 Proteinmenge auf. Rapamycin konnte nur einen Effekt bei gestressten Zellen erzielen. Diese Beobachtung findet sich auch in der vorliegenden Arbeit wieder. Somit ist ebenfalls eine S6K abhängige Regulation der GLUT3 Proteinmenge in Betracht zu ziehen.

Da die verwendeten Inhibitoren keinen Einfluss auf den Glutamineffekt haben, muss in Betracht gezogen werden, dass GLUT1 und GLUT3 nicht ausschließlich *cap-dependent* translatiert werden.

Die *cap-dependent* Translation ist der in Säugetieren bekannteste und am besten erforschte Translationsweg, doch Fernandez *et al.*, 2001 gelang der erste Nachweis, dass einige mRNAs in Säugetieren auch über eine *internal ribosomal entry sequence* (IRES) verfügen. Bei Nährstoffmangel können diese mRNAs über die IRES translatiert werden. Dass die 5'-UTR von GLUT1 ebenfalls eine solche IRES enthalten könnte, legen die Ergebnisse von Boado *et al.*, 1996 nahe. Die Autoren konnten für die 5'UTR von GLUT1 eine Kontrollfunktion über die Translation des Proteins nachweisen, dies aber nicht näher spezifizieren. Da sich laut Zhao and Keating, 2007 die Aminosäuresequenzen von GLUT1 und GLUT3 in weiten Teilen übereinstimmen, wäre ein solcher alternativer Translationsweg mittels IRES auch für GLUT3 denkbar.

Insbesondere bei Glutaminmangel dient 4E-BP1 als Schalter zwischen *cap-dependent* und IRES Translation. Der experimentelle Nachweis hierzu gelangen Komar and Hatzoglou, 2011 sowie Mizrachy-Schwartz *et al.*, 2007 in Vertebraten und in primären humanen Zellen.

---

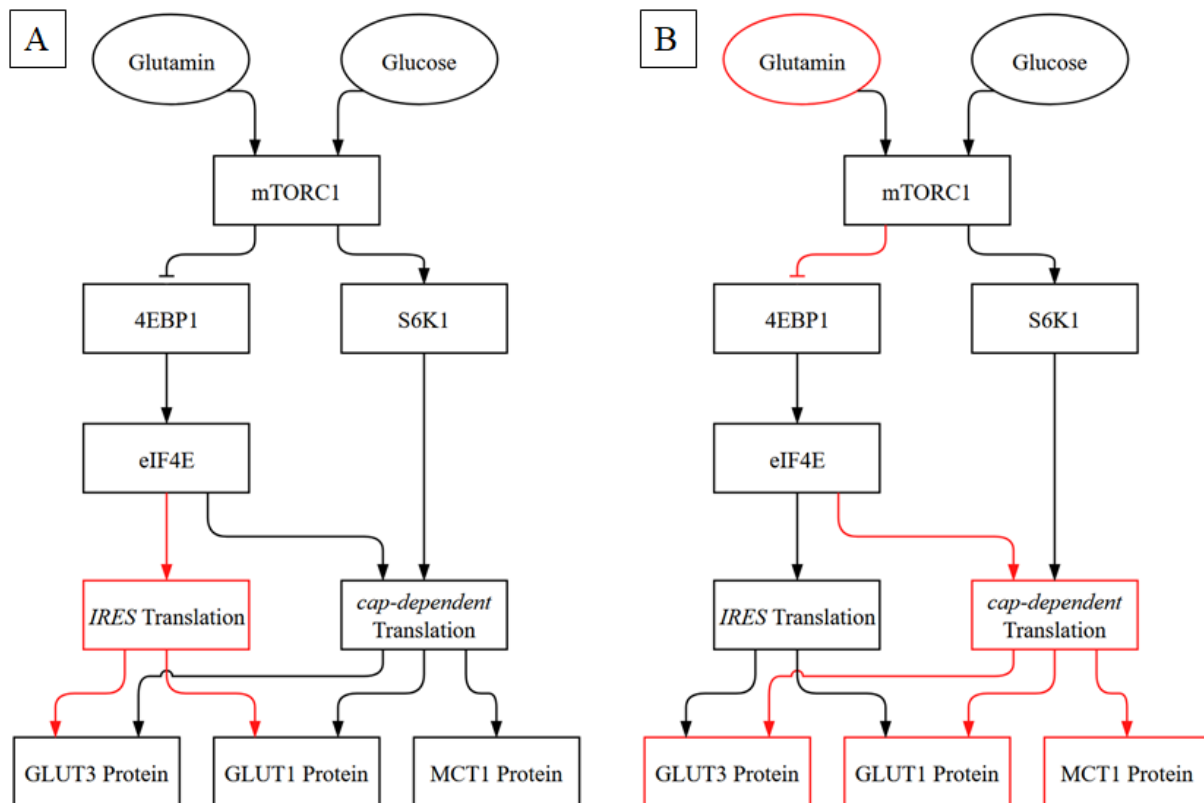
Näher erforscht wurde der Umschaltmechanismus von Svitkin *et al.*, 2005. Dabei betrachteten Svitkin *et al.*, 2005 den Aufbau von Translationskomplexen näher und stellten die Hypothese auf, dass eIF4E für diesen Prozess entscheidend ist.

Somit kann unter Berücksichtigung der oben genannten Arbeiten der Proteingehalt von GLUT1 und GLUT3 im ELISA trotz der Inhibitoren unter Kontrollbedingungen hypothetisch unbeeinflusst bleiben, sofern eine IRES Translation vorliegt.

Im Vergleich zur *cap-dependent* Translation weist die IRES Translation eine geringere Translationsrate auf, wie von Koch *et al.*, 2020 experimentell nachgewiesen. Dies hätte einen niedrigeren Proteingehalt bei sofortigem und vollständigem Umschalten auf eine IRES Translation unter Glutaminmangel im Vergleich zu der Kontrollbedingung unter AZD8055 Gabe zur Folge.

Beide Transporter liegen jedoch bezüglich ihres Proteingehaltes in der Kontrollbedingung bei AZD8055 Gabe signifikant über dem Proteingehalt bei Glutaminmangel. Dies könnte darin begründet sein, dass die im ELISA verwendete AZD8055 Konzentration nicht zur vollständigen Inhibierung von 4EBP1 führt. So könnte zumindest teilweise eine *cap-dependent* Translation erfolgen.

Lediglich im Falle von MCT1 kann der Glutamineffekt durch AZD8055 aufgehoben werden. Bereits Halestrap and Meredith, 2004 stellten die unbestätigte Hypothese auf, dass der MCT1 Proteingehalt durch eine eIF4E vermittelte Translation erhöht werden kann. Zudem wiesen sie eine Korrelation zwischen MCT1 Expression und den Phosphorylierungsstatus von eIF4E und 4E-BP1 nach. Auch gibt es nach derzeitigem Kenntnisstand keine Hinweise auf eine IRES in der MCT1 Aminosäuresequenz. Dies stützt die Ergebnisse in den ELISA Experimenten und führt zu der in Abbildung 40 gezeigten Hypothese, dass MCT1 im Gegensatz zu GLUT1 und GLUT3 nicht mittels einer IRES translatiert werden kann. Dies bekräftigen auch die Experimente von Zheng *et al.*, 2016, in denen eine reduzierte Aminosäurenkonzentration im Kulturmedium zu einer Inhibition der Phosphorylierung von 4EBP1 führen kann und somit eine *cap-dependent* Translation beeinträchtigt wird.



**Abbildung 39: Schematische Darstellung der Hypothese der glutaminabhängigen Regulation von GLUT1, GLUT3 und MCT1 auf Proteinebene.** A) In Anwesenheit von Glutamin und Glucose erfolgt die *cap-dependent* Translation der Transporter. B) Unter Glutaminmangel kann mTORC1 4E-BP1 nicht mehr inhibieren. Dies hat zur Folge, dass eIF4E für die *cap-dependent* Translation nicht mehr zur Verfügung steht und ein Umschalten zur IRES Translation für GLUT1 und GLUT3 erfolgt. MCT1 steht dieser Translationsweg nach derzeitigem Kenntnisstand nicht zur Verfügung.

#### 4.2.3 Glucosemangel reguliert den GLUT1, GLUT3 und MCT1 Proteingehalt mittels mTORC1 und S6K

Zusätzlich zu dem Glutamineffekt konnte durch die qRT-PCR und ELISA Experimente eine alleinige Glucoseabhängigkeit von GLUT1 auf Proteinebene aber nicht auf mRNA Ebene ermittelt werden. Diese Beobachtung spricht für einen translationalen Prozess. Durch die Inhibitoren in den ELISA Assays ist der Glucoseeffekt nicht beeinflussbar. Nach den 24 stündigen Mangelbehandlung zeigt GLUT3 bei der qRT-PCR keine Veränderungen auf

---

mRNA Ebene. Auf Proteinebene zeigt GLUT3 in den ELISA Experimenten keine signifikante Änderung durch Glucosemangel im Vergleich zum Kontrollmedium.

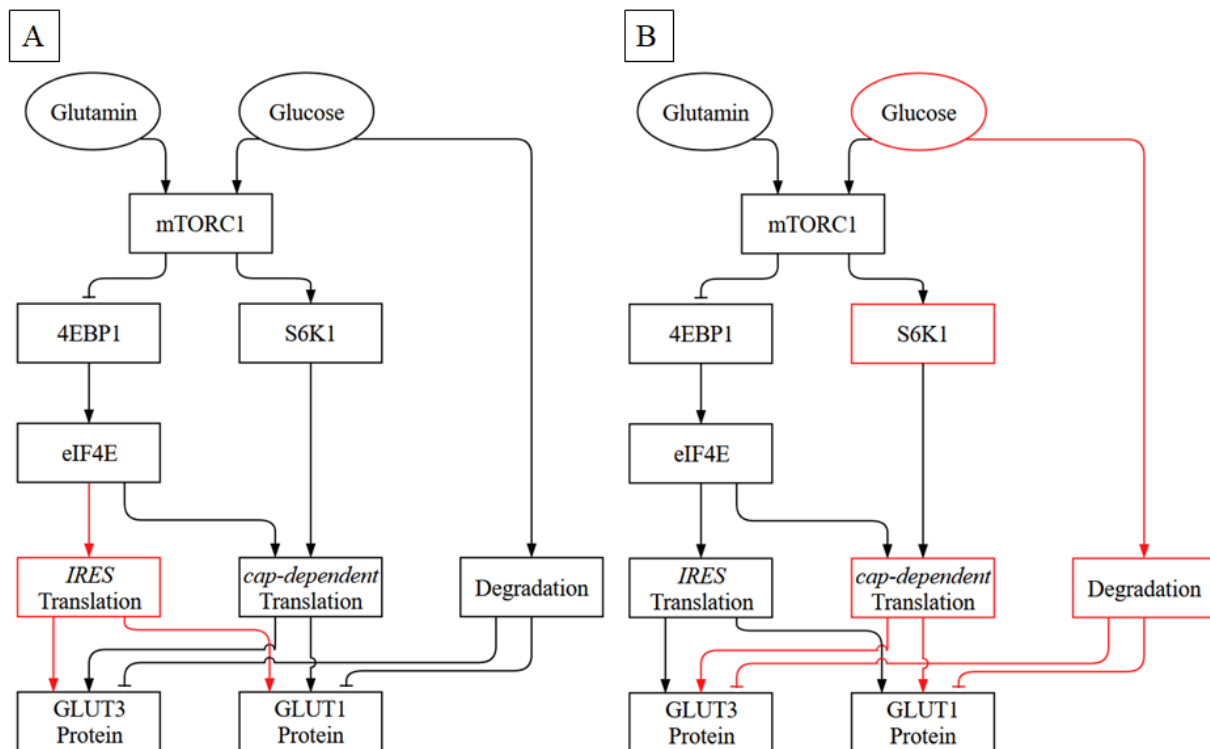
Fladeby *et al.*, 2003 konnten keinen Einfluss durch Glucosemangel auf den GLUT1 mRNA Gehalt nach 24 Stunden Behandlungsdauer feststellen. Zudem konnten die Autoren einen Rapamycin unabhängigen Anstieg des GLUT1 Proteingehalts und einen unveränderten GLUT3 mRNA Gehalt bei Glucosemangel nachweisen. Zum Proteingehalt konnten die Autoren aufgrund von Kreuzreaktivitäten des Detektionsantikörpers keine Aussage treffen. Somit stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Einklang mit den Beobachtungen von Fladeby *et al.*, 2003 und das obwohl sich der Versuchsaufbau von Fladeby *et al.*, 2003 vom Ansatz der vorliegenden Arbeit unterscheidet:

Die Autoren verabreichten Insulin an Zellen der Nebenniere. Die Vergleichbarkeit der ergebnisse an verschiedenen Zelltypen spricht für einen stark konservierten Regulationsmechanismus von GLUT1 und GLUT3.

Glucoseverfügbarkeit spielt eine zentrale Rolle bei der Proteinhomöostase. Bei ausreichender nutritorischer Versorgung sind Zellen in der Lage, wie von Mizrachy-Schwartz *et al.*, 2007; Marr *et al.*, 2007; Thomas D. Baird and Ronald C. Wek, 2012 beschrieben, *cap-dependent* Translationen durchzuführen. Unter nutritorischem Stress wird dieser Mechanismus an verschiedenen Stellen gestört. Dieser Translationsweg kann durch den Einsatz der Inhibitoren im ELISA nahezu ausgeschlossen werden, da die Inhibierung von mTORC1 / 4E-BP1 mittels AZD8055 zu einer signifikanten Erhöhung des GLUT1 und GLUT3 Proteingehaltes bei Glucosemangel führt. Die Behandlung mit Rapamycin hat keinen Effekt auf GLUT1 oder GLUT3.

Rapamycin hat laut Fernandez *et al.*, 2001 keine negativen Auswirkungen auf die IRES Translation. Mizrachy-Schwartz *et al.*, 2007 konnten sogar eine Steigerung der IRES Translation bei aktiver AMPK und gleichzeitiger Rapamycingabe feststellen. Dies ist mit den Ergebnissen bezüglich Rapamycinbehandlung in den ELISA Experimenten vereinbar. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass unter Glucosemangel eine IRES Translation von GLUT1 und GLUT3 stattfindet. Gestützt wird dies durch die Folgerung von Marr *et al.*, 2007 und Mizrachy-Schwartz *et al.*, 2007, dass eine Störung der *cap-dependent* Translation für einige Proteine zur Translation mittels IRES führt, sobald die AMPK aktiviert wird.

Jedoch ist der Proteingehalt der beiden Transporter in den ELISA Assays trotz der gleichen hypothetischen Regulationsmechanismen unter Glucosemangel höher als unter Glutaminmangel. Qualls-Histed SJ *et al.*, 2023 konnten bei hohen Glucosekonzentrationen einen Internalisierungsmechanismus für GLUT1 nachweisen. Die Autoren konnten nicht ausschließen, dass dieser Mechanismus letztendlich zum Abbau der GLUT1 Membranproteine führt. Peth *et al.*, 2013 gaben die ATP Hydrolyisierung als limitierenden Faktor für die Substratdegradation an. Somit könnte ein, wie in Abbildung 40 dargestellter, verminderter Abbau von von GLUT1 und GLUT3 Proteinen ursächlich für den erhöhten Proteingehalt im ELISA unter Glucosemangel sein.



**Abbildung 40: Schematische Darstellung der Hypothese der glucoseabhängigen Regulation von GLUT1 und GLUT3 auf Proteinebene.** A) In Anwesenheit von Glutamin und Glucose erfolgt die *cap-dependent* Translation der Transporter. Die GLUT1 und GLUT3 Proteine werden teilweise degradiert. B) Unter Glucosemangel ist die *cap-dependent* Translation inhibiert und die Degradation ist ebenfalls beeinträchtigt (rot dargestellt). Dies hat zur Folge, dass durch IRES Translation der Proteingehalt von GLUT1 und GLUT3 steigt.

Ein weiteres Ergebnis, welches durch die systematische Vorenthaltung verschiedener Energieträger in qRT-PCR und ELISA ermittelt wurde, ist die Glucoseabhängigkeit des

---

Lactattransporters MCT1 auf Protein- und mRNA Ebene. Hierbei ist der mRNA Gehalt unter Glucosemangel erniedrigt, während der Proteingehalt erhöht ist.

Galardo *et al.*, 2007 konnten durch eine AICAR vermittelte AMPK Aktivierung den MCT1 mRNA Gehalt reduzieren, was die Ergebnisse der qRT-PCR auf mRNA Ebene bestätigt. Halestrap and Meredith, 2004 wiesen experimentell nach, dass bei einer AMPK Aktivierung mittels AICAR die MCT1 Expression erhöht werden kann. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den ELISA Experimenten überein. Dies legt nahe, dass die Regulation von MCT1 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene AMPK abhängig ist.

Folglich muss zur Erstellung eine Hypothese der Regulation von MCT1 auf mRNA Ebene zunächst der Transkriptionsmechanismus, soweit bekannt, eingehender betrachtet werden.

Ullah *et al.*, 2006 zeigten, dass sowohl das MCT1 Gen als auch das MCT2 Gen im Gegensatz zu dem MCT4 Gen nicht über den Promotor *hypoxia – response element* (HRE) verfügen und somit nicht von HIF1 transkribiert werden können. Im Gegensatz zu GLUT1 kann somit HIF1 als Teil der MCT1 Regulationskaskade weitestgehend ausgeschlossen werden. Daher ist davon auszugehen, dass ein alternativer Transkriptionsmechanismus verantwortlich ist.

Sowohl Chun and Kim, 2021 als auch Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011, dass eine Aktivierung von PGC1 $\alpha$  durch eine Inhibierung von mTORC1 erfolgt. Folglich werden NRF2 und auch MCT1 auf mRNA Ebene herunterreguliert. Dies würde den Ergebnissen der qRT-PCR widersprechen, allerdings betrachteten die Autoren die MCT1 Regulation stets unter hypoxischen Bedingungen und in Muskelzellen.

Benton *et al.*, 2008 betrachtete ebenfalls den Aufbau des Promotors von MCT1 und ermittelte zwei *peroxisome proliferator – activated receptor response elements* (PPREs). Dies führt laut den Autoren zu einer Korrelation zwischen PGC1 $\alpha$  und MCT1. Hashimoto *et al.*, 2007 beschreiben ebenfalls einen Zusammenhang zwischen NRF2 und der Promotorregion des MCT1 Gens, was NRF2 als möglichen Transkriptionsfaktor von MCT1 erscheinen lässt.

Wang *et al.*, 2020 konnte nachweisen, dass im Falle von MCT1 neben NRF2 auch ATF3 eine Rolle als Repressor spielt. Insbesondere bei Glucosemangel im Gehirn konnten Lee *et al.*, 2013 nachweisen, dass ATF3 hochreguliert wird. Somit könnten sowohl ATF3 als auch NRF2 Teil der Regulation von MCT1 auf RNA Ebene sein. In Anbetracht dessen könnte das nach Wang *et al.*, 2020 eine verstärkte Repression der NRF2 vermittelten MCT1 Transkription

---

unter Glucosemangel bedeuten. Ein solcher Transkriptionsmechanismus würde mit den Ergebnissen aus qRT-PCR und ELISA Experimenten übereinstimmen.

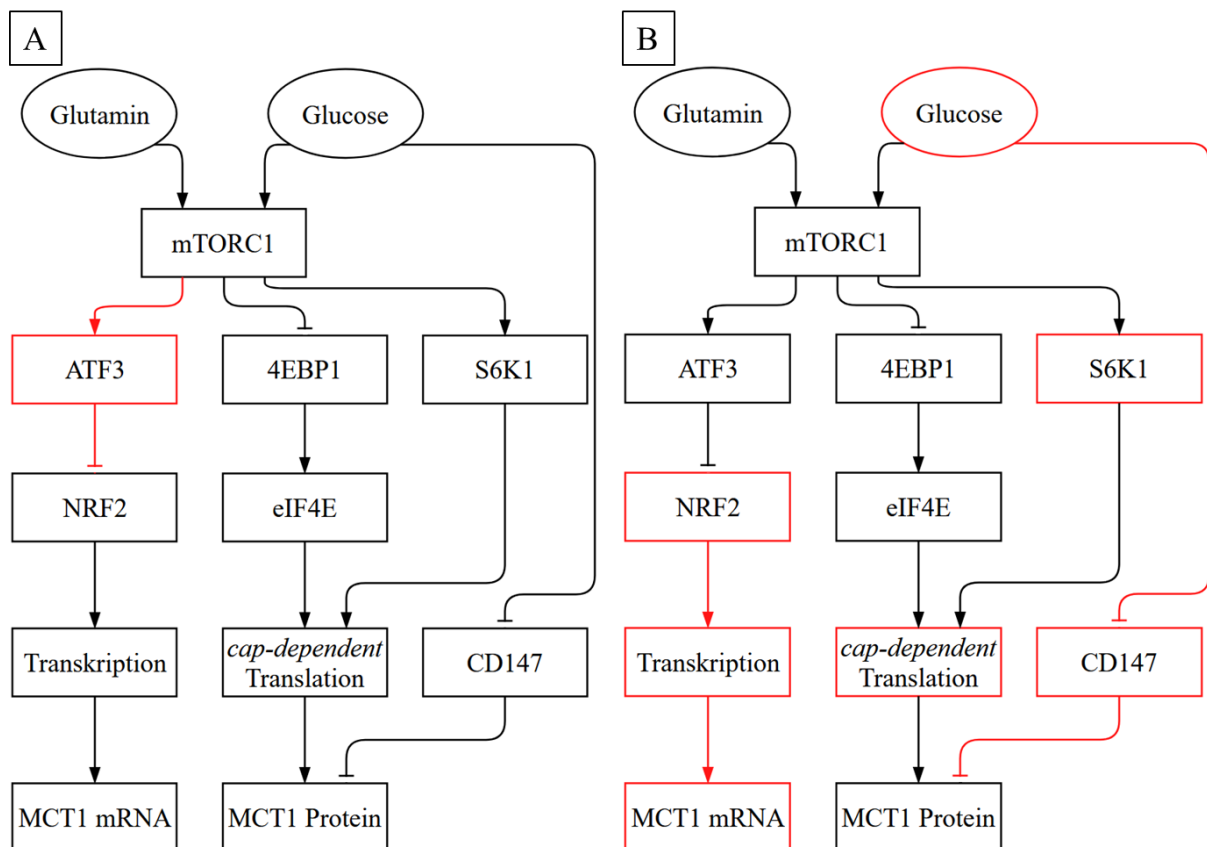
Um die Ergebnisse aus den ELISA Experimenten in diese Hypothese einzubinden, bedarf es zunächst einen Blick auf die bereits bekannten Regulationsmechanismen von MCT1 auf Proteinebene.

Halestrap and Meredith, 2004 und Alves *et al.*, 2014 beschreiben eine Coexpression von MCT1 mit CD147 in verschiedenen Tumoren und insbesondere in Glioblastomen. Dies ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse, da es sich bei den verwendeten SH-SY5Y Zellen um eine Glioblastomzelllinie handelt. Zudem konnten Mahmoud and Ali, 2021 in ihrer Arbeit experimentell nachweisen, dass CD147 glucoseabhängig ist.

So zeigten sie, dass CD147 bei hoher Glucosekonzentration verstärkt exprimiert wird und überwiegend in glycolysierter Form vorliegt. Wu *et al.*, 2017 stellten fest, dass CD147 in internalisierter, glycolysierter Form von FBXO22 ubiquitiniert und degradiert wird. Dieser Mechanismus führt zu einem konstanten oder niedrigeren CD147 Gehalt in der Zellmembran. Auch stellten die Autoren die begründete Hypothese auf, dass dieser Degradationsmechanismus ebenfalls Auswirkungen auf den MCT1 Gehalt der Zellmembran hat. Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit würde dies im Umkehrschluss bedeuten, dass ein Glucosemangel zu einem verminderten Abbau von CD147 führt. Dies würde eine Steigerung des MCT1 Proteingehaltes nachsichziehen. Den Zusammenhang zwischen Glucosemangel, CD147 Stabilisierung und erhöhter MCT1 Proteinmenge konnten de Saedeleer *et al.*, 2014 experimentell nachweisen, was die Hypothese der vorliegenden Arbeit in Abbildung 41 untermauert. Dies wird zudem durch die Beobachtung in den ELISA Experimenten, dass Rapamycin keine Auswirkungen auf den Glucoseeffekt hat, bekräftigt.

AZD 8055 führt im ELISA zu einem niedrigeren MCT1 Proteingehalt, welcher sich nicht mehr signifikant von der Kontrollbedingung unterscheidet. Dies wäre durch das Fehlen der IRES in der MCT1 Aminosäuresequenz zu erklären.

Dies sind neue Erkenntnisse im Forschungsbereich der Regulation von Monocarboxylattransportern.



**Abbildung 41: Schematische Darstellung der Hypothese der glucoseabhängigen Regulation von MCT1 auf mRNA und Proteinebene.** A) In Anwesenheit von Glutamin und Glucose erfolgt die *cap-dependent* Translation der Transporter, die Transkription durch NRF2 kann durch die Inhibition von ATF3 erfolgen (rot dargestellt). Die MCT1 Proteine werden teilweise degradiert, da der Glucosegehalt eine Internalisierung und somit einen Abbau von CD147 zur Folge hat. B) Unter Glucosemangel ist die *cap-dependent* Translation inhibiert und die Degradation ist ebenfalls beeinträchtigt, da unter Glucosemangel CD147 und MCT1 in der Membran stabilisiert werden. NRF2 ist unter Glucosemangel durch den Repressor ATF3 inhibiert und die Transkription von MCT1 mRNA vermindert.

#### 4.2.4 Kombiniertes Glutamin- und Glucosemangel reguliert GLUT1, GLUT3 und MCT1 Proteingehalt mittels mTORC1, S6K und 4EBP1

Die Betrachtung eines kombinierten Glucose- und Glutaminmangels stellt einen neuen Forschungsansatz für die Regulation von Glucose- und Lactattransportern dar. Bisherige

---

Studien wie beispielsweise Oburoglu *et al.*, 2014 betrachteten dies vor dem Hintergrund der Tumorentwicklung oder Stammzellendifferenzierung.

GLUT1, GLUT3 sowie MCT1 weisen bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel im ELISA einen erhöhten Proteingehalt im Vergleich zum Kontrollmedium auf. Dies ist vergleichbar mit den ELISA Ergebnissen dem bei alleinigem Glucosemangel. Es ist daher anzunehmen, dass eine Umschaltung von *cap-dependent* zu IRES Translation erfolgt wie bereits für den alleinigen Glucosemangel diskutiert. Vorausgesetzt, der Transporter besitzt eine solche IRES in der Aminosäuresequenz.

Bei Gabe der Inhibitoren unterscheidet sich der Proteingehalt zwischen den Transportern. Die Verwendung von Rapamycin führt im ELISA zu einem niedrigeren GLUT1 Proteingehalt, bei AZD8055 ist der Proteingehalt von GLUT1 erhöht. Dies legt die Hypothese nahe, dass die beobachteten Änderungen von GLUT1 mit mTORC1 assoziiert sind. 4E-BP1 hat in diesem Fall eher hemmende Funktionen auf die Translation von GLUT1.

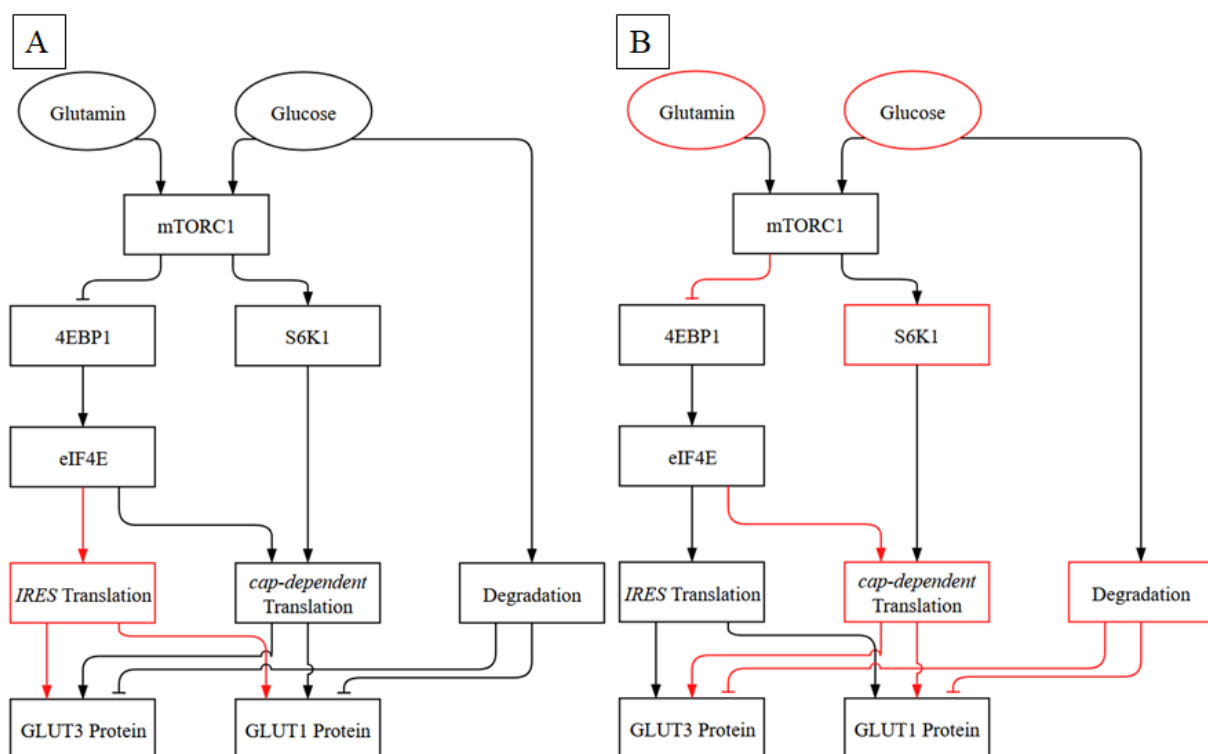
Der GLUT1 mRNA Gehalt bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel ist in der qRT-PCR erniedrigt. Des Weiteren findet sich erneut eine Korrelation mit dem HIF1 $\alpha$  Proteingehalt in den ELISA Experimenten. Unter kombiniertem Glucose- und Glutaminmangel kann keine Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  durch Glutamin, erfolgen wie von Kappler *et al.*, 2019 beschrieben. Da HIF1 von Laughner *et al.*, 2001 und Semenza, 2010 als Transkriptionsfaktor von GLUT1 identifiziert wurde, scheint der niedrigere mRNA Gehalt durch den geringeren HIF1 $\alpha$  Proteingehalt begründet zu sein.

Bei Inhibitorgabe verhält sich der HIF1 $\alpha$  Proteingehalt vergleichbar zu dem Proteingehalt von GLUT1. Laut Laughner *et al.*, 2001 und Semenza, 2010 erhöht die mTORC1 vermittelte Phosphorylierung von S6K die Translation von HIF1 $\alpha$ . Die hemmende Wirkung von Rapamycin auf S6K untersuchten Bernfeld *et al.*, 2018 und Dibble *et al.*, 2009 in ihren Arbeiten. Es ist daher anzunehmen, dass durch die Rapamycingabe die Translation von HIF1 $\alpha$  in den Experimenten der vorliegenden Arbeit ebenfalls beeinträchtigt wird.

Koch *et al.*, 2020 konnte für die IRES Translation eine geringere Translationsgeschwindigkeit im Vergleich zur *cap-dependent* Translation nachweisen. Erfolgt zusätzlich zu dem geringeren GLUT1 mRNA Gehalt die Hemmung von S6K durch Rapamycingabe, könnte dies mit der Umschaltung zur IRES Translation zu einem verminderten GLUT1 Proteingehalt führen.

Der mRNA Gehalt von GLUT3 ist weiterhin unbeeinflusst, ebenso hat die Behandlung mit Rapamycin hat in den ELISA Experimenten keinen Effekt auf den GLUT3 Proteingehalt. AZD8055 führt zu einer signifikanten Erhöhung des GLUT3 Proteingehaltes bei kombinierter Mangelbehandlung im Vergleich zu den alleinigen Mangelbedingungen. Dies ist vergleichbar mit dem GLUT1 Proteingehalt in den jeweiligen Versuchsbedingungen. Auch in diesem Fall scheint eine Inhibierung von 4EBP1 für den Proteingehalt des Transporters förderlich zu sein. Es liegt somit nahe, dass GLUT1 und GLUT3 auf Proteinebene ähnlich reguliert werden. Auch ist davon auszugehen dass, wie bereits für die Glucosemangelbedingung diskutiert, eine gestörte Proteindegradation vorliegt.

Abbildung 42 zeigt vereinfacht den hypothetischen Regulationsmechanismus bei Glucose- und Glutaminmangels für GLUT1 und GLUT3 auf Proteinebene.



**Abbildung 42: Schematische Darstellung der Hypothese der Regulation von GLUT1 und GLUT3 auf Proteinebene bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel.** A) In Anwesenheit von Glutamin und Glucose erfolgt die *cap-dependent* Translation der Transporter. Die GLUT1 und GLUT3 Proteine werden teilweise degradiert. B) Unter Glutamin- und Glucosemangel ist die *cap-dependent* Translation inhibiert und die Degradation ist ebenfalls beeinträchtigt (rot dargestellt). Dies hat zur Folge, dass trotz IRES Translation der Proteingehalt von GLUT1 und GLUT3 steigt.

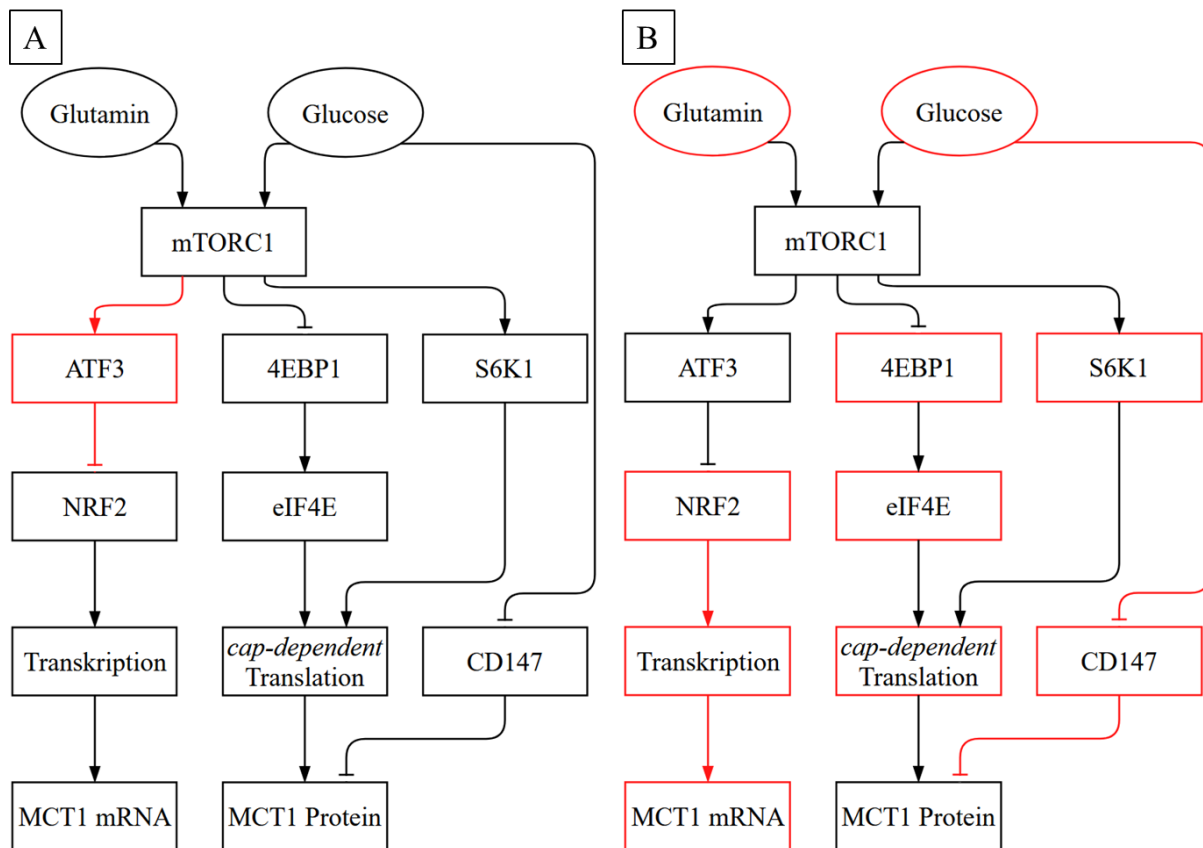
---

Wie bereits bei alleinigem Glucosemangel ist auch bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel der mRNA Gehalt von MCT1 in der qRT-PCR erniedrigt und der Proteingehalt erhöht. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Saedeleer *et al.*, 2014 überein, welche zwei verschiedene Zervixkarzinomzelllinien zunächst ohne Glutamin kultivierten und anschließend zusätzlich die Glucose entzogen.

Saedeleer *et al.*, 2014 führten den MCT1 Proteingehalt auf die posttranslationale Stabilisierung von CD147 und MCT1 in der Zellmembran zurück. Auch ist eine transkriptionale Regulation mittels ATF3 und NRF2 denkbar. Ein solcher Transkriptionsmechanismus würde mit den Ergebnissen der qRT-PCR übereinstimmen.

Sowohl Rapamycin als auch AZD8055 Behandlung führen zu einem erhöhten MCT1 Proteingehalt im ELISA. Wie bereits beschrieben, könnte die Korrelation zwischen CD147 und MCT1 für den Proteingehalt von MCT1 von entscheidender Bedeutung sein, ebenso wie eine beeinträchtigte Proteindegradation. Wie bereits angemerkt, gehen Wu *et al.*, 2017 davon aus, dass die Degradation von CD147 auch Auswirkungen auf den MCT1 Proteingehalt hat. Die Autoren nannten insbesondere Glucosemangel als Faktor für einen verminderten Abbau von CD147 durch FBXO22. Zudem konnten Ge *et al.*, 2023 experimentell nachweisen, dass Aminosäurenmangel bei FBXO22 generell zu einer Phosphorylierung und dadurch zu einer Aktivierung führt. Außerdem fanden die Autoren heraus, dass FBXO22 mTORC1 in Glutaminabwesenheit an der gleichen Domäne wie Rapamycin ubiquitiniert, was die mTORC1 vermittelte Phosphorylierung von S6K inhibiert. Daher könnte der erhöhte MCT1 Proteingehalt im ELISA bei Rapamycingabe darin begründet liegen, dass Rapamycin und FBXO22 um die Bindungsdomäne von mTORC1 kompetitieren.

Zusammen mit der verminderten Proteindegradation könnte dies, wie in Abbildung 43 dargestellt, zu einem erhöhten Proteingehalt von MCT1 unter kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel führen.



**Abbildung 43: Schematische Darstellung der Hypothese der von MCT1 auf mRNA und Proteinebene bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel.** A) In Anwesenheit von Glutamin und Glucose erfolgt die *cap-dependent* Translation der Transporter, die Transkription von MCT1 mRNA durch NRF2 kann erfolgen. Die MCT1 Proteine werden teilweise degradiert, da der Glucosegehalt eine Internalisierung und somit einen Abbau von CD147 zur Folge hat. B) Unter kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel ist die *cap-dependent* Translation zwar weitestgehend inhibiert aber die Stabilisierung von CD147 und MCT1 in der Membran könnte dennoch zu einem erhöhten MCT1 Proteingehalt führen. NRF2 ist unter Glucosemangel durch die Hochregulation von ATF3 inhibiert und vermindert die Transkription von MCT1 mRNA.

Wie bereits bei GLUT1 und GLUT3 beobachtet, erhöht auch bei MCT1 die AZD8055 Gabe den Proteingehalt bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel. Die Wirkweise des Inhibitors wurde bisher im Rahmen der Tumorthherapie an soliden Tumoren oder *in vivo* Studien charakterisiert. Eine Kombination von Glutamin- und Glucosemangel trat in den bisherigen Studien nicht auf. Allerdings fanden Ha-yeon Jee *et al.*, 2021 in einer Leberkarzinom Zelllinie Hinweise darauf, dass eine längerfristige AZD8055 Gabe im Zeitraum von 6 bis 8 Stunden eine vorübergehende Aktivierung verschiedener zellerhaltenden Regulationsmechanismen zur Folge hat.

---

Welche Auswirkungen dies auf Translation, Stabilität und Abbau der Glucosetransporter hat ist nach derzeitigem Stand der Forschung nicht bekannt. Daher stellt auch dieses Ergebnis eine neue Erkenntnis im Bereich der Glucose- und Lactattransporter Regulation dar.

### **4.3 Akuter Glutaminmangel beeinflusst den GLUT1, GLUT3 und MCT1 Proteingehalt über mTORC1 und 4EBP1**

Die ELISA Experimente wurden zusätzlich zu dem 24 stündigen Versuchszeitraum auch in einem drei stündigen Versuchszeitraum durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass bei GLUT1, GLUT3 und MCT1 sowohl Glutamin- als auch Glucoseeffekt auf Proteinebene bereits nach drei Stunden auftreten. Im Fall von HIF1 $\alpha$  ist lediglich der Glutamineffekt bereits nach drei Stunden mittels ELISA nachweisbar.

Interessanterweise unterscheiden sich die Auswirkungen der verwendeten Inhibitoren auf den Proteingehalt der jeweiligen Transporter und HIF1 $\alpha$  im zeitlichen Verlauf.

So zeigt sich bei HIF1 $\alpha$ , dass Rapamycin keinen Einfluss auf den Glutamineffekt hat und AZD8055 zu einem Glucoseeffekt führt. Dieses Ergebnis spricht zum einen für eine Stabilisierung von HIF1 $\alpha$  durch Glutamin wie von Kappler *et al.*, 2019 und Ullah *et al.*, 2006 beschrieben, da hierbei keine von den Inhibitoren beeinflusste Regulatoren vonnöten sind. Zum anderen könnte eine verminderte globale Proteindegradation wie von Qualls-Histed SJ *et al.*, 2023 beschrieben zu einem Glucoseeffekt unter AZD8055 Gabe führen wie bereits für GLUT1 im 24 stündigen Versuchszeitraum erläutert.

Der Glutamineffekt auf GLUT1 Proteinebene ist im dreistündigen Versuchszeitraum im Gegensatz zum 24 stündigen Versuchszeitraum durch AZD8055 beeinflussbar. Dieser senkt den GLUT1 Proteingehalt auf das Niveau der Glutaminmangelbehandlung. Daraus folgt, dass AZD8055 in den ersten drei Stunden zu einem Umschalten von *cap-dependent* zu IRES Translation führen könnten.

Anhand der Halbwertszeit der GLUT1 mRNA kann eine Beteiligung von transkriptionalen Effekten mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Denn unter

Euglykämie und Normoxie messen Stein *et al.*, 1995 für GLUT1 mRNA eine Halbwertszeit ca. 0,5 Stunden, unter Glucosemangel bis zu zwei Stunden. Somit wäre es denkbar, dass auch in den vorliegenden Mangelbedingungen eine verlängerte Halbwertszeit von ca. zwei Stunden vorliegt. Unter dieser Annahme wären im dreistündigen Versuchszeitraum mRNA basierten Effekte auf Proteinebene nicht messbar.

Gleiches ist für MCT1 anzunehmen. Beide Inhibitoren senken den MCT1 Proteingehalt bei alleinigem Glucosemangel auf das Niveau der kombinierten Mangelbehandlung. Da MCT1 über keine IRES verfügt, bleibt der Glutamineffekt bei alleinigem Glutaminmangel erhalten.

GLUT3 weist bei der 3 stündigen Mangelbehandlung im ELISA auf Proteinebene einen Glutamineffekt sowohl bei alleinigem Glutaminmangel als auch bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel auf. Im 24 stündigen Versuchszeitraum war dies lediglich bei alleinigem Glutaminmangel zu beobachten.

Der Glutamineffekt bei GLUT3 bleibt von Rapamycin unbeeinflusst, kann jedoch durch AZD8055 in beiden Fällen aufgehoben werden. Dies deutet auf eine Beteiligung von 4EBP1 / eIF4E hin. Glutamin und 4EBP1 sind für das Umschalten von *cap-dependent* zu IRES Translation essenziell. Die Ergebnisse legen daher nahe, dass der GLUT3 Proteingehalt bei Glutaminmangel durch unmittelbares Umschalten zur IRES Translation sichergestellt wird. Zha *et al.*, 2015 konnten einen Zusammenhang zwischen GLUT3 Proteingehalt und mTORC1 Aktivität nachweisen, allerdings fokussierten sich die Autoren auf die transkriptionaler Ebene. Über die translationale Regulation trafen die Autoren keine Aussage. Gleiches trifft auf Fladeby *et al.*, 2003 und Agostini *et al.*, 2016 zu. Daher stellen die Ergebnisse von GLUT3 auf Proteinebene neue Erkenntnisse im Bereich der posttranskriptionalen Regulation von GLUT3 dar.

#### **4.4 Keine Translokation von GLUT1, GLUT3 oder MCT1 bei Glutamin- und / oder Glucosemangel**

Für die Transporter GLUT1, GLUT3 sowie MCT1 werden von Weisova *et al.*, 2009; Qualls-Histed SJ *et al.*, 2023 oder Eichner *et al.*, 2016 AMPK vermittelte

---

Translokationsmechanismen beschreiben. Da in allen Fällen die energieabhängige AMPK involviert ist, könnte eine Translokation der Glucose- und Lactattransporter hypothetisch auch bei Änderungen der Glucoseverfügbarkeit erfolgen.

Es wird bisher angenommen, dass GLUT1 durch eine aktivierte AMPK in die Zellmembran transloziert wird, wie von Barnes *et al.*, 2002 und Wu *et al.*, 2013 beschrieben, wobei die exakte Regulationskaskade bislang unbekannt ist. Barnes *et al.*, 2002 konnten jedoch keine ausschließlich glucoseabhängige Translokation nachweisen. Lediglich in Kombination mit anderen Substanzen und oxidativem Stress konnten sie eine Translokation induzieren. Dies bestätigt die Ergebnisse der Biotinylierungsassays bezüglich GLUT1, wo keine Translokation messbar ist.

Wu *et al.*, 2013 konnten zwar eine Internalisierung von GLUT1 bei hohen Glucosekonzentrationen von bis zu 20 mM Glucose nachweisen, allerdings handelte es sich hierbei um HEPG2 Zellen. Zudem erfolgte die Glucosebehandlung für zehn Minuten. Kumar *et al.*, 2004 konnten ebenfalls experimentell nachweisen, dass GLUT1 bei Glucosemangel innerhalb der Plasmamembran umverteilt wird. Die Autoren verwendeten in dem experimentellen Ansatz Fructose als alternativer Energieträger und eine Adipozyten Zelllinie. Da weder Behandlungszeiten, Glucosekonzentration noch Art der Zellen mit dem experimentellen Aufbau der vorliegenden Arbeit übereinstimmen, besteht kein Widerspruch zu Barnes *et al.*, 2002 oder zu den Ergebnissen des Biotinylierungsassays.

Qualls-Histed SJ *et al.*, 2023 wiederum konnten eine Internalisierung von GLUT1 aus der Membran in Lysosomen im 24 stündigen Versuchszeitraum bei hoher Glucosekonzentration nachweisen. In der Arbeit von Qualls-Histed SJ *et al.*, 2023 werden GLUT1 Transporter in Subtypen unterschieden. Hierbei sind auch Subpopulationen von GLUT1 in Erscheinung getreten, auf welche Glucosebehandlungen keinen signifikanten Einfluss hatten. In der vorliegenden Arbeit wurde keine solche Unterscheidung von GLUT1 Transportern getroffen, wodurch die Arbeiten nicht in Widerspruch stehen.

Eine Translokation von GLUT3 wie durch Ferreira *et al.*, 2011 oder Weisova *et al.*, 2009 beschrieben, konnte in den Biotinylierungsassays nicht beobachtet werden. Dies könnte darin begründet sein, dass sowohl Ferreira *et al.*, 2011 als auch Weisova *et al.*, 2009 mittels NMDA Stimulation einen erhöhten Energiebedarf bei den Neuronen induzierten. Im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit wurden lediglich Energieträger vorenthalten und keine neuronale Stimulation vorgenommen.

In den Biotinylierungsassays konnte für MCT1 ebenfalls keine signifikante Änderung im Verhältnis zwischen membranständigem und intrazellulärem Proteingehalt festgestellt werden. Mahmoud and Ali, 2021 zeigten, dass CD147 bei hoher Glucosekonzentration verstärkt exprimiert wird und überwiegend in glycolysierter und somit, nach Wu *et al.*, 2017, in internalisierter Form vorliegt. Dies müsste nach Eichner *et al.*, 2016 auch zu einer verringerten Membranständigkeit von MCT1 führen, was bei den Biotinylierungsassays nicht der Fall ist. Dies könnte darin begründet liegen, dass eine wie von Wu *et al.*, 2017 beschriebene Degradation wahrscheinlich ist. Somit würde nach der Internalisierung ein Abbau von MCT1 Proteinen erfolgen. Dadurch wäre die Relation zwischen membranständigem und intrazellulärem MCT1 Proteingehalt konstant. Der Gesamtproteingehalt von MCT1 kann hingegen verändert sein. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass unter Glucosemangel eine direkte Kopplung von MCT1 an CD147 und Einbau in die Zellmembran erfolgen müsste.

## 4.5 Fazit

Die untersuchten Glucose- und Lactattransporter GLUT1, GLUT3 und MCT1 sind sowohl durch Glutamin- als auch durch Glucosemangel beeinflussbar. Hierbei zeigt sich, dass die Transporter auf Proteinebene einheitlich durch mTORC1 / S6K bei Glucosemangel und durch mTORC1 / 4EBP1 bei Glutaminmangel reguliert werden. Diese Formen der Regulation können bei allen Transportern bereits nach dreistündiger Mangelbehandlung auftreten und erlauben eine schnelle Anpassung an Änderungen der extrazellulären Glutamin- oder Glucosekonzentration.

Während auf Proteinebene eine vom Energieträger weitestgehend einheitliche Regulationskaskade verantwortlich ist, zeigt sich auf mRNA Ebene ein heterogenes Bild: So ist GLUT3 nicht durch die Mangelbehandlungen beeinflussbar, GLUT1 ausschließlich bei Glutaminmangel und MCT1 ausschließlich bei Glucosemangel. Die Regulationskaskaden unterscheiden sich hierbei nach Energieträger und sind für die Transporter individuell.

Eine Translokation ist für keinen der betrachteten Transporter nachweisbar.

## 5 Zusammenfassung

Energiemangel im zentralen Nervensystem bedroht das Überleben der Neuronen lang- und kurzfristig. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Mechanismen Neuronen im Falle von Glucose- oder Glutaminmangel nutzen um Glucose- und Lactattransporter zu regulieren. Für GLUT1, GLUT3 und MCT1 konnten hierbei Änderungen auf mRNA und / oder Proteinebene beobachtet werden.

Mit der SH-SY5Y Zelllinie als *in vitro* Modell konnten mittels quantitativer Real Time PCR keine Änderungen des GLUT3 mRNA Gehalts, eine Senkung des GLUT1 mRNA Gehalts ausschließlich bei Glutaminmangel und eine Senkung des MCT1 mRNA Gehalts ausschließlich bei Glucosemangel nachgewiesen werden. HIF1 $\alpha$  wies einen verminderten Proteingehalt unter Glutaminmangel auf und konnte als Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF1 als Teil der Regulationskaskade von GLUT1 auf mRNA Ebene identifiziert werden.

Durch den Einsatz der Inhibitoren Rapamycin und AZD8055 in den ELISA Experimenten zeigte sich, dass sowohl GLUT1 und GLUT3 als auch MCT1 auf Proteinebene einheitlich durch mTORC1 / S6K bei Glucosemangel und durch mTORC1 / 4EBP1 bei Glutaminmangel reguliert werden. Diese Effekte treten bereits nach dreistündigem Glucose- oder Glutaminmangel auf, was eine schnelle Regulation von GLUT1, GLUT3 und MCT1 dokumentiert.

Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse im Bereich der Glucose- und Lactattransporter von Neuronen, dient die vorliegende Arbeit als Grundlage zum eingehenderen Verständnis von zellulären Regulationsmechanismen bei Glucose- und Glutaminmangel.

## 6 Summary

Energy deficiency in the Central Nervous System threatens both the short and the long term survival of neurons. This study investigated the mechanisms neurons use to regulate glucose and lactate transporters in case of glucose or glutamine deprivation. In case of GLUT1, GLUT3 and MCT1, changes at mRNA and/or protein levels were observed.

With the SH-SY5Y cell line serving as *in vitro* model, quantitative real-time PCR revealed no changes in GLUT3 mRNA levels, a decrease in GLUT1 mRNA levels exclusively under glutamine deprivation, and a decrease in MCT1 mRNA levels exclusively under glucose deprivation. HIF1 $\alpha$ , a known subunit of transcription factor HIF1, was identified playing a role in the regulation cascade of GLUT1 at mRNA level.

The use of the inhibitors rapamycin and AZD8055 in ELISA experiments demonstrated that GLUT1, GLUT3 and MCT1 uniformly regulated at protein level by mTORC1/S6K in case of glucose deprivation and mTORC1/4EBP1 in case of glutamine deprivation. These effects occur already after three hours of glucose or glutamine deprivation, indicating a rapid regulation of GLUT1, GLUT3 and MCT1.

Based on these new findings in the field of glucose and lactate transporters in neurons, the present study provides a fundament for deeper understanding of cellular regulatory mechanisms under glucose and glutamine deprivation.

## 7 Appendix

### 7.1 Literaturverzeichnis

- Agostini M, Romeo F, Inoue S et al.** 2016. Metabolic reprogramming during neuronal differentiation. *Cell death and differentiation* **23**, 1502–1514.
- Altomare DA, Khaled AR.** 2012. Homeostasis and the Importance for a Balance Between AKT/mTOR Activity and Intracellular Signaling. *Current Medicinal Chemistry* **19**, 3748–3762.
- Alves VA, Pinheiro C, Morais-Santos F, Felipe-Silva A, Longatto-Filho A, Baltazar F.** 2014. Characterization of monocarboxylate transporter activity in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology* **20**, 11780–11787.
- Amaral AI, Teixeira AP, Sonnewald U, Alves PM.** 2011. Estimation of intracellular fluxes in cerebellar neurons after hypoglycemia: importance of the pyruvate recycling pathway and glutamine oxidation. *Journal of neuroscience research* **89**, 700–710.
- Amato S, Man H-Y.** 2011. Bioenergy sensing in the brain: the role of AMP-activated protein kinase in neuronal metabolism, development and neurological diseases. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **10**, 3452–3460.
- Amiel SA, Dixon T, Mann R, Jameson K.** 2008. Hypoglycaemia in Type 2 diabetes. *Diabetic medicine a journal of the British Diabetic Association* **25**, 245–254.
- Ardestani A, Lupse B, Kido Y, Leibowitz G, Maedler K.** 2018. mTORC1 Signaling: A Double-Edged Sword in Diabetic  $\beta$  Cells. *Cell metabolism* **27**, 314–331.
- Barnes K, Ingram JC, Porras OH et al.** 2002. Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of cell science* **115**, 2433–2442.

- Benomar Y, Naour N, Aubourg A et al.** 2006. Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase- dependent mechanism. *Endocrinology* **147**, 2550–2556.
- Benton CR, Yoshida Y, Lally J, Han X-X, Hatta H, Bonen A.** 2008. PGC-1alpha increases skeletal muscle lactate uptake by increasing the expression of MCT1 but not MCT2 or MCT4. *Physiological genomics* **35**, 45–54.
- Bergersen LH.** 2015. Lactate transport and signaling in the brain: potential therapeutic targets and roles in body-brain interaction. *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **35**, 176–185.
- Bernfeld E, Menon D, Vaghela V et al.** 2018. Phospholipase D-dependent mTOR complex 1 (mTORC1) activation by glutamine. *The Journal of biological chemistry* **293**, 16390–16401.
- Boado RJ, Tsukamoto H, Pardridge WM.** 1996. Evidence for translational control elements within the 5'-untranslated region of GLUT1 glucose transporter mRNA. *Journal of neurochemistry* **67**, 1335–1343.
- Burns M, Valdivia H.** 2008. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *European Food Research and Technology* **226**, 1513–1524.
- Chresta CM, Davies BR, Hickson I et al.** 2010. AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer research* **70**, 288–298.
- Chun Y, Kim J.** 2021. AMPK-mTOR Signaling and Cellular Adaptations in Hypoxia. *International journal of molecular sciences* **22**.
- Cura AJ, Carruthers A.** 2012. Role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism, and homeostasis. *Comprehensive Physiology* **2**, 863–914.
- de Saedeleer CJ de, Porporato PE, Copetti T et al.** 2014. Glucose deprivation increases monocarboxylate transporter 1 (MCT1) expression and MCT1-dependent tumor cell migration. *Oncogene* **33**, 4060–4068.

- Dengler F.** 2020. Activation of AMPK under Hypoxia: Many Roads Leading to Rome. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 2428.
- Dibble CC, Asara JM, Manning BD.** 2009. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Molecular and cellular biology* **29**, 5657–5670.
- Ding C, Zhang J, Li B et al.** 2018. Cornin protects SH-SY5Y cells against oxygen and glucose deprivation-induced autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Molecular medicine reports* **17**, 87–92.
- Divakaruni AS, Wallace M, Buren C et al.** 2017. Inhibition of the mitochondrial pyruvate carrier protects from excitotoxic neuronal death. *The Journal of cell biology* **216**, 1091–1105.
- Dravid A, Raos B, Svirskis D, O'Carroll SJ.** 2021. Optimised techniques for high-throughput screening of differentiated SH-SY5Y cells and application for neurite outgrowth assays. *Scientific reports* **11**, 23935.
- Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B.** 1993. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain research* **623**, 208–214.
- Eichner R, Heider M, Fernández-Sáiz V et al.** 2016. Immunomodulatory drugs disrupt the cereblon–CD147–MCT1 axis to exert antitumor activity and teratogenicity. *Nature Medicine* **22**, 735–743.
- Falkowska A, Gutowska I, Goschorska M, Nowacki P, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I.** 2015. Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *International journal of molecular sciences* **16**, 25959–25981.
- Fernandez J, Yaman I, Mishra R et al.** 2001. Internal ribosome entry site-mediated translation of a mammalian mRNA is regulated by amino acid availability. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 12285–12291.
- Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J.** 2011. Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *The American journal of clinical nutrition* **93**, 884S-90.

- Ferreira JM, Burnett AL, Rameau GA.** 2011. Activity-dependent regulation of surface glucose transporter-3. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 1991–1999.
- Fingar DC, Blenis J.** 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* **23**, 3151–3171.
- Fladeby C, Skar R, Serck-Hanssen G.** 2003. Distinct regulation of glucose transport and GLUT1/GLUT3 transporters by glucose deprivation and IGF-I in chromaffin cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1593**, 201–208.
- Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Meroni SB.** 2007. The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribose, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *Journal of molecular endocrinology* **39**, 279–288.
- Ge M-K, Zhang C, Zhang N et al.** 2023. The tRNA-GCN2-FBXO22-axis-mediated mTOR ubiquitination senses amino acid insufficiency. *Cell metabolism* **35**, 2216-2230.e8.
- Gingras A-C, Raught B, Gygi SP et al.** 2001. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & development* **15**, 2852.
- Guo C, Deshpande M, Niu Y et al.** 2023. HIF-1 $\alpha$  accumulation in response to transient hypoglycemia may worsen diabetic eye disease. *Cell reports* **42**, 111976.
- Guo S, Bragina O, Xu Y et al.** 2008. Glucose up-regulates HIF-1 alpha expression in primary cortical neurons in response to hypoxia through maintaining cellular redox status. *Journal of neurochemistry* **105**, 1849–1860.
- Hædersdal S, Lund A, Knop FK, Vilsbøll T.** 2018. The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes. *Mayo Clinic proceedings* **93**, 217–239.
- Hajiaghaalipour F, Khalilpourfarshbafi M, Arya A.** 2015. Modulation of glucose transporter protein by dietary flavonoids in type 2 diabetes mellitus. *International journal of biological sciences* **11**, 508–524.

- Halestrap AP, Meredith D.** 2004. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Archiv European journal of physiology* **447**, 619–628.
- Halestrap AP, Wilson MC.** 2012. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB life* **64**, 109–119.
- Hao L-S, Liu Q, Tian C et al.** 2019. Correlation and expression analysis of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , glucose transporter 1 and lactate dehydrogenase 5 in human gastric cancer. *Oncology letters* **18**, 1431–1441.
- Hardie DG.** 2014. AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease. *Journal of internal medicine* **276**, 543–559.
- Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K, Brooks GA.** 2007. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 2602–2612.
- Ha-yeon Jee, Yoon-Gyeong Lee, Sol Lee et al.** 2021. Activation of ERK and p38 Reduces AZD8055-Mediated Inhibition of Protein Synthesis in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell Line. *International journal of molecular sciences* **22**.
- Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J.** 2005. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* **123**, 569–580.
- Hua H, Kong Q, Zhang H, Wang J, Luo T, Jiang Y.** 2019. Targeting mTOR for cancer therapy. *Journal of hematology & oncology* **12**, 71.
- Jeon S-M.** 2016. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Experimental & molecular medicine* **48**, e245.
- Julien L-A, Carriere A, Moreau J, Roux PP.** 2010. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Molecular and cellular biology* **30**, 908–921.

- Kappler M, Pabst U, Weinholdt C et al.** 2019. Causes and Consequences of A Glutamine Induced Normoxic HIF1 Activity for the Tumor Metabolism. *International journal of molecular sciences* **20**.
- Kappler M, Taubert H, Schubert J, Vordermark D, Eckert AW.** 2012. The real face of HIF1 $\alpha$  in the tumor process. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **11**, 3932–3936.
- Khan MW, Layden BT, Chakrabarti P.** 2018. Inhibition of mTOR complexes protects cancer cells from glutamine starvation induced cell death by restoring Akt stability. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* **1864**, 2040–2052.
- Koch A, Aguilera L, Morisaki T, Munsky B, Stasevich TJ.** 2020. Quantifying the dynamics of IRES and cap translation with single-molecule resolution in live cells. *Nature structural & molecular biology* **27**, 1095.
- Koekkoek LL, Mul JD, La Fleur SE.** 2017. Glucose-Sensing in the Reward System. *Frontiers in neuroscience* **11**, 716.
- Komar AA, Hatzoglou M.** 2011. Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **10**, 229–240.
- Kourti M, Liaropoulou D, Paschou M et al.** 2022. Enhanced Ca<sup>2+</sup> Entry Sustains the Activation of Akt in Glucose Deprived SH-SY5Y Cells. *International journal of molecular sciences* **23**.
- Kramer J, Smith L.** 2021. Ketogenic Diet in Glut 1 Deficiency Through the Life Cycle: Pregnancy to Neonate to Preschooler. *Child Neurology Open* **8**, 2329048X2110346.
- Kumar A, Xiao Y-P, Laipis PJ, Fletcher BS, Frost SC.** 2004. Glucose deprivation enhances targeting of GLUT1 to lipid rafts in 3T3-L1 adipocytes. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **286**, E568-76.
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL.** 2001. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and cellular biology* **21**, 3995–4004.
- Lee Y-S, Sasaki T, Kobayashi M et al.** 2013. Hypothalamic ATF3 is involved in regulating glucose and energy metabolism in mice. *Diabetologia* **56**, 1383.

- Liu C, Liu G, Zuo X et al.** 2024. MiR-18a affects hypoxia induced glucose metabolism transition in HT22 hippocampal neuronal cell line through the Hif1a gene. *BMC Neurology* **24**.
- Ma XM, Blenis J.** 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 307–318.
- Mahmoud AM, Ali MM.** 2021. High Glucose and Advanced Glycation End Products Induce CD147-Mediated MMP Activity in Human Adipocytes. *Cells* **10**.
- Marín-Hernández A, López-Ramírez SY, Del Mazo-Monsalvo I et al.** 2014. Modeling cancer glycolysis under hypoglycemia, and the role played by the differential expression of glycolytic isoforms. *The FEBS journal* **281**, 3325–3345.
- Marr MT, D'Alessio JA, Puig O, Tjian R.** 2007. IRES-mediated functional coupling of transcription and translation amplifies insulin receptor feedback. *Genes & development* **21**, 175.
- McKenna MC.** 2007. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *Journal of neuroscience research* **85**, 3347–3358.
- Mirabilii S, Ricciardi MR, Tafuri A.** 2020. mTOR Regulation of Metabolism in Hematologic Malignancies. *Cells* **9**.
- Mizrachy-Schwartz S, Kravchenko-Balasha N, Ben-Bassat H, Klein S, Levitzki A.** 2007. Optimization of Energy-Consuming Pathways towards Rapid Growth in HPV-Transformed Cells. *PloS one* **2**, e628.
- Moldogazieva NT, Mokhosev IM, Terentiev AA.** 2020. Metabolic Heterogeneity of Cancer Cells: An Interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK. *Cancers* **12**.
- Mueckler M, Thorens B.** 2013. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular aspects of medicine* **34**, 121–138.
- Navale AM, Paranjape AN.** 2016. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophysical reviews* **8**, 5–9.
- Neasta J, Barak S, Hamida SB, Ron D.** 2014. mTOR complex 1: a key player in neuroadaptations induced by drugs of abuse. *Journal of neurochemistry* **130**, 172–184.

- Oburoglu L, Tardito S, Fritz V et al.** 2014. Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. *Cell stem cell* **15**, 169–184.
- Pellegrini G, Rossier C, Magistretti PJ, Martin JL.** 1996. Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase. *Brain research. Molecular brain research* **38**, 191–199.
- Perez-Escuredo J, van Hee VF, Sboarina M et al.** 2016. Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1863**, 2481–2497.
- Peth A, Nathan JA, Goldberg AL.** 2013. The ATP Costs and Time Required to Degrade Ubiquitinated Proteins by the 26 S Proteasome\*. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 29215–29222.
- Pierre K, Pellerin L.** 2005. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *Journal of neurochemistry* **94**, 1–14.
- Polchi A, Magini A, Di Meo D, Tancini B, Emiliani C.** 2018. mTOR Signaling and Neural Stem Cells: The Tuberous Sclerosis Complex Model. *International journal of molecular sciences* **19**.
- Pruslin FH, To SE, Winston R, Rodman TC.** 1991. Caveats and suggestions for the ELISA. *Journal of Immunological Methods* **137**, 27–35.
- Qualls-Histed SJ, Nielsen CP, MacGurn JA.** 2023. Lysosomal trafficking of the glucose transporter GLUT1 requires sequential regulation by TXNIP and ubiquitin. *iScience* **26**.
- Ramamoorthy P, Shi H.** 2014. Ischemia induces different levels of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  protein expression in interneurons and pyramidal neurons. *Acta neuropathologica communications* **2**, 51.
- Rehni AK, Dave KR.** 2018. Impact of Hypoglycemia on Brain Metabolism During Diabetes. *Molecular neurobiology* **55**, 9075–9088.
- Robinet C, Pellerin L.** 2010. Brain-derived neurotrophic factor enhances the expression of the monocarboxylate transporter 2 through translational activation in mouse cultured cortical neurons. *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **30**, 286–298.

- Saedeleer CJ de, Porporato PE, Copetti T *et al.*** 2014. Glucose deprivation increases monocarboxylate transporter 1 (MCT1) expression and MCT1-dependent tumor cell migration. *Oncogene* **33**, 4060–4068.
- Sandoval D, Cota D, Seeley RJ.** 2008. The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. *Annual review of physiology* **70**, 513–535.
- Semenza GL.** 2010. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development* **20**, 51–56.
- Simpson IA, Carruthers A, Vannucci SJ.** 2007. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **27**, 1766–1791.
- Stanley S, Moheet A, Seaquist ER.** 2019. Central Mechanisms of Glucose Sensing and Counterregulation in Defense of Hypoglycemia. *Endocrine reviews* **40**, 768–788.
- Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E.** 1995. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Molecular and cellular biology* **15**, 5363–5368.
- Suryawan A, Davis TA.** 2018. Amino Acid- and Insulin-Induced Activation of mTORC1 in Neonatal Piglet Skeletal Muscle Involves Sestatin2-GATOR2, Rag A/C-mTOR, and RHEB-mTOR Complex Formation. *The Journal of nutrition* **148**, 825–833.
- Svitkin YV, Herdy B, Costa-Mattioli M, Gingras A-C, Raught B, Sonenberg N.** 2005. Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Molecular and cellular biology* **25**, 10556–10565.
- Taha C, Tsakiridis T, McCall A, Klip A.** 1997. Glucose transporter expression in L6 muscle cells: regulation through insulin- and stress-activated pathways. *The American journal of physiology* **273**, E68-76.
- Tennant JR.** 1964. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* **2**, 685–694.

- Thomas D. Baird, Ronald C. Wek.** 2012. Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation and Translational Control in Metabolism. *Advances in Nutrition* **3**, 307.
- Towler MC, Hardie DG.** 2007. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circulation research* **100**, 328–341.
- Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP.** 2006. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* **281**, 9030–9037.
- Wang L, Zhu R, Wang J, Yu S, Wang J, Zhang Y.** 2020. Nrf2 Activation Enhances Muscular MCT1 Expression and Hypoxic Exercise Capacity. *Medicine & Science in Sports & Exercise* **52**, 1719.
- Weisova P, Concannon CG, Devocelle M, Prehn JHM, Ward MW.** 2009. Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 2997–3008.
- Wen D-Y, Lin P, Pang Y-Y et al.** 2018. Expression of the Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 665 (LINC00665) Gene and the Cell Cycle in Hepatocellular Carcinoma Using The Cancer Genome Atlas, the Gene Expression Omnibus, and Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Medical science monitor international medical journal of experimental and clinical research* **24**, 2786–2808.
- Wincewicz A, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S.** 2007. Clinicopathological significance and linkage of the distribution of HIF-1alpha and GLUT-1 in human primary colorectal cancer. *Pathology oncology research POR* **13**, 15–20.
- Wu B, Liu Z-Y, Cui J et al.** 2017. F-Box Protein FBXO22 Mediates Polyubiquitination and Degradation of CD147 to Reverse Cisplatin Resistance of Tumor Cells. *International journal of molecular sciences* **18**, 212.
- Wu N, Zheng B, Shaywitz A et al.** 2013. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Molecular cell* **49**, 1167–1175.

- 
- Xu J, Lu C, Wang J, Zhang R, Qian X, Zhu H.** 2015. Regulation of Human Trophoblast GLUT3 Glucose Transporter by Mammalian Target of Rapamycin Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 13815–13828.
- Xu Y, Kusuyama J, Osana S et al.** 2023. Lactate promotes neuronal differentiation of SH-SY5Y cells by lactate-responsive gene sets through NDRG3-dependent and -independent manners. *The Journal of biological chemistry* **299**.
- Young RM, Wang SJ, Gordan JD, Ji X, Liebhaber SA, Simon MC.** 2008. Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site-independent mechanism. *The Journal of biological chemistry* **283**.
- Zha X, Hu Z, Ji S et al.** 2015. NFκB up-regulation of glucose transporter 3 is essential for hyperactive mammalian target of rapamycin-induced aerobic glycolysis and tumor growth. *Cancer Letters* **359**, 97–106.
- Zhao F-Q, Keating AF.** 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Current genomics* **8**, 113–128.
- Zheng L, Zhang W, Zhou Y, Li F, Wei H, Peng J.** 2016. Recent Advances in Understanding Amino Acid Sensing Mechanisms that Regulate mTORC1. *International journal of molecular sciences* **17**.

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Blutglucoseregulation bei Hyper- und Hypoglykämie. ....	7
Abbildung 2: Insulinvermittelte Prozesse einer Zelle bei Hyperglykämie. ....	10
Abbildung 3: Schematischer Überblick der Verschaltung von AMPK, mTOR und HIF1.....	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Verteilung von Glucose- und Lactattransportern im Säugetiergehirn (Abbildung nach Simpson <i>et al.</i> , 2007). ....	19
Abbildung 5: Hypothetischer Translokationsmechanismus von GLUT3 nach Ferreira <i>et al.</i> , 2011.....	21
Abbildung 6: Hypothetischer Translokationsmechanismus von GLUT3 nach Weisova <i>et al.</i> , 2009.....	22
Abbildung 7: Versuchsschema Trypanblaufärbung.....	34
Abbildung 8: Beispiel einer Trypanblau Färbung von SH-SY5Y Zellen.....	34
Abbildung 9: Aufbau des Durchflusssystems für Calcium Imaging.....	36
Abbildung 10: Verwendete Silikonkammer für das Durchflusssystem.....	37
Abbildung 11: Zeitschema des Calcium Imagings Versuchsablauf.....	38
Abbildung 12: Grundeinstellungen der <i>Find Foci</i> Funktion bei <i>ImageJ</i> zur Ermittlung der ROIs. ....	39
Abbildung 13: Berechnung der relativen Signalstärke. ....	40
Abbildung 14: Eichgerade Histon 3+Histon 4 Färbung für ELISA.....	44
Abbildung 15: Eichgeraden für Glucose- und Lactattransporter. ....	44
Abbildung 16: Silikonwells auf einem Objektträger.....	48
Abbildung 17: Exemplarische Ermittlung der Grauwerte einer immunzytochemischen Färbung.....	50
Abbildung 18: Mikroskopische Aufnahmen von SH-SY5Y Zellen nach drei und 24 stündiger Behandlung mit Mangelmedien.. ....	54
Abbildung 19: Durchschnittliche bewachsene Fläche normiert auf die Gesamtfläche (Area Pixelanzahl/ Gesamtpixel Bild) nach Mangelbehandlung. ....	55
Abbildung 20: dCt Werte und Proteinmenge von GLUT1 nach 24 Stunden Mangelbehandlungen.. ....	60
Abbildung 21: dCt Werte und Proteinmenge von MCT1 nach 24 Stunden Mangelbehandlungen. ....	61

---

Abbildung 22: Arbeitshypothese des Zusammenhangs zwischen Glutamin, Glucose, mTORC1 und Proteingehalt.....	65
Abbildung 23: Relativer Gehalt an GLUT1, MCT1 und GLUT3 nach 24 h Behandlung mit AZD 8055 (A) oder Rapamycin (R)..	67
Abbildung 24: Schema der vermuteten Beteiligung von HIF1 $\alpha$ an der Regulation von GLUT1. ....	69
Abbildung 25: Relative Proteinmenge von HIF1 $\alpha$ nach drei stündigem Behandlungszeitraum. ....	71
Abbildung 26: Relative Proteinmenge von HIF1 $\alpha$ nach 24 stündigem Behandlungszeitraum. ....	73
Abbildung 27: Arbeitshypothese zu den mTORC1 vermittelten Translationsmechanismen. .	76
Abbildung 28: Relative Proteinmenge von GLUT1 nach drei stündigem Behandlungszeitraum. ....	78
Abbildung 29: Relative Proteinmenge von GLUT1 nach 24 stündigem Behandlungszeitraum. ....	80
Abbildung 30: Relative Proteinmenge von GLUT3 nach drei stündigem Behandlungszeitraum. ....	82
Abbildung 31: Relative Proteinmenge von GLUT3 nach 24 stündigem Behandlungszeitraum. ....	84
Abbildung 32: Relative Proteinmenge von MCT1 nach drei stündigem Behandlungszeitraum. ....	86
Abbildung 33: Relative Proteinmenge von MCT1 nach 24 stündigem Behandlungszeitraum. ....	88
Abbildung 34: Schematische Darstellung eines Biotinylierungsassay. ....	91
Abbildung 35: Relativer Anteil membranständiger Transporter nach 24 stündigen Mangelbehandlungen .....	93
Abbildung 36: Hypothese der glutaminabhängigen GLUT1 mRNA Regulation.....	98
Abbildung 37: Hypothese der glucoseabhängigen HIF1 $\alpha$ Regulation.....	100
Abbildung 38: Hypothese der Regulation von HIF1 $\alpha$ Proteingehalt und GLUT1 mRNA Gehalt bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel.....	101
Abbildung 39: Schematische Darstellung der Hypothese der glutaminabhägigen Regulation von GLUT1, GLUT3 und MCT1 auf Proteinebene.....	105
Abbildung 40: Schematische Darstellung der Hypothese der glucoseabhängigen Regulation von GLUT1 und GLUT3 auf Proteinebene.....	107

---

Abbildung 41: Schematische Darstellung der Hypothese der glucoseabhängigen Regulation von MCT1 auf mRNA und Proteinebene.....	110
Abbildung 42: Schematische Darstellung der Hypothese der Regulation von GLUT1 und GLUT3 auf Proteinebene bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel.....	112
Abbildung 43: Schematische Darstellung der Hypothese der von MCT1 auf mRNA und Proteinebene bei kombiniertem Glutamin- und Glucosemangel. ....	114
Abbildung 44: Kumulative Verteilung der bereits reagierten Zellen in Bezug auf die Signalstärke. ....	209
Abbildung 45: Immunhistochemische Färbung von GLUT1. ....	210
Abbildung 46: Immunhistochemische Färbung von GLUT3. ....	211
Abbildung 47: Immunhistochemische Färbung von MCT1. ....	212
Abbildung 48: Immunhistochemische Färbung von HIF1 $\alpha$ .....	213

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
ACh	Acetylcholin
AKT	Proteinkinase B
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP - activated protein kinase
ANOVA	analysis of variance
ATP	Adenosintriophosphat
AZD8055	5-[2,4-bis[(3S)-3-methyl-4-morpholinyl]pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-yl]-2-methoxy-benzenemethanol
BSA	Bovines Serum Albumin
CD147	Basigin
cDNA	complementary DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eIF4	eukaryotic translation initiation factor 4E
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
GLUT	facilitated diffusion glucose transporter
gp70	Embigin
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	hypoxia inducible factor
HMIT	H <sup>+</sup> / myo-inositol co-transporter
IRES	internal ribosomal entry sequence
IRS	insulin receptor substrate
KCl	Kaliumchlorid

---

MCT	monocarboxylate transporter
mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	RAPTOR
mTORC2	RICTOR
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEAA	non essential amino acids
NMDA	N-methyl-D-aspartate (Glutamat)
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PGC1 $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
p-NPP	para-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat
ROI	region of interest
RxN	reaction
S6K	ribosomal protein S6 kinase
SGLT	sodium - linked glucose transporter

## 7.4 Ergänzende Daten

### 7.4.1 Deskriptive Statistik

#### Deskriptive Statistik zu den Eichgraden der verwendeten Antikörper

**Tabelle 10: Deskriptive Statistik zur Abbildung 14 für die Eichgrade der Histon 3 und Histon 4 Messung im ELISA.** Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird.

Zellzahl [•10 <sup>3</sup> ]	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert	0,18	0,37	0,65	0,70	0,86	0,97	1,07	1,16	1,29	1,40	1,57	1,79
Standard- abweichung	0,01	0,02	0,05	0,03	0,07	0,07	0,08	0,08	0,09	0,04	0,06	0,09

**Tabelle 11: Deskriptive Statistik zur Abbildung 15 A und Abbildung 15 B für die Eichgrade der GLUT1 und MCT1 Messung im ELISA.** Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird.

	GLUT1				MCT1			
Zellzahl [•10 <sup>3</sup> ]	10	20	30	40	10	20	30	40
n	4	4	4	4	4	4	4	4
Mittelwert	0,28	0,66	1,00	1,57	0,45	0,81	1,32	1,56
Standard- abweichung	0,02	0,12	0,14	0,26	0,02	0,08	0,02	0,12

---

Deskriptive Statistik zur Durchschnittlich bewachsenen Fläche in Kapitel 3.1

**Tabelle 12: Deskriptive Statistik zur Abbildung 19 A mittels zweiseitiger ANOVA.** Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur erfolgt.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-	+	+
	Glutamin	+	-	+	-	+	-
	Pyruvat	+	+	+	+	-	-
	n	18	21	20	22	19	25
	Mittelwert	0,2914	0,3326	0,2483	0,2467	0,3529	0,3090
	Standardabweichung	0,0621	0,0743	0,0306	0,0405	0,0656	0,0436
	Varianz	0,0039	0,0055	0,0009	0,0016	0,0043	0,0019

**Tabelle 13: Statistische Auswertung zur Abbildung 19 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	+	+
		Glutamin	+	+	+	-	-
		Pyruvat	+	-	-	+	+
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-
		Glutamin	+	+	+	+	+
		Pyruvat	+	+	+	+	+
	Unterschied der Mittelwerte		-0,0431	0,0615	0,1046	0,0412	0,0843
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0177	0,0179	0,0174	0,0175	0,0170
	t-Wert		-2,4386	3,4407	6,0057	2,3608	4,9628
	Wahrscheinlichkeit		0,2433	0,0120	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,2980	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		nein	nein	ja	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,1057	-0,0020	0,0428	-0,0208	0,0240
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,0196	0,1249	0,1663	0,1032	0,1445

Fortsetzung Tabelle 13

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	+	-	-	-	-
		Glutamin	-	-	-	-	-
		Pyruvat	+	+	+	+	+
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	+
		Glutamin	+	+	+	+	-
		Pyruvat	-	+	+	-	+
	Unterschied der Mittelwerte		-0,0203	-0,0447	-0,0016	-0,1062	-0,0859
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0172	0,0173	0,0168	0,0170	0,0166
	t-Wert		-1,1794	-2,5874	-0,0973	-6,2393	-5,1811
	Wahrscheinlichkeit		1,0000	0,1631	1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		nein	nein	nein	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,0814	-0,1060	-0,0612	-0,1666	-0,1447
Obere Konfidenzintervallgrenze		0,0408	0,0166	0,0580	-0,0458	-0,0271	

Fortsetzung Tabelle 13

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	+	+	+	+	+
		Glutamin	-	-	-	-	-
		Pyruvat	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	-	+	+	-
		Glutamin	+	+	+	-	-
		Pyruvat	+	+	-	+	+
	Unterschied der Mittelwerte		0,0177	0,0607	-0,0438	-0,0235	0,0624
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0168	0,0163	0,0165	0,0161	0,0159
	Wahrscheinlichkeit		1,0000	0,0045	0,1374	1,0000	0,0022
	Alpha		0,0083	0,0083	0,0083	0,0083	0,0083
	Signifikanz		nein	ja	nein	nein	ja
Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,0420	0,0029	-0,1025	-0,0806	0,0060	
Obere Konfidenzintervallgrenze		0,0773	0,1186	0,0149	0,0336	0,1188	

**Tabelle 14: Deskriptive Statistik zur Abbildung 19 B mittels zweiseitiger ANOVA.** Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur erfolgt.

<b>zweiseitige ANOVA</b>	Glucose	+	+	-	-	+	+
	Glutamin	+	-	+	-	+	-
	Pyruvat	+	+	+	+	-	-
	n	21	22	20	19	21	22
	Mittelwert	0,5965	0,3453	0,6309	0,6194	0,3956	0,5300
	Standardabweichung	0,0786	0,0606	0,0712	0,1368	0,0586	0,1124
	Varianz	0,0062	0,0037	0,0051	0,0187	0,0034	0,0126

**Tabelle 15: Statistische Auswertung zur Abbildung 19 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	+	+
		Glutamin	+	+	+	-	-
		Pyruvat	+	-	-	+	+
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-
		Glutamin	+	+	+	+	+
		Pyruvat	+	+	+	+	+
	Unterschied der Mittelwerte		-0,2009	0,0230	0,2239	0,0344	0,2353
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0278	0,0286	0,0286	0,0282	0,0282
	t-Wert		-7,2188	0,8038	7,8398	1,2197	8,3499
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$	1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	nein	ja	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,2997	-0,0784	0,1225	-0,0657	0,1353
	Obere Konfidenzintervallgrenze		-0,1021	0,1243	0,3252	0,1344	0,3353

Fortsetzung Tabelle 15

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	+	-	-	-	-
		Glutamin	-	-	-	-	-
		Pyruvat	+	+	+	+	+
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	+
		Glutamin	+	+	+	+	-
		Pyruvat	-	+	+	-	+
	Unterschied der Mittelwerte		0,0114	-0,2512	-0,0503	-0,2741	-0,2855
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0289	0,0275	0,0275	0,0282	0,0279
	t-Wert		0,3952	-9,1292	-1,8270	-9,7055	-10,2481
	Wahrscheinlichkeit		1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$	1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		nein	ja	nein	ja	ja
Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,0911	-0,3488	-0,1479	-0,3744	-0,3844	
Obere Konfidenzintervallgrenze		0,1140	-0,1535	0,0474	-0,1739	-0,1866	

Fortsetzung Tabelle 15

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	+	+	+	+	+
		Glutamin	-	-	-	-	-
		Pyruvat	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	-	+	+	-
		Glutamin	+	+	+	-	-
		Pyruvat	+	+	-	+	+
	Unterschied der Mittelwerte		-0,0665	0,1344	-0,0894	-0,1008	0,1847
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0275	0,0275	0,0282	0,0279	0,0272
	t-Wert		-2,4160	4,8863	-3,1660	-3,6191	6,7927
	Wahrscheinlichkeit		0,2582	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0295	0,0065	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		nein	ja	nein	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,1641	0,0368	-0,1897	-0,1997	0,0882
Obere Konfidenzintervallgrenze		0,0312	0,2321	0,0108	-0,0019	0,2812	

---

Deskriptive Statistik zur quantitativen Real Time PCR und zum ELISA in Kapitel 3.2
**Tabelle 16: Deskriptive Statistik der quantitativen Real Time PCR von GLUT1 zur Abbildung 20 A.**

Basierend auf den experimentell Ermittelten dCt Werten sind jene Werte dargestellt, anhand derer die Abbildung erstellt wird.

Glutamin	+	-	+	-	+	-
Glucose	+	+	-	-	+	+
Pyruvat	+	+	+	+	-	-
n	12	12	12	12	12	11
Minimaler Wert	-2,657	-0,425	-2,552	0,062	-3,792	-0,720
1. Quantil	-2,448	-0,176	-1,933	0,400	-3,478	-0,503
Median	-2,127	-0,007	-1,617	0,801	-2,222	-0,400
3. Quantil	-0,203	0,092	-0,158	1,066	-0,632	-0,243
Maximaler Wert	0,137	1,035	0,492	1,345	0,292	-0,080

**Tabelle 17: Deskriptive Statistik der quantitativen Real Time PCR von MCT1 zur Abbildung 21 A.**

Basierend auf den experimentell Ermittelten dCt Werten sind jene Werte dargestellt, anhand derer die Abbildung erstellt wird.

Glutamin	+	-	+	-	+	-
Glucose	+	+	-	-	+	+
Pyruvat	+	+	+	+	-	-
n	12	12	12	12	12	11
Minimaler Wert	-2,151	-1,156	-1,496	-0,631	-1,491	-1,496
1. Quantil	-1,356	-0,677	-0,825	-0,216	-1,030	-0,825
Median	-0,535	-0,211	0,138	0,258	-0,795	0,138
3. Quantil	0,480	0,018	0,239	0,855	-0,761	0,239
Maximaler Wert	0,535	0,550	1,110	1,280	-0,585	1,110

**Tabelle 18: Deskriptive Statistik der quantitativen Real Time PCR von GLUT3.** Basierend auf den experimentell Ermittelten dCt Werten sind jene Werte dargestellt, welche die Erstellung einer Abbildung erlauben.

Glutamin	+	-	+	-	+	-
Glucose	+	+	-	-	+	+
Pyruvat	+	+	+	+	-	-
n	12	12	12	12	12	11
Minimaler Wert	-2,580	-2,220	-2,745	-0,631	-1,491	-1,466
1. Quantil	-2,191	-1,585	-1,945	-0,216	-1,030	-1,151
Median	-1,715	-1,348	-1,619	0,258	-0,795	-0,885
3. Quantil	-1,442	-0,789	-1,273	0,855	-0,761	0,050
Maximaler Wert	-1,120	-0,498	-0,943	1,280	-0,585	0,490

**Tabelle 19: Deskriptive Statistik der quantitativen Real Time PCR von GLUT4.** Basierend auf den experimentell Ermittelten dCt Werten sind jene Werte dargestellt, welche die Erstellung einer Abbildung erlauben.

Glutamin	+	-	+	-	+	-
Glucose	+	+	-	-	+	+
Pyruvat	+	+	+	+	-	-
n	12	12	12	12	12	11
Minimaler Wert	-1,817	-2,197	-2,627	-1,997	-3,372	-2,947
1. Quantil	-1,671	-2,070	-2,492	-1,879	-2,836	-2,487
Median	-1,567	-1,805	-2,384	-1,605	-1,614	-2,032
3. Quantil	-1,351	-1,620	-1,539	-1,352	-1,219	-1,616
Maximaler Wert	-1,327	-0,921	-1,267	-1,222	-0,386	-1,286

**Tabelle 20: Kruskal-Wallis Rangsummentest zur Hypothese eines allgemeinen Glutamineffektes.** Die Rangsummen beinhalten Kontroll-, Glucose- und Pyruvatmangelmedium mit der jeweiligen Glutaminverfügbarkeit. Der Test erfolgt zu dem adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .

Kruskal-Wallis Rangsummen- test	Glutamin	GLUT1	GLUT3	GLUT4	MCT1
	+	1052,5	1115,5	1336	1148
	-	1503,5	1440,5	1220	1408
	p - Wert	0,005	0,038	0,645	0,089

**Tabelle 21: Kruskal-Wallis Rangsummentest zur Hypothese eines Glutamineffektes in Glucose- und Pyruvatanwesenheit.** Die Rangsummen beinhalten Medien mit Glucose und Pyruvat mit der jeweiligen Glutaminverfügbarkeit. Der Test erfolgt zu dem adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .

Kruskal-Wallis Rangsummen- test	Glutamin	GLUT1	GLUT3	GLUT4	MCT1
	+	132,5	112	190	138
	-	167,5	188	110	162
	p - Wert	0,312	0,028	0,021	0,488

**Tabelle 22: Kruskal-Wallis Rangsummentest zur Hypothese eines Glutamineffektes bei Glucosemangel.** Die Rangsummen beinhalten die Glucosemangelmedien mit der jeweiligen Glutaminverfügbarkeit. Der Test erfolgt zu dem adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .

Kruskal-Wallis Rangsummen- test	Glutamin	GLUT1	GLUT3	GLUT4	MCT1
	+	106	131	110	127
	-	194	169	190	173
	p - Wert	0,011	0,272	0,021	0,184

**Tabelle 23: Kruskal-Wallis Rangsummentest zur Hypothese eines Glutamineffektes bei Pyruvatmangel.** Die Rangsummen beinhalten die Pyruvatmangelmedien mit der jeweiligen Glutaminverfügbarkeit. Der Test erfolgt zu dem adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .

Kruskal-Wallis Rangsummen- test	Glutamin	GLUT1	GLUT3	GLUT4	MCT1
	+	118	138	158	136
	-	158	138	118	140
	p - Wert	0,110	0,712	0,389	0,622

**Tabelle 24: Kruskal-Wallis Rangsummentest zur Hypothese eines allgemeinen Glucose- oder Pyruvateffektes.** Die Rangsummen beinhalten Medien mit und ohne Glutamin mit der jeweiligen Glucose- und Pyruvatverfügbarkeit. Der Test erfolgt zu dem adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .

Kruskal-Wallis Rangsummentest	Glucose	Pyruvat	GLUT1	GLUT3	GLUT4	MCT1
	+	+	848	882,5	957,5	870,5
	-	+	1073	914,5	845	1150
	+	-	635	759	753,5	535,5
p - Wert			0,017	0,681	0,483	0,001

**Tabelle 25: Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 20 B mittels zweiseitiger ANOVA.** Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur erfolgt.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-	+	+
	Glutamin	+	-	+	-	+	-
	Pyruvat	+	+	+	+	-	-
	n	36	36	36	36	36	36
	Mittelwert	1,8594	2,8400	1,9100	1,3355	2,4171	1,6543
	Standardabweichung	0,2645	0,3935	0,2496	0,2845	0,5982	0,1874
	Varianz	0,0700	0,1549	0,0623	0,0810	0,3578	0,0351

**Tabelle 26: Statistische Auswertung zur Abbildung 20 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose	Pyruvat
	Bedingung A	-	-	-
	Bedingung B	+	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,4008	1,0311	0,1847
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0485	0,0594	0,0594
	t-Wert	-8,2705	17,3706	3,1119
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0064
	Signifikanz	ja	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,5300	0,8513	0,0050
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,2717	1,2109	0,3645

**Tabelle 27: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 20 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	+	+
		Glutamin	+	+	+	-	-
		Pyruvat	+	-	-	+	+
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-
		Glutamin	+	+	+	+	+
		Pyruvat	+	+	+	+	+
	Unterschied der Mittelwerte		0,9807	0,0507	-0,9300	-0,5239	-1,5045
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0840	0,0840	0,0840	0,0840	0,0840
	t-Wert		11,6818	0,6035	-11,0784	-6,2403	-17,9221
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,6862	-0,2438	-1,2244	-0,8183	-1,7989
	Obere Konfidenzintervallgrenze		1,2751	0,3451	-0,6356	-0,2294	-1,2101

Fortsetzung Tabelle 27

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	+	-	-	-	-
		Glutamin	-	-	-	-	-
		Pyruvat	+	+	+	+	+
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	+
		Glutamin	+	+	+	+	-
		Pyruvat	-	+	+	-	+
	Unterschied der Mittelwerte		-0,5745	0,5577	-0,4230	0,5070	1,0816
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0840	0,0840	0,0840	0,0840	0,0840
	t-Wert		-6,8438	6,6435	-5,0383	6,0401	12,8838
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,8689	0,2633	-0,7174	0,2126	0,7871
	Obere Konfidenzintervallgrenze		-0,2801	0,8521	-0,1285	0,8015	1,3760

Fortsetzung Tabelle 27

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	+	+	+	+	+
		Glutamin	-	-	-	-	-
		Pyruvat	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	-	+	+	-
		Glutamin	+	+	+	-	-
		Pyruvat	+	+	-	+	+
	Unterschied der Mittelwerte		-0,2051	-1,1857	-0,2557	0,3188	-0,7628
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0840	0,0840	0,0840	0,0840	0,0840
	t-Wert		-2,4429	-14,1247	-3,0463	3,7974	-9,0864
	Wahrscheinlichkeit		0,2309	0,0000	0,0392	0,0029	0,0000
	Signifikanz		nein	ja	nein	ja	ja
Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,4995	-1,4802	-0,5502	0,0243	-1,0572	
Obere Konfidenzintervallgrenze		0,0894	-0,8913	0,0387	0,6132	-0,4683	

**Tabelle 28: Deskriptive Statistik des ELISA von MCT1 zur Abbildung 21 B mittels zweiseitiger ANOVA.** Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur erfolgt.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-	+	+
	Glutamin	+	-	+	-	+	-
	Pyruvat	+	+	+	+	-	-
	n	33	33	36	36	36	36
	Mittelwert	1,7816	1,6843	2,0898	2,4406	1,8756	2,0891
	Standardabweichung	0,3247	0,2804	0,3148	0,7613	0,2462	0,3753
	Varianz	0,1054	0,0786	0,0991	0,5796	0,0606	0,1409

**Tabelle 29: Statistische Auswertung zur Abbildung 21 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose	Pyruvat
	Bedingung A	-	-	-
	Bedingung B	+	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	0,1935	0,4835	0,2008
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0592	0,0731	0,0731
	t-Wert	3,2676	6,6137	2,7458
	Wahrscheinlichkeit	0,0013	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0197
	Signifikanz	ja	ja	nein
	Untere Konfidenzintervallgrenze	0,0356	0,2621	-0,0207
	Obere Konfidenzintervallgrenze	0,3513	0,7050	0,4222

**Tabelle 30: Statistische Auswertung des ELISA von MCT1 zur Abbildung 21 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	+	+
		Glutamin	+	+	+	-	-
		Pyruvat	+	-	-	+	+
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-
		Glutamin	+	+	+	+	+
		Pyruvat	+	+	+	+	+
	Unterschied der Mittelwerte		0,3081	0,0940	-0,2142	0,0000	-0,3081
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1034	0,1034	0,1011	0,1056	0,1034
	t-Wert		2,9802	0,9090	-2,1177	0,0000	-2,9802
	Wahrscheinlichkeit		0,0485	1,0000	0,5311	1,0000	0,0485
	Signifikanz		nein	nein	nein	nein	nein
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,0547	-0,2688	-0,5690	-0,3706	-0,6710
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,67096	0,45681	0,14069	0,37062	0,05468

Fortsetzung Tabelle 30

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	+	-	-	-	-
		Glutamin	-	-	-	-	-
		Pyruvat	+	+	+	+	+
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	+
		Glutamin	+	+	+	+	-
		Pyruvat	-	+	+	-	+
	Unterschied der Mittelwerte		-0,0940	0,6589	0,3508	0,5650	0,6589
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1034	0,1034	0,1011	0,1011	0,1034
	t-Wert		-0,9090	6,3729	3,4690	5,5867	6,3729
	Wahrscheinlichkeit		1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0096	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		nein	ja	nein	ja	ja
Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,4568	0,2961	-0,0041	0,2101	0,2961	
Obere Konfidenzintervallgrenze		0,26883	1,02175	0,70564	0,91979	1,02175	

Fortsetzung Tabelle 30

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	+	+	+	+	+
		Glutamin	-	-	-	-	-
		Pyruvat	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	-	+	+	-
		Glutamin	+	+	+	-	-
		Pyruvat	+	+	-	+	+
	Unterschied der Mittelwerte		0,3075	-0,0006	0,2135	0,3075	-0,3514
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1034	0,1011	0,1011	0,1034	0,1011
	t-Wert		2,9741	-0,0063	2,1115	2,9741	-3,4752
	Wahrscheinlichkeit		0,0494	1,0000	0,5392	0,0494	0,0094
	Signifikanz		nein	nein	nein	nein	nein
Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,0553	-0,3555	-0,1413	-0,0553	-0,7063	
Obere Konfidenzintervallgrenze		0,67033	0,35421	0,56836	0,67033	0,00342	

### Deskriptive Statistik zu den ELISA Experimenten für HIF1 $\alpha$ aus Kapitel 3.3.2

**Tabelle 31: Deskriptive Statistik des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 25 A mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 3 stündigen Behandlungszeitraum keine Inhibitorgabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	36	36	36	36
	Mittelwert	4,3421	3,2185	4,2309	3,6858
	Standardabweichung	0,8270	0,4975	0,4304	0,3462
	Varianz	0,6839	0,2475	0,1853	0,1199

**Tabelle 32: Statistische Auswertung zur Abbildung 25 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,8344	0,1780
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0927	0,0927
	t-Wert	-9,0037	1,9207
	Wahrscheinlichkeit	$1,42 \cdot 10^{-15}$	0,0568
	Signifikanz	ja	nein
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-1,0825	-0,0702
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,5862	0,4261

**Tabelle 33: Statistische Auswertung des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 25 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		-0,1113	-1,1236	-1,0123	-0,6564	-0,5451	0,4672
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1311	0,1311	0,1311	0,1311	0,1311	0,1311
	t-Wert		-0,8489	-8,5737	-7,7247	-5,0085	-4,1595	3,5652
	Wahrscheinlichkeit		1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0003	0,0030
	Signifikanz		nein	ja	ja	ja	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,5389	-1,5513	-1,4400	-1,0840	-0,9728	0,0396
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,3164	-0,6959	-0,5847	-0,2287	-0,1174	0,8949

**Tabelle 34: Deskriptive Statistik des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 25 B mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 3 stündigen Behandlungszeitraum eine Rapamycingabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	4,5081	3,2531	4,0173	4,0673
	Standardabweichung	0,6412	0,3820	0,3141	1,2763
	Varianz	0,1511	0,0900	0,0740	0,3008

**Tabelle 35: Statistische Auswertung zur Abbildung 25 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,6025	0,1617
	Standardfehler des Mittelwerts	0,1781	0,1781
	t-Wert	-3,3824	0,9076
	Wahrscheinlichkeit	0,0012	0,3673
	Signifikanz	ja	nein
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-1,0869	-0,3227
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,1182	0,6460

**Tabelle 36: Statistische Auswertung des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 25 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		-0,4908	-1,2550	-0,7642	-0,4408	0,0500	0,8142
	Standardfehler des Mittelwerts		0,2519	0,2519	0,2519	0,2519	0,2519	0,2519
	t-Wert		-1,9483	-4,9818	-3,0335	-1,7499	0,1984	3,2319
	Wahrscheinlichkeit		0,3331	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0205	0,5079	1,0000	0,0114
	Signifikanz		nein	ja	nein	nein	nein	nein
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-1,3310	-2,0952	-1,6044	-1,2810	-0,7902	-0,0260
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,3494	-0,4148	0,0760	0,3994	0,8902	1,6544

**Tabelle 37: Deskriptive Statistik des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 25 C mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 3 stündigen Behandlungszeitraum eine AZD8055 Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	3,8795	2,9704	4,4358	3,6460
	Standardabweichung	0,6043	0,2500	0,4983	0,3740
	Varianz	0,3652	0,0625	0,2483	0,1399

**Tabelle 38: Statistische Auswertung zur Abbildung 25 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,8494	0,6159
	Standardfehler des Mittelwerts	0,1065	0,1065
	t-Wert	-7,9797	5,7862
	Wahrscheinlichkeit	$2,39 \cdot 10^{-11}$	$2,00 \cdot 10^{-7}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-1,1389	0,3265
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,5600	0,9054

**Tabelle 39: Statistische Auswertung des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 25 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,5563	-0,9091	-1,4653	-0,2335	-0,7898	0,6756
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1505	0,1505	0,1505	0,1505	0,1505	0,1505
	t-Wert		3,6952	-6,0387	-9,7339	-1,5510	-5,2462	4,4877
	Wahrscheinlichkeit		0,0026	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,7533	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	nein	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,0542	-1,4111	-1,9674	-0,7356	-1,2919	0,1735
	Obere Konfidenzintervallgrenze		1,0584	-0,4070	-0,9633	0,2686	-0,2877	1,1777

**Tabelle 40: Deskriptive Statistik des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 26 A mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum keine Inhibitorgabe vor.

<b>zweiseitige ANOVA</b>	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	36	36	36	36
	Mittelwert	2,3304	1,4690	2,0550	2,2042
	Standardabweichung	0,5692	0,2332	0,3600	0,6545
	Varianz	0,3240	0,0544	0,1296	0,4284

**Tabelle 41: Statistische Auswertung zur Abbildung 26 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen</b>	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,3561	0,2299
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0806	0,0806
	t-Wert	-4,4162	2,8505
	Wahrscheinlichkeit	$1,994 \cdot 10^{-5}$	0,0050
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,5721	0,0139
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,1402	0,4458

**Tabelle 42: Statistische Auswertung des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 26 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		-0,2755	-0,8615	-0,5860	-0,1263	0,1492	0,7352
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1140	0,1140	0,1140	0,1140	0,1140	0,1140
	t-Wert		-2,4155	-7,5539	-5,1383	-1,1072	1,3084	6,4467
	Wahrscheinlichkeit		0,1020	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	1,0000	1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		nein	ja	ja	nein	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,6476	-1,2336	-0,9582	-0,4984	-0,2230	0,3630
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,0967	-0,4893	-0,2138	0,2459	0,5214	1,1074

**Tabelle 43: Deskriptive Statistik des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 26 B mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum eine Rapamycin Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	1,8405	1,3107	1,7017	1,6328
	Standardabweichung	0,3191	0,0947	0,3606	0,2461
	Varianz	0,1019	0,0090	0,1300	0,0606

**Tabelle 44: Statistische Auswertung zur Abbildung 26 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,2994	0,0916
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0647	0,0647
	t-Wert	-4,6269	1,4156
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,1615
	Signifikanz	ja	nein
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,4753	-0,0843
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,1234	0,2675

**Tabelle 45: Statistische Auswertung des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 26 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		-0,1389	-0,5298	-0,3910	-0,2078	-0,0689	0,3220
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0915	0,0915	0,0915	0,0915	0,0915	0,0915
	t-Wert		-1,5175	-5,7901	-4,2726	-2,2708	-0,7533	3,5194
	Wahrscheinlichkeit		0,8027	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0004	0,1580	1,0000	0,0047
	Signifikanz		nein	ja	ja	nein	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,4440	-0,8350	-0,6961	-0,5130	-0,3741	0,0169
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,1663	-0,2246	-0,0858	0,0974	0,2363	0,6272

**Tabelle 46: Deskriptive Statistik des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 26 C mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum AZD8055 Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	2,0805	1,2746	2,4424	2,3614
	Standardabweichung	0,4237	0,2543	0,3565	0,2367
	Varianz	0,1795	0,0647	0,1271	0,0560

**Tabelle 47: Statistische Auswertung zur Abbildung 26 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,4434	0,7244
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0770	0,0770
	t-Wert	-5,7562	9,4030
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,6529	0,5149
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,2340	0,9339

**Tabelle 48: Statistische Auswertung des ELISA von HIF1 $\alpha$  zur Abbildung 26 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,3619	-0,8059	-1,1678	0,2809	-0,0810	1,0868
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1090	0,1090	0,1090	0,1090	0,1090	0,1090
	t-Wert		3,3220	-7,3972	-10,719	2,5787	-0,7433	9,9759
	Wahrscheinlichkeit		0,0087	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0725	1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		nein	ja	ja	nein	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,0014	-1,1693	-1,5312	-0,0824	-0,4444	0,7235
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,7253	-0,4425	-0,8045	0,6443	0,2824	1,4502

### Deskriptive Statistik zu den ELISA Experimenten für GLUT1 aus Kapitel 3.3.3

**Tabelle 49: Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 28 A mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem dreistündigen Behandlungszeitraum keine Inhibitorgabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	36	36	36	36
	Mittelwert	3,8389	3,3080	4,5722	4,2565
	Standardabweichung	0,3952	0,1844	0,3892	0,3946
	Varianz	0,1561	0,0340	0,1515	0,1557

**Tabelle 50: Statistische Auswertung zur Abbildung 28 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,4234	0,8409
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0588	0,0588
	t-Wert	-7,2037	14,3087
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,5807	0,6836
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,2660	0,9983

**Tabelle 51: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 28 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,7333	-0,5310	-1,2643	0,4176	-0,3158	0,9485
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0831	0,0831	0,0831	0,0831	0,0831	0,0831
	t-Wert		8,8232	-6,3883	-15,211	5,0240	-3,7992	11,412
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0013	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	ja	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,4621	-0,8022	-1,5355	0,1463	-0,5870	0,6773
	Obere Konfidenzintervallgrenze		1,0046	-0,2597	-0,9931	0,6888	-0,0445	1,2198

**Tabelle 52: Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 28 B mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem dreistündigen Behandlungszeitraum eine Rapamycingabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	3,6955	3,0819	4,3009	4,0399
	Standardabweichung	0,4318	0,2908	0,6526	0,4145
	Varianz	0,1865	0,0845	0,4259	0,1718

**Tabelle 53: Statistische Auswertung zur Abbildung 28 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,4373	0,7817
	Standardfehler des Mittelwerts	0,1099	0,1099
	t-Wert	-3,9808	7,1165
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,7360	0,4830
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,1386	1,0804

**Tabelle 54: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 28 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,6054	-0,6136	-1,2190	0,3444	-0,2610	0,9580
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1554	0,1554	0,1554	0,1554	0,1554	0,1554
	t-Wert		3,8971	-3,9499	-7,8470	2,2173	-1,6799	6,1672
	Wahrscheinlichkeit		0,0014	0,0011	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,1797	0,5855	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	nein	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,0873	-1,1317	-1,7371	-0,1737	-0,7791	0,4399
	Obere Konfidenzintervallgrenze		1,1235	-0,0955	-0,7009	0,8626	0,2572	1,4762

**Tabelle 55 Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 28 C mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem dreistündigen Behandlungszeitraum eine AZD8055 Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	3,5764	3,2105	4,0112	3,9448
	Standardabweichung	0,2246	0,2545	0,3828	0,4915
	Varianz	0,0504	0,0648	0,1465	0,2416

**Tabelle 56: Statistische Auswertung zur Abbildung 28 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,2162	0,5846
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0836	0,0836
	t-Wert	-2,5854	6,9919
	Wahrscheinlichkeit	0,0119	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,4435	0,3572
	Obere Konfidenzintervallgrenze	0,0112	0,8119

**Tabelle 57: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 28 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,4348	-0,3659	-0,8007	0,3684	-0,0664	0,7343
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1182	0,1182	0,1182	0,1182	0,1182	0,1182
	t-Wert		3,6775	-3,0946	-6,7721	3,1159	-0,5616	6,2105
	Wahrscheinlichkeit		0,0028	0,0172	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0161	1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	nein	ja	nein	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,0405	-0,7603	-1,1951	-0,0259	-0,4608	0,3400
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,8292	0,0285	-0,4064	0,7628	0,3280	1,1287

**Tabelle 58: Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 29 A mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum keine Inhibitorgabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	36	36	36	36
	Mittelwert	1,9244	1,4501	2,3260	2,3509
	Standardabweichung	0,3169	0,1679	0,1637	0,3767
	Varianz	0,1004	0,0282	0,0268	0,1419

**Tabelle 59: Statistische Auswertung zur Abbildung 29 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,2247	0,6512
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0454	0,0454
	t-Wert	-4,9445	14,3316
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,3463	0,5295
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,1030	0,7728

**Tabelle 60: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 29 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,4016	-0,4742	-0,8758	0,4265	0,0249	0,9007
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0643	0,0643	0,0643	0,0643	0,0643	0,0643
	t-Wert		6,2499	-7,3803	-13,630	6,6377	0,3878	14,018
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	ja	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,1919	-0,6839	-1,0855	0,2168	-0,1848	0,6911
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,6113	-0,2645	-0,6661	0,6362	0,2346	1,1104

**Tabelle 61: Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 29 B mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum eine Rapamycingabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	1,7444	1,3164	2,3224	2,0563
	Standardabweichung	0,2918	0,1352	0,1391	0,1712
	Varianz	0,0852	0,0183	0,0194	0,0293

**Tabelle 62: Statistische Auswertung zur Abbildung 29 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,3471	0,6590
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0460	0,0460
	t-Wert	-7,5503	14,3369
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,4720	0,5340
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,2221	0,7840

**Tabelle 63: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 29 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,5781	-0,4280	-1,0061	0,3120	-0,2661	0,7399
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0650	0,0650	0,0650	0,0650	0,0650	0,0650
	t-Wert		8,8927	-6,5839	-15,476	4,7988	-4,0939	11,382
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	ja	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,3613	-0,6448	-1,2229	0,0951	-0,4829	0,5231
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,7949	-0,2112	-0,7893	0,5288	-0,0493	0,9567

**Tabelle 64 Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 29 C mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum eine AZD8055 Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	1,6542	1,4255	2,3909	2,6159
	Standardabweichung	0,1305	0,1254	0,1557	0,1888
	Varianz	0,0170	0,0157	0,0243	0,0356

**Tabelle 65: Statistische Auswertung zur Abbildung 29 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,0019	0,9636
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0359	0,0359
	t-Wert	-0,0523	26,8637
	Wahrscheinlichkeit	0,9584	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,0994	0,8660
	Obere Konfidenzintervallgrenze	0,0957	1,0611

**Tabelle 66: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT1 zur Abbildung 29 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,7367	-0,2288	-0,9654	0,9617	0,2250	1,1904
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0507	0,0507	0,0507	0,0507	0,0507	0,0507
	t-Wert		14,522	-4,5099	-19,032	18,958	4,4359	23,468
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0002	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0002	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	ja	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,5675	-0,3979	-1,1346	0,7925	0,0558	1,0213
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,9058	-0,0596	-0,7962	1,1309	0,3942	1,3596

### Deskriptive Statistik zu den ELISA Experimenten für GLUT3 aus Kapitel 3.3.3

**Tabelle 67: Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 30 A mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem dreistündigen Behandlungszeitraum keine Inhibitorgabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	36	36	36	36
	Mittelwert	4,1522	3,3875	4,5538	4,2703
	Standardabweichung	0,4520	0,1426	0,3996	0,3404
	Varianz	0,2043	0,0203	0,1597	0,1159

**Tabelle 68: Statistische Auswertung zur Abbildung 30 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,5241	0,6422
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0589	0,0589
	t-Wert	-8,8929	10,8971
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,6819	0,4844
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,3663	0,8001

**Tabelle 69: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 30 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,4017	-0,7647	-1,1664	0,1181	-0,2835	0,8828
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0834	0,0834	0,0834	0,0834	0,0834	0,0834
	t-Wert		4,8190	-9,1747	-13,993	1,4172	-3,4018	10,591
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,9519	0,0052	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	nein	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,1297	-1,0367	-1,4384	-0,1539	-0,5555	0,6108
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,6737	-0,4927	-0,8944	0,3901	-0,0115	1,1548

**Tabelle 70: Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 30 B mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem dreistündigen Behandlungszeitraum eine Rapamycingabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	4,0591	3,2688	4,4728	4,0096
	Standardabweichung	0,5715	0,1593	0,4532	0,3355
	Varianz	0,3266	0,0254	0,2054	0,1125

**Tabelle 71: Statistische Auswertung zur Abbildung 30 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,6267	0,5773
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0965	0,0965
	t-Wert	-6,4973	5,9844
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,8890	0,3150
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,3644	0,8395

**Tabelle 72: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 30 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,4137	-0,7903	-1,2040	-0,0495	-0,4632	0,7408
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1364	0,1364	0,1364	0,1364	0,1364	0,1364
	t-Wert		3,0327	-5,7932	-8,8259	-0,3627	-3,3953	5,4306
	Wahrscheinlichkeit		0,0206	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	1,0000	0,0069	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		nein	ja	ja	nein	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,0413	-1,2453	-1,6590	-0,5045	-0,9182	0,2858
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,8687	-0,3353	-0,7490	0,4055	-0,0082	1,1958

**Tabelle 73 Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 30 C mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem dreistündigen Behandlungszeitraum eine AZD8055 Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	3,7932	3,4583	4,2755	4,5195
	Standardabweichung	0,4494	0,2780	0,1754	0,2658
	Varianz	0,2019	0,0773	0,0308	0,0707

**Tabelle 74: Statistische Auswertung zur Abbildung 30 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,0454	0,7718
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0727	0,0727
	t-Wert	-0,6246	10,6141
	Wahrscheinlichkeit	0,5344	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,2431	0,5741
	Obere Konfidenzintervallgrenze	0,1523	0,9695

**Tabelle 75: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 30 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,4823	-0,3349	-0,8172	0,7263	0,2440	1,0612
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1028	0,1028	0,1028	0,1028	0,1028	0,1028
	t-Wert		4,6904	-3,2565	-7,9470	7,0637	2,3733	10,320
	Wahrscheinlichkeit		0,0001	0,0106	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,1228	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	nein	ja	ja	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,1394	-0,6778	-1,1601	0,3834	-0,0989	0,7183
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,8253	0,0081	-0,4742	1,0693	0,5870	1,4042

**Tabelle 76: Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 31 A mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum keine Inhibitorgabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	36	36	36	36
	Mittelwert	1,9433	1,9988	1,5255	2,0343
	Standardabweichung	0,3848	0,2417	0,1906	0,3552
	Varianz	0,1480	0,0584	0,0363	0,1262

**Tabelle 77: Statistische Auswertung zur Abbildung 31 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,1912	0,2822
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0506	0,0506
	t-Wert	-3,7764	5,5741
	Wahrscheinlichkeit	0,0002	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,3267	0,1466
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,0556	0,4177

**Tabelle 78: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 31 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,0556	-0,4178	-0,4733	0,0910	0,0355	0,5088
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0716	0,0716	0,0716	0,0716	0,0716	0,0716
	t-Wert		0,7760	-5,8358	-6,6118	1,2712	0,4952	7,1070
	Wahrscheinlichkeit		1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	1,0000	1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		nein	ja	ja	nein	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,1781	-0,6514	-0,7070	-0,1426	-0,1982	0,2752
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,2892	-0,1842	-0,2397	0,3246	0,2691	0,7424

**Tabelle 79: Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 31 B mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum eine Rapamycingabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	1,8481	1,3414	2,0527	1,7604
	Standardabweichung	0,3678	0,1203	0,2484	0,2678
	Varianz	0,1352	0,0145	0,0617	0,0717

**Tabelle 80: Statistische Auswertung zur Abbildung 31 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,3995	0,3118
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0627	0,0627
	t-Wert	-6,3708	4,9719
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,5701	0,1413
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,2290	0,4823

**Tabelle 81: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 31 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,2046	-0,5067	-0,7113	-0,0877	-0,2923	0,4190
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0887	0,0887	0,0887	0,0887	0,0887	0,0887
	t-Wert		2,3070	-5,7135	-8,0205	-0,9891	-3,2961	4,7244
	Wahrscheinlichkeit		0,1446	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	1,0000	0,0094	0,0001
	Signifikanz		nein	ja	ja	nein	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,0912	-0,8025	-1,0071	-0,3835	-0,5881	0,1232
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,5004	-0,2109	-0,4155	0,2081	0,0035	0,7148

**Tabelle 82: Deskriptive Statistik des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 31 C mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum eine AZD8055 Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	1,6808	1,5181	1,8647	2,1383
	Standardabweichung	0,1025	0,0996	0,0861	0,1336
	Varianz	0,0105	0,0099	0,0074	0,0179

**Tabelle 83: Statistische Auswertung zur Abbildung 31 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	0,0555	0,4020
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0252	0,0252
	t-Wert	2,2014	15,9568
	Wahrscheinlichkeit	0,0311	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,0130	0,3335
	Obere Konfidenzintervallgrenze	0,1240	0,4705

**Tabelle 84: Statistische Auswertung des ELISA von GLUT3 zur Abbildung 31 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,1838	-0,1627	-0,3466	0,4575	0,2737	0,6202
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0356	0,0356	0,0356	0,0356	0,0356	0,0356
	t-Wert		5,1597	-4,5669	-9,7266	12,839	7,6801	17,406
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0001	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	ja	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,0650	-0,2816	-0,4654	0,3387	0,1548	0,5014
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,3027	-0,0439	-0,2277	0,5763	0,3925	0,7391

### Deskriptive Statistik zu den ELISA Experimenten für MCT1 aus Kapitel 3.3.3

**Tabelle 85: Deskriptive Statistik des ELISA von MCT1 zur Abbildung 32 A mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem dreistündigen Behandlungszeitraum keine Inhibitorgabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	36	36	36	36
	Mittelwert	3,7651	3,3039	4,2569	4,0208
	Standardabweichung	0,4584	0,2799	0,4231	0,2954
	Varianz	0,2102	0,0784	0,1790	0,0873

**Tabelle 86: Statistische Auswertung zur Abbildung 32 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,3487	0,6043
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0621	0,0621
	t-Wert	-5,6178	9,7367
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,5149	0,4381
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,1825	0,7705

**Tabelle 87: Statistische Auswertung des ELISA von MCT1 zur Abbildung 32 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,4918	-0,4612	-0,9530	0,2557	-0,2361	0,7169
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0878	0,0878	0,0878	0,0878	0,0878	0,0878
	t-Wert		5,6026	-5,2547	-10,857	2,9125	-2,6901	8,1672
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0251	0,0481	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	nein	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,2053	-0,7477	-1,2395	-0,0308	-0,5226	0,4304
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,7782	-0,1748	-0,6666	0,5421	0,0503	1,0034

**Tabelle 88: Deskriptive Statistik des ELISA von MCT1 zur Abbildung 32 B mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem dreistündigen Behandlungszeitraum eine Rapamycingabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	3,7262	3,3172	4,1867	4,0646
	Standardabweichung	0,3186	0,2168	0,2724	0,3084
	Varianz	0,1015	0,0470	0,0742	0,0951

**Tabelle 89: Statistische Auswertung zur Abbildung 32 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,2656	0,6040
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0664	0,0664
	t-Wert	-3,9968	9,0904
	Wahrscheinlichkeit	0,0002	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,4462	0,4233
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,0849	0,7846

**Tabelle 90: Statistische Auswertung des ELISA von MCT1 zur Abbildung 32 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,4605	-0,4091	-0,8695	0,3384	-0,1221	0,7475
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0940	0,0940	0,0940	0,0940	0,0940	0,0940
	t-Wert		4,9008	-4,3533	-9,2541	3,6017	-1,2991	7,9550
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0003	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0036	1,0000	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	ja	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,1471	-0,7224	-1,1829	0,0250	-0,4355	0,4341
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,7739	-0,0957	-0,5562	0,6518	0,1913	1,0609

**Tabelle 91 Deskriptive Statistik des ELISA von MCT1 zur Abbildung 32 C mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem dreistündigen Behandlungszeitraum eine AZD8055 Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	3,3242	2,9324	3,8916	3,7120
	Standardabweichung	0,2492	0,2262	0,2593	0,2925
	Varianz	0,0621	0,0512	0,0672	0,0855

**Tabelle 92: Statistische Auswertung zur Abbildung 32 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,2857	0,6735
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0608	0,0608
	t-Wert	-4,7004	11,0808
	Wahrscheinlichkeit	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,4510	0,5083
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,1204	0,8388

**Tabelle 93: Statistische Auswertung des ELISA von MCT1 zur Abbildung 32 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,5674	-0,3918	-0,9592	0,3878	-0,1796	0,7797
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0860	0,0860	0,0860	0,0860	0,0860	0,0860
	t-Wert		6,6005	-4,5584	-11,159	4,5116	-2,0890	9,0700
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0001	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0002	0,2427	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	ja	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,2807	-0,6785	-1,2459	0,1011	-0,4663	0,4930
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,8541	-0,1052	-0,6725	0,6745	0,1071	1,0664

**Tabelle 94: Deskriptive Statistik des ELISA von MCT1 zur Abbildung 33 A mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum keine Inhibitorgabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	36	36	36	36
	Mittelwert	1,9098	1,5777	2,2573	2,3792
	Standardabweichung	0,1776	0,1678	0,2638	0,1666
	Varianz	0,0315	0,0281	0,0696	0,0278

**Tabelle 95: Statistische Auswertung zur Abbildung 33 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,1051	0,5745
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0330	0,0330
	t-Wert	-3,1828	17,3968
	Wahrscheinlichkeit	0,0018	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,1935	0,4861
	Obere Konfidenzintervallgrenze	-0,0167	0,6629

**Tabelle 96: Statistische Auswertung des ELISA von MCT1 zur Abbildung 33 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,3474	-0,3321	-0,6796	0,4694	0,1219	0,8015
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0467	0,0467	0,0467	0,0467	0,0467	0,0467
	t-Wert		7,4397	-7,1123	-14,552	10,050	2,6111	17,163
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0601	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	ja	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,1950	-0,4845	-0,8320	0,3170	-0,0305	0,6491
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,4998	-0,1797	-0,5272	0,6218	0,2743	0,9539

**Tabelle 97: Deskriptive Statistik des ELISA von MCT1 zur Abbildung 33 B mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum eine Rapamycingabe vor.

<b>zweiseitige ANOVA</b>	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	1,6392	1,4510	2,1597	2,3429
	Standardabweichung	0,1565	0,1067	0,1778	0,1615
	Varianz	0,0245	0,0114	0,0316	0,0261

**Tabelle 98: Statistische Auswertung zur Abbildung 33 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen</b>	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	-0,0025	0,7062
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0361	0,0361
	t-Wert	-0,0695	19,5923
	Wahrscheinlichkeit	0,9448	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz	nein	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,1005	0,6082
	Obere Konfidenzintervallgrenze	0,0955	0,8043

**Tabelle 99: Statistische Auswertung des ELISA von MCT1 zur Abbildung 33 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,5205	-0,1882	-0,7087	0,7037	0,1832	0,8920
	Standardfehler des Mittelwerts		0,0510	0,0510	0,0510	0,0510	0,0510	0,0510
	t-Wert		10,210	-3,6922	-13,903	13,804	3,5940	17,497
	Wahrscheinlichkeit		$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0027	$< 1 \cdot 10^{-4}$	$< 1 \cdot 10^{-4}$	0,0037	$< 1 \cdot 10^{-4}$
	Signifikanz		ja	ja	ja	ja	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze		0,3505	-0,3582	-0,8788	0,5337	0,0132	0,7219
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,6905	-0,0182	-0,5387	0,8738	0,3532	1,0620

**Tabelle 100: Deskriptive Statistik des ELISA von MCT1 zur Abbildung 33 C mittels zweiseitiger ANOVA.**

Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum eine AZD8055 Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Glucose	+	+	-	-
	Glutamin	+	-	+	-
	n	18	18	18	18
	Mittelwert	1,8724	2,0769	2,0886	2,3607
	Standardabweichung	0,1065	0,5976	0,0960	0,1597
	Varianz	0,0113	0,3571	0,0092	0,0255

**Tabelle 101: Statistische Auswertung zur Abbildung 33 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Glutamin	Glucose
	Bedingung A	-	-
	Bedingung B	+	+
	Unterschied der Mittelwerte	0,2383	0,2500
	Standardfehler des Mittelwerts	0,0748	0,0748
	t-Wert	3,1846	3,3413
	Wahrscheinlichkeit	0,0022	0,0014
	Signifikanz	ja	ja
	Untere Konfidenzintervallgrenze	0,0348	0,0466
	Obere Konfidenzintervallgrenze	0,4418	0,4535

**Tabelle 102: Statistische Auswertung des ELISA von MCT1 zur Abbildung 33 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen dem Medium, welches als „Bedingung A“ und dem Medium welches als „Bedingung B“ bezeichnet wird. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

<b>Mittelwertvergleich Bonferroni</b>	Bedingung A	Glucose	-	+	+	-	-	-
		Glutamin	+	-	-	-	-	-
	Bedingung B	Glucose	+	+	-	+	-	+
		Glutamin	+	+	+	+	+	-
	Unterschied der Mittelwerte		0,2162	0,2045	-0,0117	0,4883	0,2721	0,2838
	Standardfehler des Mittelwerts		0,1058	0,1058	0,1058	0,1058	0,1058	0,1058
	t-Wert		2,0434	1,9325	-0,1108	4,6145	2,5712	2,6820
	Wahrscheinlichkeit		0,2694	0,3448	1,0000	0,0001	0,0740	0,0551
	Signifikanz		nein	nein	nein	ja	nein	nein
	Untere Konfidenzintervallgrenze		-0,1367	-0,1484	-0,3647	0,1354	-0,0809	-0,0691
	Obere Konfidenzintervallgrenze		0,5692	0,5574	0,3412	0,8413	0,6250	0,6368

### Deskriptive Statistik zu den Biotinylierungsexperimenten aus Kapitel 3.3.4

**Tabelle 103: Deskriptive Statistik des Biotinylierungsassay von GLUT1 zur Abbildung 35 A mittels zweiseitiger ANOVA.** Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum eine AZD8055 Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Inhibitor	-	-	R	R	A	A
	Glutamin	+	-	+	-	+	-
	n	90	90	45	45	45	45
	Mittelwert	0,7817	0,7512	0,8019	0,7912	0,7694	0,6733
	Standardabweichung	0,3868	0,3421	0,4052	0,3608	0,3452	0,2389
	Varianz	0,1496	0,1170	0,1642	0,1302	0,1192	0,0571

**Tabelle 104: Statistische Auswertung zur Abbildung 35 A mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Inhibitor			Glutamin
	Bedingung A	-	-	R	-
Bedingung B	R	A	A	+	
Unterschied der Mittelwerte	0,0301	-0,0451	-0,0752	-0,0420	
Standardfehler des Mittelwerts	0,0457	0,0457	0,0528	0,0374	
t-Wert	0,6575	-0,9867	-1,4239	-1,1240	
Wahrscheinlichkeit	1,0000	0,9734	0,4661	0,2618	
Signifikanz	nein	nein	nein	nein	
Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,1078	-0,1830	-0,2344	-0,1411	
Obere Konfidenzintervallgrenze	0,1679	0,0927	0,0840	0,0572	

**Tabelle 105: Deskriptive Statistik des Biotinylierungsassay von GLUT3 zur Abbildung 35 B mittels zweiseitiger ANOVA.** Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum eine AZD8055 Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Inhibitor	-	-	R	R	A	A
	Glutamin	+	-	+	-	+	-
	n	90	90	45	45	45	45
	Mittelwert	0,6755	0,6529	0,6460	0,6534	0,7552	0,6877
	Standardabweichung	0,1247	0,1610	0,1169	0,1532	0,2071	0,1424
	Varianz	0,0155	0,0259	0,0137	0,0235	0,0429	0,0203

**Tabelle 106: Statistische Auswertung zur Abbildung 35 B mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Inhibitor			Glutamin
	Bedingung A	-	-	R	-
Bedingung B	R	A	A	+	
Unterschied der Mittelwerte	-0,0145	0,0573	0,0718	-0,0264	
Standardfehler des Mittelwerts	0,0195	0,0195	0,0226	0,0160	
t-Wert	-0,7423	2,9312	3,1814	-1,6528	
Wahrscheinlichkeit	1,0000	0,0108	0,0048	0,0993	
Signifikanz	nein	nein	ja	nein	
Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,0734	-0,0016	0,0038	-0,0687	
Obere Konfidenzintervallgrenze	0,0444	0,1161	0,1397	0,0160	

**Tabelle 107: Deskriptive Statistik des Biotinylierungsassay von MCT1 zur Abbildung 35 C mittels zweiseitiger ANOVA.** Dargestellt sind die Werte, anhand derer die Abbildung erstellt wird und die weitere statistische Auswertung mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0083$  erfolgt. Es liegt in dem 24 stündigen Behandlungszeitraum eine AZD8055 Gabe vor.

zweiseitige ANOVA	Inhibitor	-	-	R	R	A	A
	Glutamin	+	-	+	-	+	-
	n	90	90	44	45	45	45
	Mittelwert	0,9523	0,9101	1,0219	0,9586	0,7951	0,8467
	Standardabweichung	0,3174	0,2002	0,3538	0,2248	0,2435	0,1956
	Varianz	0,1007	0,0401	0,1252	0,0505	0,0593	0,0383

**Tabelle 108: Statistische Auswertung zur Abbildung 35 C mittels Bonferroni Korrektur zum adjustierten Signifikanzniveau  $p^* < 0,0083$ .** Der jeweilige statistische Vergleich erfolgt spaltenweise zwischen den Behandlungsgruppen, welche als „Bedingung A“ und welche als „Bedingung B“ bezeichnet wurden. In der Abbildung dargestellt werden für die Fragestellung der Arbeit relevante Signifikanzen.

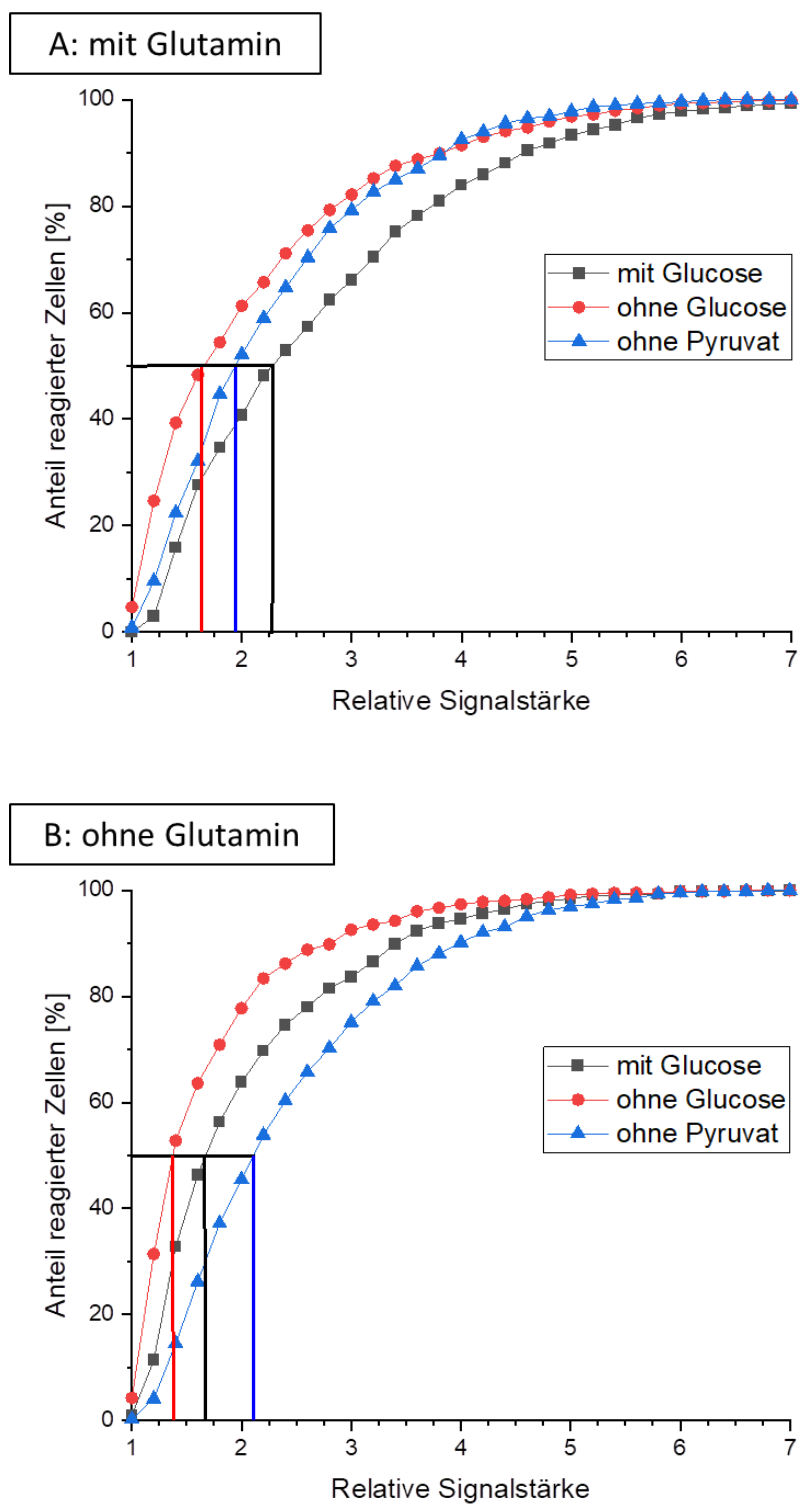
Mittelwertvergleich Bonferroni Behandlungsgruppen	Gruppe	Inhibitor			Glutamin
	Bedingung A	-	-	R	-
Bedingung B	R	A	A	+	
Unterschied der Mittelwerte	0,0587	-0,1102	-0,1689	-0,0235	
Standardfehler des Mittelwerts	0,0341	0,0340	0,0393	0,0278	
t-Wert	1,7219	-3,2459	-4,2958	-0,8466	
Wahrscheinlichkeit	0,2579	0,0039	$6,76 \cdot 10^{-05}$	0,3978	
Signifikanz	nein	ja	ja	nein	
Untere Konfidenzintervallgrenze	-0,0440	-0,2126	-0,2875	-0,0972	
Obere Konfidenzintervallgrenze	0,1614	-0,0079	-0,0504	0,0502	

## 7.4.2 Ergänzende Calcium Imaging Experimente

Nach einer 24 stündigen Inkubation mit den entsprechenden Mangelmedien werden die Zellen unter diesen Bedingungen mit Acetylcholin stimuliert. Um die Reaktionsstärken der verschiedenen Mangelbehandlungen miteinander vergleichen zu können, wird ermittelt, bei welcher relativen Signalstärke der halbmaximale Anstieg der kumulativen Häufigkeitsverteilung erreicht ist (Abbildung 44 und Tabelle 109).

**Tabelle 109: Relative Signalstärke am Punkt des halbmaximalen Anstieges.** Für jede Behandlung ist der zugehörige Wert der x – Achse bei y = 50 % angegeben.

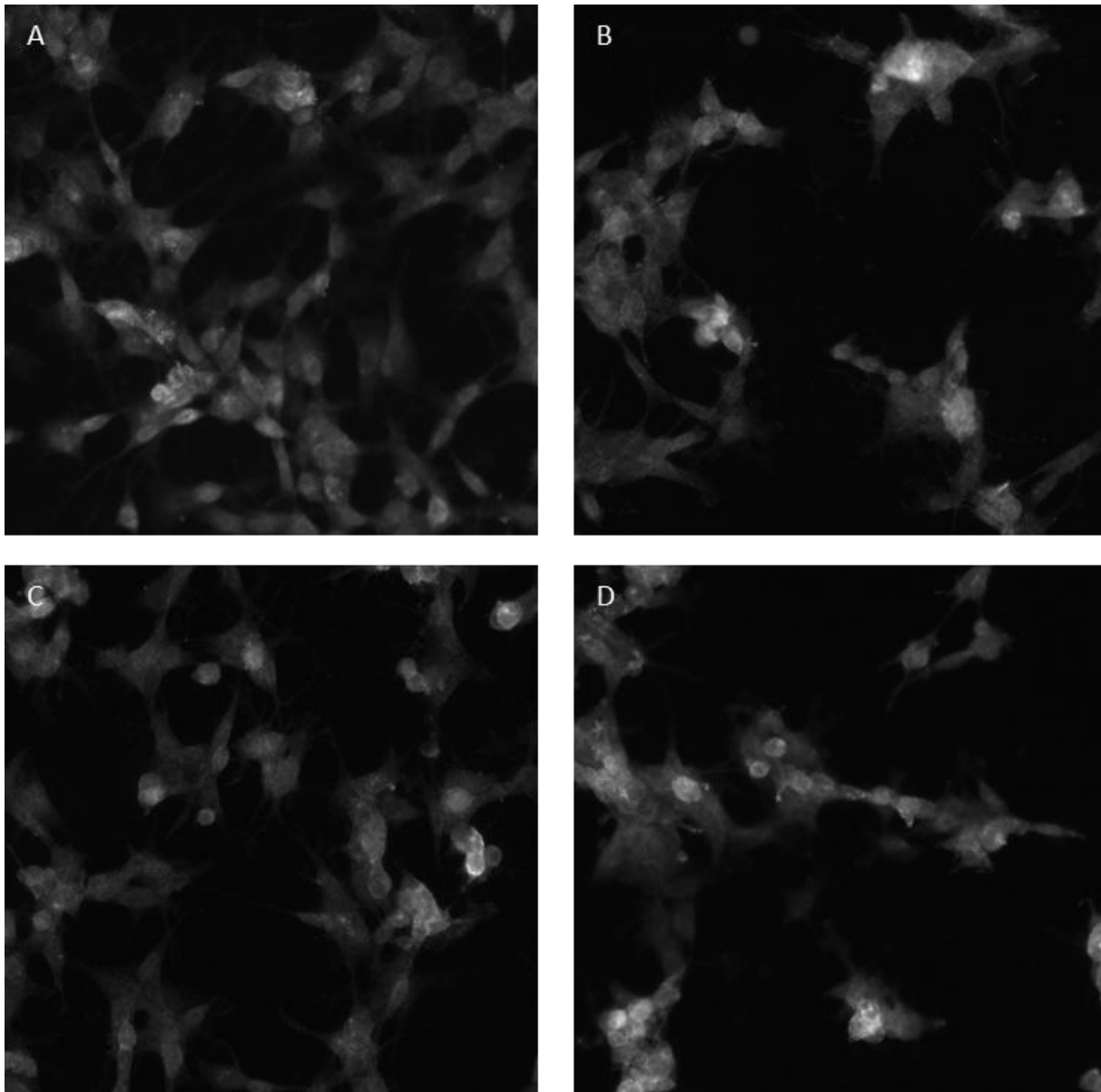
<b>Behandlung</b>		<b>Signalwert bei 50 %</b>
<b>Mit Glutamin</b>	Mit Glucose	2,30
	Ohne Glucose	1,65
	Ohne Pyruvat	1,95
<b>Ohne Glutamin</b>	Mit Glucose	1,70
	Ohne Glucose	1,40
	Ohne Pyruvat	2,15



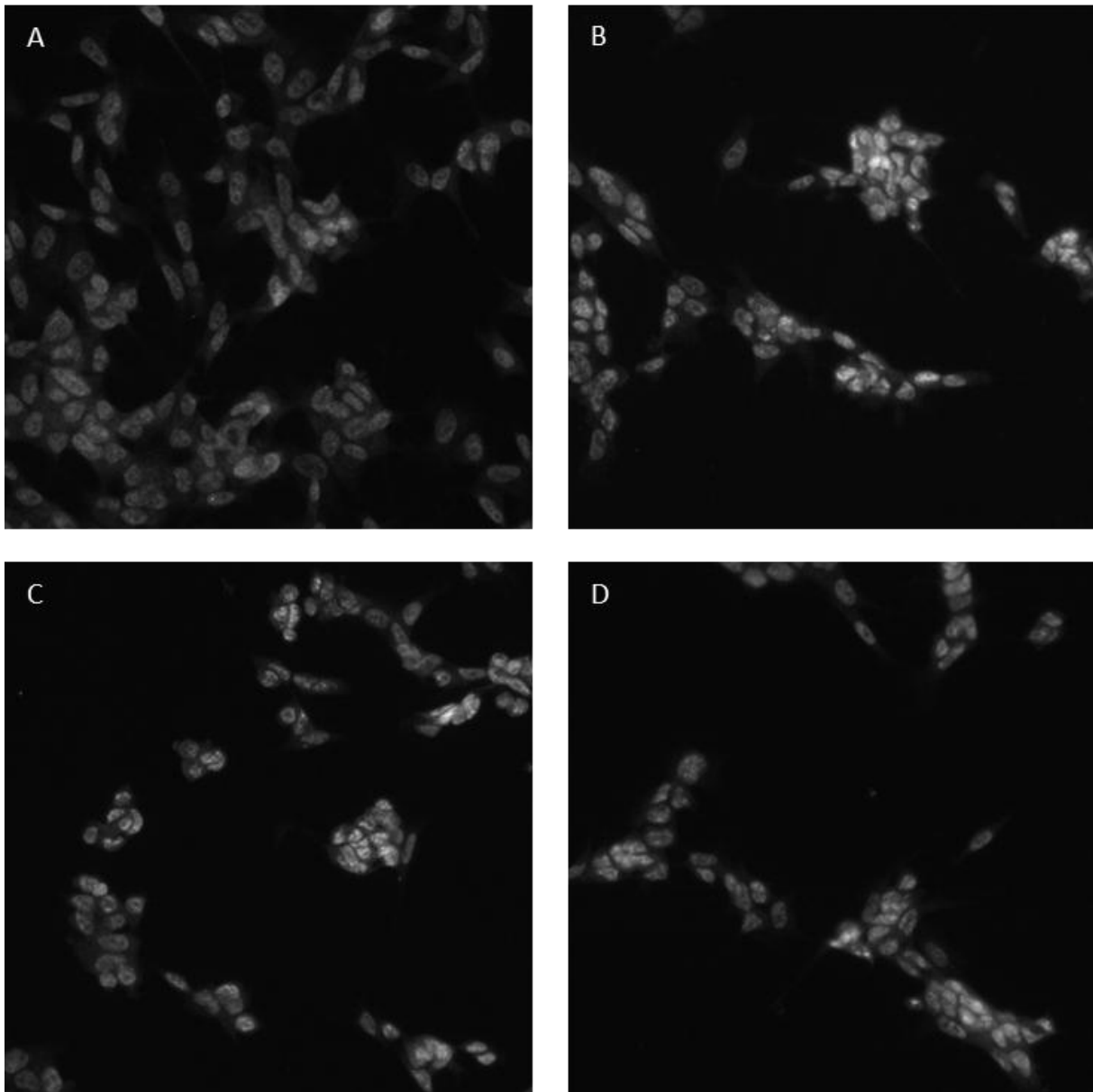
**Abbildung 44: Kumulative Verteilung der bereits reagierten Zellen in Bezug auf die Signalstärke.** Dargestellt wird die relative Anzahl der Zellen, welche bei der aufgetragenen Signalstärke bereits reagiert haben. Der halbmaximale Anstieg der einzelnen Kurven ist mit Linien farblich entsprechend der Legende gekennzeichnet. Die verwendeten Behandlungsmedien aus A enthalten 4 mM Glutamin, die Behandlungsmedien in B enthalten kein Glutamin.

### 7.4.3 Ergänzende Immunocytochemische Experimente

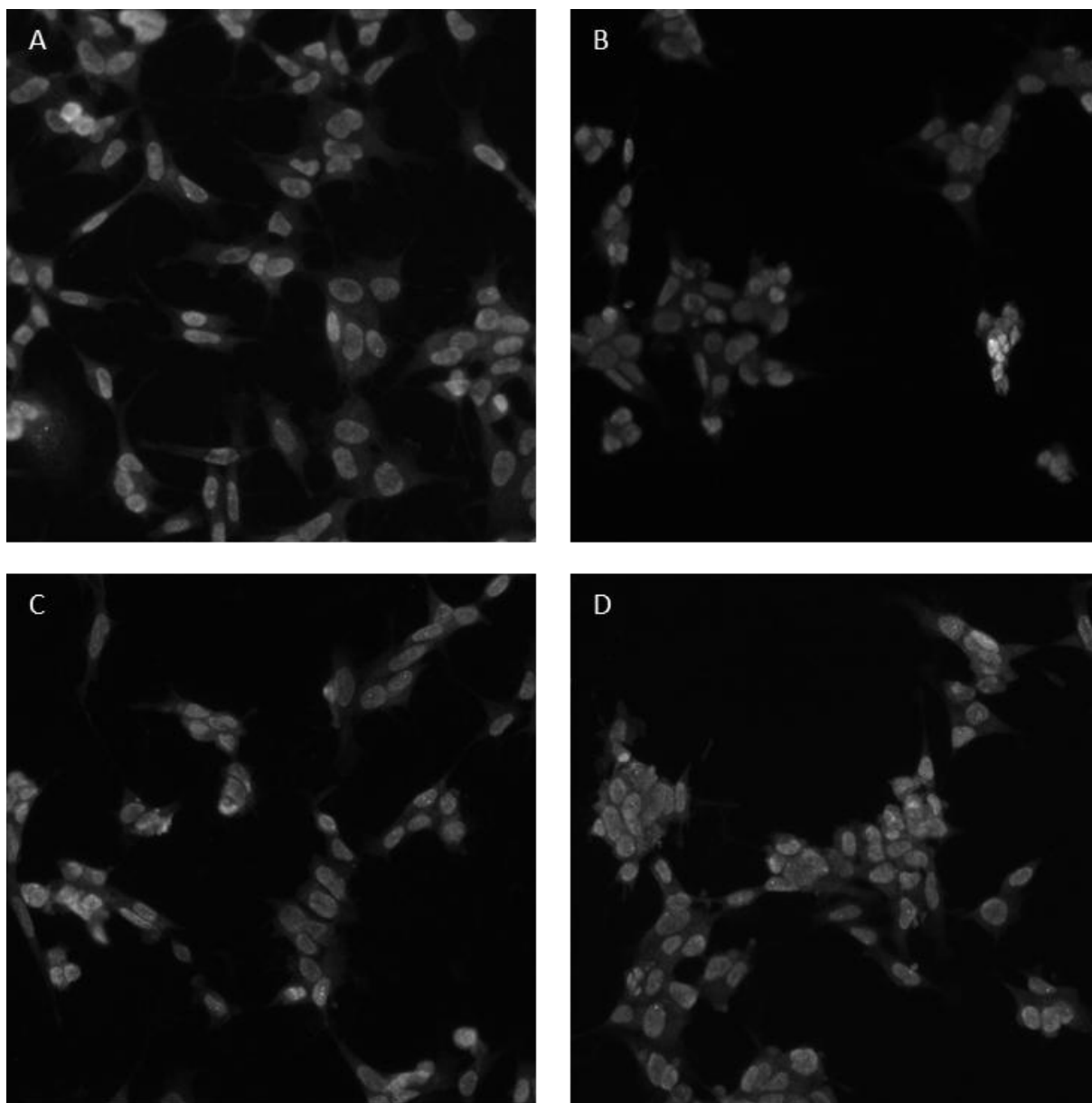
Abbildung 45 bis Abbildung 48 zeigen exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der GLUT1, GLUT3, MCT1 und HIF1 $\alpha$  Antikörperfärbungen.



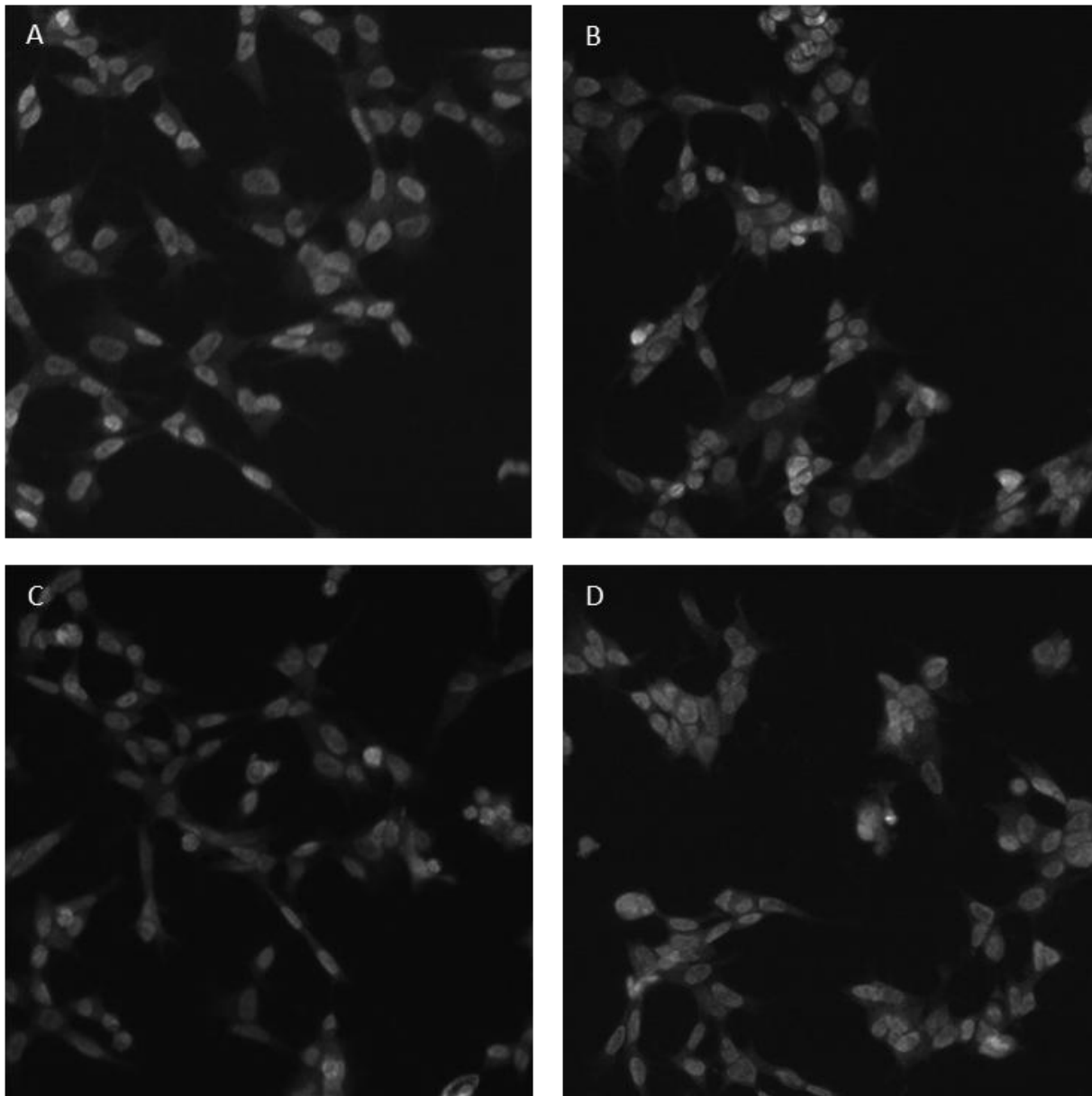
**Abbildung 45: Immunhistochemische Färbung von GLUT1.** A: Vollmedium; B: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel; C: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel mit Rapamycin; D: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel mit AZD8055.



**Abbildung 46: Immunhistochemische Färbung von GLUT3.** A: Vollmedium; B: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel; C: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel mit Rapamycin; D: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel mit AZD8055.



**Abbildung 47: Immunhistochemische Färbung von MCT1.** A: Vollmedium; B: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel; C: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel mit Rapamycin; D: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel mit AZD8055.



**Abbildung 48: Immunhistochemische Färbung von HIF1 $\alpha$ .** A: Vollmedium; B: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel; C: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel mit Rapamycin; D: 24 Stunden Glucose- und Glutaminmangel mit AZD8055.

Für die meisten Messungen lässt sich eine hohe Standardabweichung von mindestens 40 % feststellen (Tabelle 110). Zusätzlich zu der hohen Standardabweichung liegt das spezifische Signal der Färbung kaum über der unspezifischen Färbung des Sekundärantikörpers.

**Tabelle 110: Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie (mit n = 18 aus drei unabhängigen Experimenten).** Das Delta zwischen mittlerem Grauwert der Färbung und des Hintergrundes ist jeweils auf den zugehörigen Wert des Vollmediums normiert. Der Quotient aus dem mittleren Grauwert der Färbung und dem mittleren Grauwert der unspezifischen Färbung des Sekundarantikörpers gibt das Verhältnis zwischen Signal und Rauschen an.

Antigen	Glutamin	Glucose	Inhibitor	normierter Grauwert	Standardabweichung	Signal - Rausch - Verhältnis
<b>GLUT1</b>	+	+	-	1,00	0,33	0,28
	-	-	-	1,45	0,74	0,49
	-	-	Rapamycin	1,47	0,66	0,52
	-	-	AZD 8055	1,95	0,90	0,77
<b>GLUT3</b>	+	+	-	1,00	0,40	0,11
	-	-	-	1,20	0,76	0,19
	-	-	Rapamycin	1,40	0,42	0,27
	-	-	AZD 8055	1,30	0,40	0,26
<b>MCT1</b>	+	+	-	1,00	0,48	0,10
	-	-	-	1,61	0,85	0,37
	-	-	Rapamycin	1,59	0,68	0,37
	-	-	AZD 8055	1,73	0,57	0,48
<b>HIF1a</b>	+	+	-	1,00	0,15	0,05
	-	-	-	1,11	0,39	0,06
	-	-	Rapamycin	1,26	0,37	0,10
	-	-	AZD 8055	1,18	0,21	0,08

In Anbetracht des niedrigen Signal – Rausch – Verhältnisses und der hohen Standardabweichung lassen sich spezifische und unspezifische Färbung nicht voneinander trennen. Dies erlaubt keine verlässliche Aussage über die Auswirkung der Behandlungen auf die zu detektierenden Antigene.

#### 7.4.4 Ergänzende ELISA Experimente

Mit dem Einsatz einer möglichst umfangreichen Histonfärbung durch eine Mischung aus anti-Histon 3 und anti-Histon 4 Antikörper wird versucht die Zellzahl über die Intensität der Färbung zu kontrollieren (Tabelle 111 und Tabelle 112). Dies wird für den 24 stündigen, kombinierten Glutamin- und Glucosemangel sowie für die Inhibitoren durchgeführt.

**Tabelle 111: Relativer Histon 3 und Histon 4 Gehalt nach 24 stündiger Mangelbehandlung und Zugabe von Rapamycin (respektive Lösemittelkontrolle) mit n = 54 aus drei unabhängigen Experimenten.** Um eine Fehlerkumulierung durch multiple Vergleiche auszuschließen, wird eine Bonferroni – Korrektur durchgeführt. Hierdurch ergibt sich für die statistische Auswertung mittels ANOVA ein adjustiertes Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0125$ .

<b>Glutamin</b>	+	-	+	-
<b>Glucose</b>	+	-	+	-
<b>Inhibitor</b>	-	-	Rapamycin	Rapamycin
<b>Normierter Mittelwert</b>	1,060	0,976	1,068	1,037
<b>Standardabweichung</b>	0,127	0,026	0,129	0,108
<b>p-Wert</b>	1	0,367	0,944	0,824

**Tabelle 112: Relativer Histon 3 und Histon 4 Gehalt nach 24 stündiger Mangelbehandlung und Zugabe von AZD 8055 (respektive Lösemittelkontrolle) mit n = 54 aus drei unabhängigen Experimenten.** Um eine Fehlerkumulierung durch multiple Vergleiche auszuschließen, wird eine Bonferroni – Korrektur durchgeführt. Hierdurch ergibt sich für die statistische Auswertung mittels ANOVA ein adjustiertes Signifikanzniveau von  $p^* < 0,0125$ .

<b>Glutamin</b>	+	-	+	-
<b>Glucose</b>	+	-	+	-
<b>Inhibitor</b>	-	-	AZD8055	AZD8055
<b>Normierter Mittelwert</b>	1,012	0,981	1,010	0,997
<b>Standardabweichung</b>	0,023	0,018	0,014	0,017
<b>p-Wert</b>	1	0,133	0,884	0,417

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, weder durch die Mangelbehandlung noch durch die Zugabe der Inhibitoren Rapamycin oder AZD 8055.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich während der Entstehung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Uli Müller für seine herausragende fachliche Betreuung, die stets wertvollen Impulse sowie die konstruktive Kritik, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Durch seine Expertise und das kontinuierliche Vertrauen in meine wissenschaftliche Arbeit konnte ich mich sowohl fachlich als auch persönlich weiterentwickeln.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinem wissenschaftlichen Begleiter und Zweitkorrektor Herr Prof. Dr. Martin van der Laan für seine wertvolle Unterstützung, seine konstruktiven Anregungen, sein offenes Ohr und seine Zeit bedanken. Seine Rückmeldungen haben entscheidend zur Qualität dieser Dissertation beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Helmut Kallenborn für seine wertvolle Unterstützung bei der statistischen Auswertung widerspenstiger Datensätze. Des Weiteren möchte ich mich bei ihm dafür bedanken, dass ich das Praktikum zur Lehrveranstaltung Histologie betreuen durfte.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen der gesamten Arbeitsgruppe Zoologie / Physiologie und Neurobiologie die durch ihre Zusammenarbeit, fachlichen Diskussionen und ihr Engagement einen entscheidenden Beitrag zu diesem Forschungsprojekt geleistet haben. Insbesondere möchte ich mich bei unseren technischen Assistentinnen Iris Fuchs und Marion Schwarz für ihre Bereitschaft danken, ihr über viele Jahre angesammeltes praktisches Wissen mit allen Tricks und Kniffen zu teilen. Dies ersparte mir so manchen Fehler. Zudem möchte ich Frau Dr. Susanne Meuser für die Vermittlung ihrer umfangreichen Imkerreikennissen, der Betreuung unseres Lehrbienenstandes und der Produktion unseres Honigs bedanken, wodurch wir von einem Glucosemangel stets verschont blieben. Mein weiterer Dank gilt Herr Michael Glander, welcher mit seiner technischen Expertise alle Gerätschaften stets einsatzbereit hielt und sofort zur Stelle war, falls dem nicht so war.

Ebenso möchte ich meinen Mitdoktoranden Marie, Sonja und Rebecca für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die anregenden Diskussionen und die Unterstützung im Forschungsalltag danken.

Darüber hinaus danke ich meinen Eltern Rolf und Birgit Mühlenbacher für ihren unerschütterlichen Rückhalt, ihr Verständnis und ihre Geduld. Ohne ihre Unterstützung wären weder diese Arbeit noch der Weg dahin möglich gewesen.

Des Weiteren danke ich Uwe für seine moralische und emotionale Unterstützung in den anspruchsvollen Phasen dieser Dissertation. Sein Rückhalt war für mich eine unersetzliche Quelle der Stärke.

Zudem möchte ich mich bei meiner langjährigen Freundin Lika Ranker dafür bedanken, dass sie in jeder Lebensphase für mich da war wenn ich Hilfe oder ein offenes Ohr brauchte. Danke auch an Christian Elsässer und Julian Heidt für die Spieleabende welche auch gerne mal bis zum Sonnenaufgang dauerten, sie waren mir während der Pandemie stets ein Lichtblick. Auch wenn das Gesetz der großen Zahlen offenbar nicht für jeden gleichermaßen gilt.

Abschließend danke ich allen, die auf direkte oder indirekte Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## **9 Lebenslauf und akademischer Werdegang**



