

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie

Institutsleiter: Univ.-Prof. Dr. med.
Volker Spindler

Thioredoxin Interacting protein (TXNIP) Is Differentially expressed in Human Tumor samples but Is Absent in Human Tumor Cell Line Xenografts: Implications for Its Use as an Immunosurveillance Marker

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Joana Marlene Schröder
aus Hamburg

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.02.2025**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Ronald Simon

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Manfred Jücker

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Publikation im Original	II
Supplements	XVII

1. Darstellung der Publikation mit Literaturnachweis	1
1.1. Einleitung	1
1.1.1. TXNIP und das TRX-system	1
1.1.2. Weitere Funktionen von TXNIP	2
1.1.3. Forschungsziel	3
1.2. Ergebnisse	4
1.2.1. Primär humane Tumorproben (TMA)	4
1.2.2. Tumorzelllinien und primäre Maus-Xenograft-Tumoren	4
1.2.3. Tumordinfiltrierende Leukozyten	5
1.3. Diskussion	5
1.4. Schlussfolgerung	8
1.5. Literaturverzeichnis	9
2. Zusammenfassung in englischer Sprache	14
3. Zusammenfassung in deutscher Sprache	15
4. Erklärung des Eigenanteils	16
5. Danksagung	17
6. Lebenslauf	18
7. Eidesstattliche Erklärung	19

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Definition
ASK1	Apoptosis Stimulating Kinase 1
ChREBP	Carbohydrate Response Element-Binding Protein
FCS	Fetal Calf Serum
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
GLUT1	Glucosetransporter 1
NADPH	α -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NF- γ	Nuclear-Factor- γ
NK cells	Natural Killer cells
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
NLRP3	Nod-Like Receptor Protein 3
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
Mlx	MondoA-Max-Like Protein X
ROS	Reactive Oxygen Species
SCLC	Small Cell Lung Cancer
TBP-2	Thioredoxin-Binding-Protein-2
TMA	Multi-Tumour Tissue Microarray
TNF	Tumour Necrosis Factor
TRX	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin Reductase
TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein
VDUP1	1,25-Dihydroxyvitamin D3-Upregulated Protein 1
WHO	World Health Organization

Article

Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) Is Differentially Expressed in Human Tumor Samples but Is Absent in Human Tumor Cell Line Xenografts: Implications for Its Use as an Immunosurveillance Marker

Joana Schröder ^{1,2}, Udo Schumacher ¹ and Lukas Clemens Böckelmann ^{1,3,*} 

¹ Institute of Anatomy and Experimental Morphology, Center for Experimental Medicine, University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany; joana_schroeder@web.de (J.S.); uschumac@uke.de (U.S.)

² HanseMerkur Center for Traditional Chinese Medicine at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20251 Hamburg, Germany

³ Department of Oncology, Hematology and Bone Marrow Transplantation with Section Pneumology, University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

* Correspondence: l.boeckelmann@uke.de; Tel.: +49-407-4102-0978; Fax: +49-407-4105-5427

Received: 3 September 2020; Accepted: 16 October 2020; Published: 18 October 2020



Simple Summary: The metabolic protein TXNIP plays a crucial role in various cellular processes. Abnormal TXNIP levels are notable, e.g., in type II diabetes, cardiovascular diseases, and tumors. Using immunohistochemical staining for TXNIP in different tumor entities, we give new insights of TXNIP expression on the protein level. In human tumors, staining intensity inversely correlated with aggressiveness of the tumor entity. In contrast, human tumor cell lines grown in mice (xenografts), consistently revealed no staining. Hence, loss of TXNIP suggests a critical role for the development of tumors in xenografts. Furthermore, we investigated TXNIP staining of immunocompetent cells in the proximity of the xenograft tumor tissue. Our findings demonstrate that TXNIP downregulation is a common feature in human tumor xenograft models. Subsequently, TXNIP expression might be used to monitor the functional state of tumor-infiltrating leukocytes in tissue sections and may help to predict response to modern immune therapy.

Abstract: Thioredoxin interacting protein (TXNIP) is a metabolic protein critically involved in redox homeostasis and has been proposed as a tumor suppressor gene in a variety of malignancies. Accordingly, TXNIP is downregulated in breast, bladder, and gastric cancer and in tumor transplant models TXNIP overexpression inhibits growth and metastasis. As TXNIP protein expression has only been investigated in few malignancies, we employed immunohistochemical detection in a large multi-tumor tissue microarray consisting of 2,824 samples from 94 different tumor entities. In general, TXNIP protein was present only in a small proportion of primary tumor samples and in these cases was differently expressed depending on tumor stage and subtype (e.g., renal cell carcinoma, thyroid cancer, breast cancer, and ductal pancreatic cancer). Further, TXNIP protein expression was determined in primary mouse xenograft tumors derived from human cancer cell lines and was immunohistochemically absent in all xenograft tumors investigated. Intriguingly, TXNIP expression became gradually lower in the proximity of the primary tumor tissue and was absent in leukocytes directly adjacent to tumor tissue. In conclusion, these findings suggest that TXNIP downregulation is as a common feature in human tumor xenograft models and that intra-tumoral leukocytes down-regulate TXNIP. Hence TXNIP expression might be used to monitor the functional state of tumor-infiltrating leukocytes in tissue sections.

Keywords: cancer; immunotherapy; reactive oxygen species; thioredoxin; thioredoxin interacting protein; tissue array; tumorigenesis; xenograft

1. Introduction

Oxidative stress, which is the excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS), is an important factor in cancer development and progression [1]. Therefore, cells provide specific antioxidant defense systems to scavenge ROS and to limit damage to proteins, nucleic acids, and lipids [1]. One of such systems is the thioredoxin system, which includes thioredoxin (TRX), thioredoxin reductase (TrxR), α -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and thioredoxin interacting protein (TXNIP) [2,3]. To alleviate oxidative stress, TRX transfers reducing equivalents to oxidized proteins in the cell. Oxidized TRX, in turn, is regenerated by TrxR via the expenditure of NADPH (summarized in Figure S3) [2].

TXNIP was initially described as 1,25-dihydroxyvitamin D3-upregulated protein 1 (VDUP1) in human promyelocytic leukemia HL-60 cells [4]. It is ubiquitously expressed and highly conserved across different species [5]. TXNIP belongs to the α -arrestin protein family and is so far the only family member known, to bind TRX [6,7]. TXNIP acts as a negative modulator of TRX by binding to the catalytic center in its reduced state forming a disulfide [8].

Excessive ROS as well as many apoptotic stimuli induce rapid upregulation of TXNIP, which will ultimately lead to cell apoptosis [9,10]. TRX itself is an inhibitor of apoptosis stimulating kinase 1 (ASK1), which triggers the execution of programmed cell death by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways [11]. TXNIP competes with ASK1 to bind to TRX and therefore facilitates an increase in the availability of activated pro-apoptotic ASK1 [12]. Further, TXNIP positively regulates p53 activity in hematopoietic cells [13]. Thus, it was speculated that TXNIP functions as a tumor suppressor gene (supporting experimental evidence summarized in Table S1). Indeed, TXNIP was found to be downregulated in hepatocellular carcinoma (HCC) in a majority of patients [14]. TXNIP-KO mice are more susceptible to HCC and TXNIP-deficient tumors proliferate significantly more than their wild type counterpart [14]. Moreover, in HCC cell lines upregulation of TXNIP is implicated in the inhibition of cell proliferation and G1 cell-cycle arrest [15]. Likewise, in bladder cancer TXNIP mRNA was significantly decreased in 39 human bladder cancers as compared to 6 normal samples and could be inversely correlated to the grade and stage of bladder cancer [16].

Subsequent studies fostered the role of TXNIP in cancer pathophysiology and therapy. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid increases TXNIP expression, thereby causing ROS accumulation and apoptosis induction in solid tumors and leukemias, but not in normal cells [17].

Interestingly, TXNIP was also implicated in TRX-independent functions, especially in glucose and lipid metabolism. Insulin production in β -cells, glycolysis, and cellular glucose uptake have been linked to TXNIP function as well as cellular immunity [2]. TXNIP-deficient mice, for example, lack functional natural killer (NK) cells [18] and TXNIP seems to be a prerequisite in the transformation of naïve T-cells into their activated state by increased glucose uptake and metabolism [19]. Furthermore, TXNIP stimulates cellular inflammatory responses by activating nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome and maturation of interleukin-1 β [20,21]. NLRP3 inflammasome activation is additionally augmented by TXNIP-mediated nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling, which is a key mediator in inflammatory response [22].

Given the bifunctional nature of TXNIP and the diverse functions it can execute in tumorigenesis (see also Figure S4), its expression might differ dependent on tumor origin and tumor subtype. Therefore, we detected TXNIP protein expression immunohistochemically in a large multi-tumor tissue microarray (TMA). Furthermore, we analyzed TXNIP expression in widely used tumor cell lines taken directly from 2D-culture and in archival mouse xenograft tumor tissues.

2. Results

2.1. TXNIP Expression in Primary Human Tumor Samples

2824 of 3662 tumor samples were interpretable in our TMA analysis. Non-informative cases ($n = 838$; 23%) were due to lack of tissue samples or absence of unequivocal cancer tissue in the respective TMA spot. In the total cohort, negative TXNIP expression was found in 73%, weak TXNIP expression was found in 14% of all cancers, moderate TXNIP expression was found in 8%, and strong TXNIP expression was found in 5% of all cancers (Table 1). Representative IHC images of negative, weak, moderate, and strong TXNIP protein expression are shown in Figure 1.

Table 1. Immunohistochemical detection of thioredoxin interacting protein (TXNIP) in a multi-tumor tissue microarray.

Organ System	Tissue	Specific Tumor Entity	<i>n</i>	Negative %	Weak %	Medium %	High %	Leukocytes TXNIP Positive %
Bone		Chondrosarcoma	14	86	7	7	0	7
		Osteosarcoma	20	80	20	0	0	15
Endocrine	Adrenal gland	Adenoma	43	47	35	14	5	0
		Carcinoma	14	57	43	0	0	0
		Pheochromocytoma	30	13	20	13	53	0
	Thyroid	Adenoma	47	81	11	6	2	4
		Anaplastic carcinoma	24	88	13	0	0	13
		Follicular carcinoma	47	81	13	4	2	2
		Medullary carcinoma	42	69	26	5	0	10
		Papillary carcinoma	45	58	24	13	4	2
		Neuroendocrine tumor	27	41	33	7	19	30
Gastrointestinal	Anal canal	Squamous cell carcinoma	28	79	18	4	0	43
	Large intestine	Adenoma, low grade	18	44	57	0	0	33
		Adenoma, high grade	22	64	27	9	0	64
		Adenocarcinoma	29	66	21	14	0	52
	Small intestine	Adenocarcinoma	6	33	17	50	0	33
	Liver	Cholangiocellular carcinoma	29	55	24	17	3	10
		Hepatocellular carcinoma	41	32	42	22	5	0
	Stomach	Carcinoma, diffuse Type	34	94	6	0	0	47
		Carcinoma, intestinal Type	31	77	19	3	0	52
	Esophagus	Adenocarcinoma	30	67	20	13	0	53
		Squamous cell carcinoma	29	93	3	3	0	69
	Pancreas	Adenocarcinoma, ductal	36	61	11	17	11	67
		Adenocarcinoma, papillary	18	78	11	11	0	67
		Neuroendocrine Tumor	29	52	21	21	7	45
		Gastrointestinal Stroma tumor	37	92	5	3	0	16
Gynecologic	Cervix	Adenocarcinoma	45	73	13	11	2	42
		Squamous cell carcinoma	37	92	5	0	3	51
	Endometrium	Carcinoma, endometrioid	46	74	15	7	4	30
		Carcinoma, serous	40	78	20	3	0	0
	Breast	Carcinoma, ductal (NST)	22	87	5	5	5	14
		Carcinoma, lobular	30	70	20	10	0	43
		Carcinoma, medullary	14	71	21	7	0	50
		Carcinoma, mucinous	14	71	21	7	0	21
		Carcinoma, phyllodes	46	37	24	24	15	30
		Carcinoma, tubular	12	50	25	8	17	50
	Ovaries	Brenner tumor	6	50	50	0	0	17
		Carcinoma, endometrioid	28	61	21	7	11	11
		Carcinoma, mucinous	24	54	33	13	0	13
		Carcinoma, serous	41	66	20	10	5	22
	Uterus	Carcinosarcoma	47	81	13	6	0	13
		Stroma sarcoma	12	100	0	0	0	25
	Vagina	Squamous cell carcinoma	26	92	0	8	0	38
	Vulva	Squamous cell carcinoma	36	78	14	6	3	67
Hematologic		Hodgkin-Lymphoma	41	98	2	0	0	27
		Non-Hodgkin-Lymphoma	43	100	0	0	0	40
		Thymoma	26	77	19	4	0	46

Table 1. Cont.

Organ System	Tissue	Specific Tumor Entity	n	Negative %	Weak %	Medium %	High %	Leukocytes TXNIP Positive %
Head, Chest, and Respiratory tract	Larynx	Squamous cell carcinoma	43	81	14	5	0	65
	Lung (Non-small cell)	Adenocarcinoma	33	73	18	9	0	52
		Bronchoalveolar carcinoma	6	67	33	0	0	67
		Bronchial carcinoma, large cell	21	86	14	0	0	43
		Squamous cell carcinoma	34	97	3	0	0	50
	Lung (Small cell)	Carcinoma	12	100	0	0	0	42
		Metastasis small cell carcinoma	2	100	0	0	0	0
	Oral cavity	Squamous cell carcinoma	49	67	22	4	6	57
	Pleura	Mesothelioma	24	65	13	19	3	17
	Salivary glands	Basal cell adenoma	14	43	0	43	14	7
		Parotis, pleomorphic adenoma	47	89	9	0	2	4
		Parotis, Warthin tumor	47	9	21	30	41	19
Skin		Basalioma	43	95	2	2	0	0
		Benign Naevus	27	93	4	4	0	41
		Melanoma	44	82	7	11	0	18
		Merkel cell carcinoma	38	100	0	0	0	13
		Pilomatrixoma	26	100	0	0	0	35
		Squamous cell carcinoma	45	84	11	4	0	60
Soft tissue		Angiosarcoma	27	93	0	7	0	63
		Granular cell tumor	21	100	0	0	0	76
		Giant cell tumor of tendon sheath	38	82	18	0	0	42
		Leiomyoma	50	98	2	0	0	40
		Leiomyosarcoma	48	94	6	0	0	52
		Liposarcoma	35	94	6	0	0	46
Stromal cell	Brain		20	85	15	0	0	5
	Heart		19	84	16	0	0	0
	Kidney		16	13	0	50	38	0
	Large intestine		8	63	25	13	0	0
	Liver		13	33	8	8	50	0
	Lymph nodes		9	100	0	0	0	22
	Pancreas		15	0	0	13	87	0
	Prostate		19	58	21	21	0	21
	Skin		3	100	0	0	0	33
	Thyroid		17	94	6	0	0	6
Urogenital	Kidney	Carcinoma, clear cell	47	70	15	11	4	32
		Carcinoma, chromophobe	43	61	23	9	7	2
		Carcinoma, papillary	38	58	18	18	5	13
		Oncocytoma	41	10	15	24	51	5
	Prostate	Adenocarcinoma	45	82	18	0	0	80
		Small cell	11	100	0	0	0	27
	Germ cell tumor	Carcinoma, embryonal	49	100	0	0	0	4
		Seminoma	48	100	0	0	0	4
		Teratoma	33	70	18	6	6	55
		Yolk sac tumor	45	100	0	0	0	9
	Bladder	Carcinoma, small cell	16	88	13	0	0	31
	Urothelial	Carcinoma, pTa	36	56	14	25	6	19
		Carcinoma, T2-4	46	74	17	9	0	41

2.2. TXNIP is Differently Expressed in Tumor Subtypes

TXNIP was proposed to be a tumor suppressor [23], which can be recapitulated for some tumor entities analyzed on our TMA. In thyroid cancer, for example, the total proportion of TXNIP-positive tumors is higher in papillary carcinomas (41.9%), which are associated with the most favorable prognosis amongst thyroid cancer subtypes (Figure 2a). Follicular carcinomas of the thyroid gland have a less favorable prognosis and display a considerably lower percentage of TXNIP-positive tumors (19.2%). In contrast, TXNIP was only weakly expressed in 12.5% of undifferentiated anaplastic carcinomas having a median survival of only months [24].

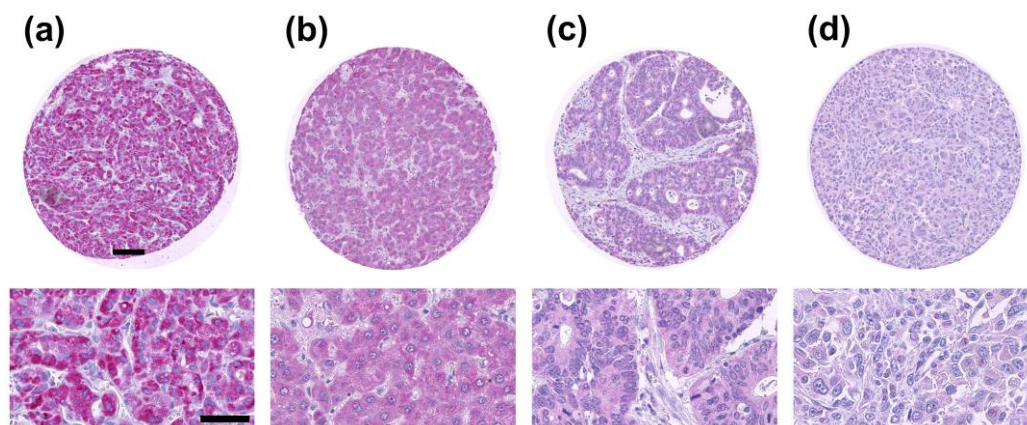


Figure 1. Representative images of thioridoxin interacting protein (TXNIP) immunostaining results on multi-tumor tissue micro array (TMA). (a) Strong TXNIP protein expression in an oncocytoma sample, (b) moderate TXNIP protein expression in a hepatocellular carcinoma sample, (c) weak TXNIP protein expression in a mucinous ovarian cancer sample, (d) negative TXNIP protein expression in an anaplastic thyroid cancer sample. Staining with Permanent Red. Scale bar (upper panel) = 100 μ m, scale bar (lower panel) = 50 μ m.

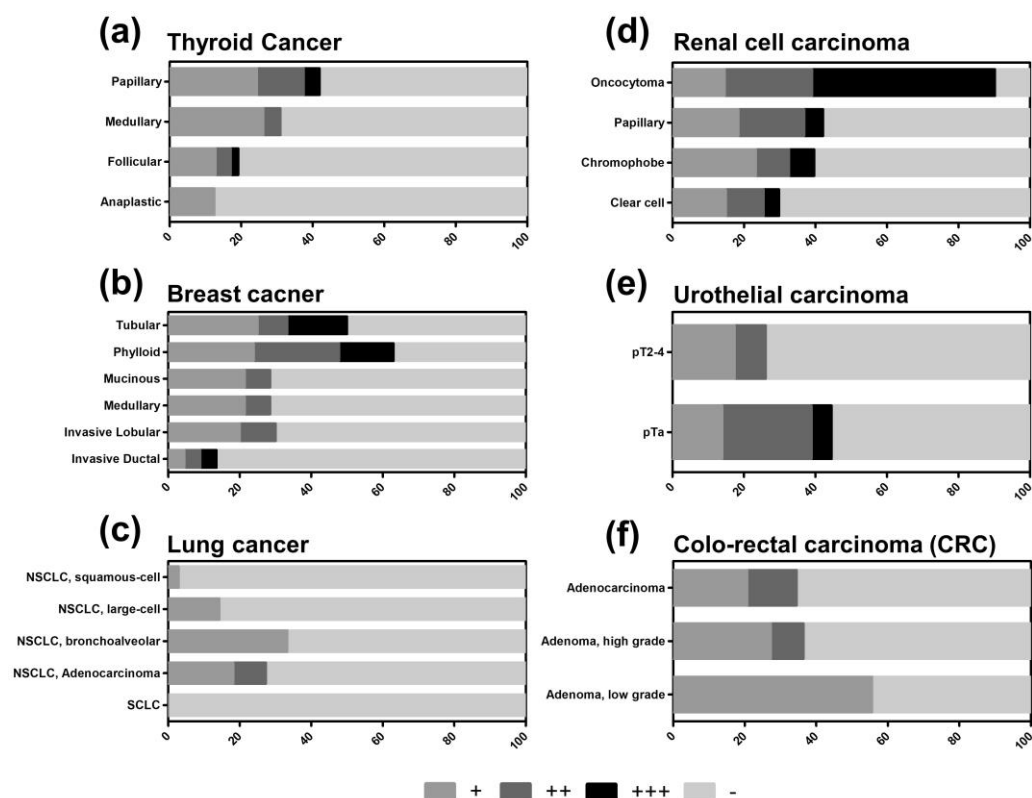


Figure 2. Differential expression of thioridoxin interacting protein (TXNIP) in selected tumor types and subtypes on multi-tumor TMA. (a) Thyroid cancer subtypes, (b) breast cancer subtypes, (c) lung cancer including non-small cell lung cancer (NSCLC) subtypes and small-cell lung cancer (SCLC), (d) renal cell cancer, (e) urothelial cancer (pTa = non-invasive papillary carcinoma, pT2-4 = invasive carcinoma), and (f) colo-rectal cancer (CRC). ‘-’ = negative, ‘+’ = weak, ‘++’ = moderate, and ‘+++’ = strong TXNIP expression.

Similar results were obtained for breast cancer, renal cell carcinoma, and urothelial carcinoma. In breast cancer, prognostically favorable tubular carcinomas and the heterogeneous subgroup of phyllodes tumors—with a wide range from benign over borderline to malignant types—showed a distinct higher percentage of total TXNIP-positive tumors (50.0% and 63.0%, respectively) compared to the prognostically more unfavorable other subtypes (Figure 2b). Interestingly, in invasive ductal carcinomas, only 13.6% of tumors displayed TXNIP protein expression but retained a diverse expression pattern ranging from weak to high. In kidney cancer, benign oncocytomas are TXNIP-positive in most cases (90.2%), while TXNIP expression got lost in malignant renal cell carcinomas (ranging from 29.8 to 42.1%, Figure 2d). Interestingly, in urothelial carcinomas, the proportion of TXNIP-positive tumors correlates with tumor stage. In urothelial pTa tumors, 44.4% of tumors displayed positive TXNIP expression, while among pT2-4 tumors only 26.1% were positive with complete loss of high TXNIP expression (Figure 2e).

In contrast, colo-rectal cancer specimens showed no clear patterning of TXNIP expression: TXNIP-positive tumors were detected in 34.5% of adenocarcinomas, 36.4% of high-grade adenomas, and some weak expression of 55.6% in low-grade adenomas (Figure 2f).

For further analysis, we dichotomized our results into a TXNIP low group (negative and weak expression) and a TXNIP high group (medium and high expression) to more clearly expose those tumors and subtypes that downregulate or lose TXNIP expression. Accordingly, low TXNIP expression was found in 12.6% of all cancers, while high TXNIP expression was found in 87.4% of all cancers. When comparing adenocarcinomas with carcinomas derived from squamous cells, adenocarcinomas demonstrated higher numbers of TXNIP-positive tumors (Figure 3a,b). In non-small cell lung cancer (NSCLC), for example, a proportion of adenocarcinomas showed higher TXNIP levels but not any squamous cell carcinomas (Figures 2c and 3a,b).

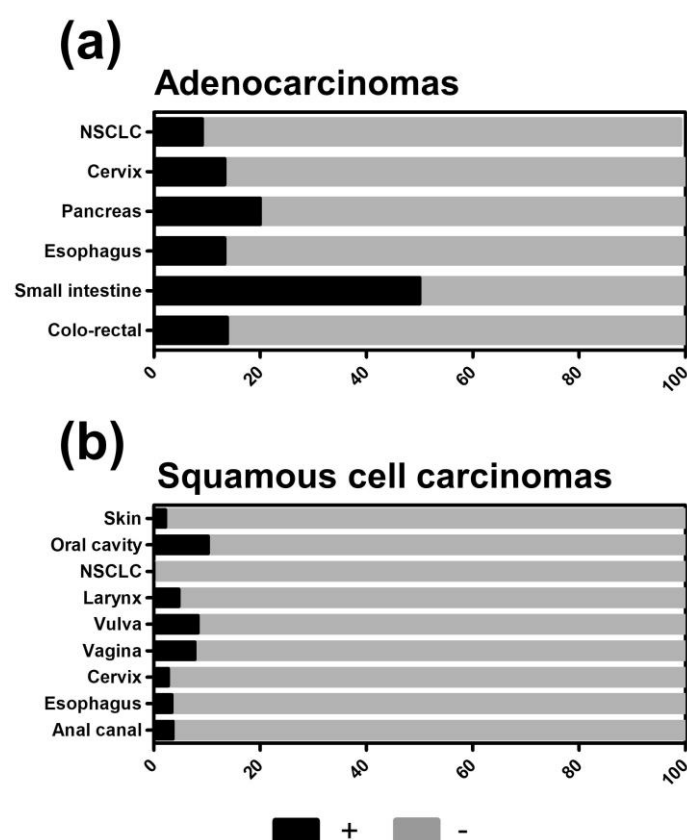


Figure 3. Percentage of thioredoxin interacting protein (TXNIP)-positive tumor samples of all tumor samples in adenocarcinomas (a) and squamous cell carcinomas (b) on multi-tumor TMA. ‘+’ = high, ‘−’ = low TXNIP protein expression. NSCLC = Non-small cell lung cancer.

2.3. TXNIP Expression in Mouse Xenograft Tumors

Tumor models, especially mouse xenografts, are of increasing importance in cancer research, but tumor biology might differ significantly from patient tumors. We, therefore, detected TXNIP protein expression in human cancer cell lines and paired mouse xenograft tumors. TXNIP expression was detected in HT-29 and HCT 116 cells (both colon carcinoma), DU4475 (breast cancer), and PaCa 5072 and PaCa 5061 cells (both pancreatic carcinoma). In all other cell lines tested, TXNIP expression was immunohistochemically absent (Table 2). Interestingly, TXNIP expression was absent in all mouse xenograft tumors tested (Table 2).

Table 2. Expression of thioredoxin interacting protein (TXNIP) in human cancer cell lines and mouse xenograft tumors.

Tumor	Cell Line	n	Mean Area of Positive Cells in %			Cells in Agar	Tumor Cells
			Surrounding Tissues				
			CD45	TXNIP	TXNIP/CD45	TXNIP	TXNIP
Bronchial Carcinoma	H69AR1	4	6.4	1.7	26.6	—	—
	H69AR3	3	8.7	5.6	64.4	—	—
	NCI-H69	5	4.6	1.7	37.0	—	—
	NCI-H82	4	12.1	5.5	45.5	—	—
	SW2	4	5.1	3.1	60.8	—	—
Colon Carcinoma	HT-29	5	12.5	2.1	16.8	++	—
	HCT 116					+	—
Mamma Carcinoma	DU4475	2	9.6	3.6	37.5	+	—
	MCF-7	5	7	0.7	10.0	—	—
	MDA-MB-231	5	19.6	3.8	19.4	—	—
	T-47D	2	5.8	2.6	44.8		—
Melanoma	FEMX-I	5	6.3	3.6	57.1	—	—
	LOX-IMVI	5	5.2	1.3	25.0	—	—
	MDA-MB-435	5	5.3	2.4	45.3	—	—
	MeWo	5	4.5	2.9	64.4	—	—
	MV3	2	4.6	1.5	32.6	—	—
Neuroblastoma	LA-N-1	7	6.5	6.5	100.0	—	—
	LS	4	8.3	7	84.3	+	—
Osteosarcoma	U2OS	3	12.4	3.5	28.2	—	—
	HOS	4	8.1	3.9	48.1	—	—
Pancreas Carcinoma	PaCa 5072	4	8.9	2.8	31.5	+	—
	PaCa 5061	4	13.9	3.5	25.2	+	—
	BxPC-3	5	29.9	6.3	21.1	—	—
	PANC-1	5	12	4	33.3	—	—
Prostate Carcinoma	DU145	4	7	1.9	27.1		—
	LNCaP	4	9.9	1.9	19.2	—	—
	LuCaP 23.1	3	9.3	2.7	29.0		—
	PC-3	3	9.8	2	20.4	—	—
	VCaP	3	13.1	1.2	9.2		—

2.4. TXNIP Expression in Tumor Infiltrating Leukocytes

We further evaluated TXNIP expression in peri- and intratumoral leukocytes as TXNIP might play a role in immune cell activation [19]. We immunohistochemically detected leukocytes by their CD45 surface expression. As the antibody used to detect human TXNIP cross-reacted with murine TXNIP, infiltrating murine CD45+ leukocytes were TXNIP positive as well, thereby serving as an internal positive control. Among the different xenograft tumors, the numbers of tumor infiltrating CD45+ leukocytes differed between 4.5% in MeWo melanoma xenograft tumors and 29.9% in BxPC-3 pancreatic cancer tumors with pancreatic cancer also being the entity with the highest leukocyte infiltration (Table 2). While the (human) tumor cells lacked any TXNIP expression, murine TXNIP expression was absent in intra- and peri-tumoral leukocytes but became gradually positive in leukocytes residing in the outer margins of the surrounding connective tissues (Figures 4–6).

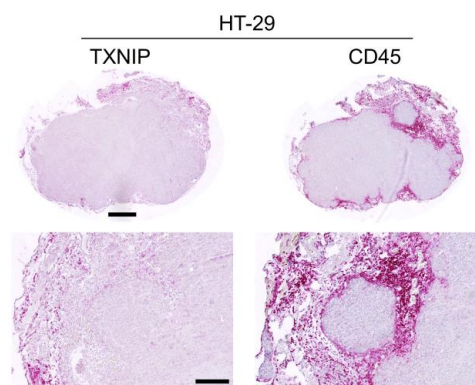


Figure 4. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) and CD45 immunostaining results in a HT-29 mouse xenograft tumor. Scale bar (upper panel) = 500 μ m, scale bar (lower panel) = 200 μ m.

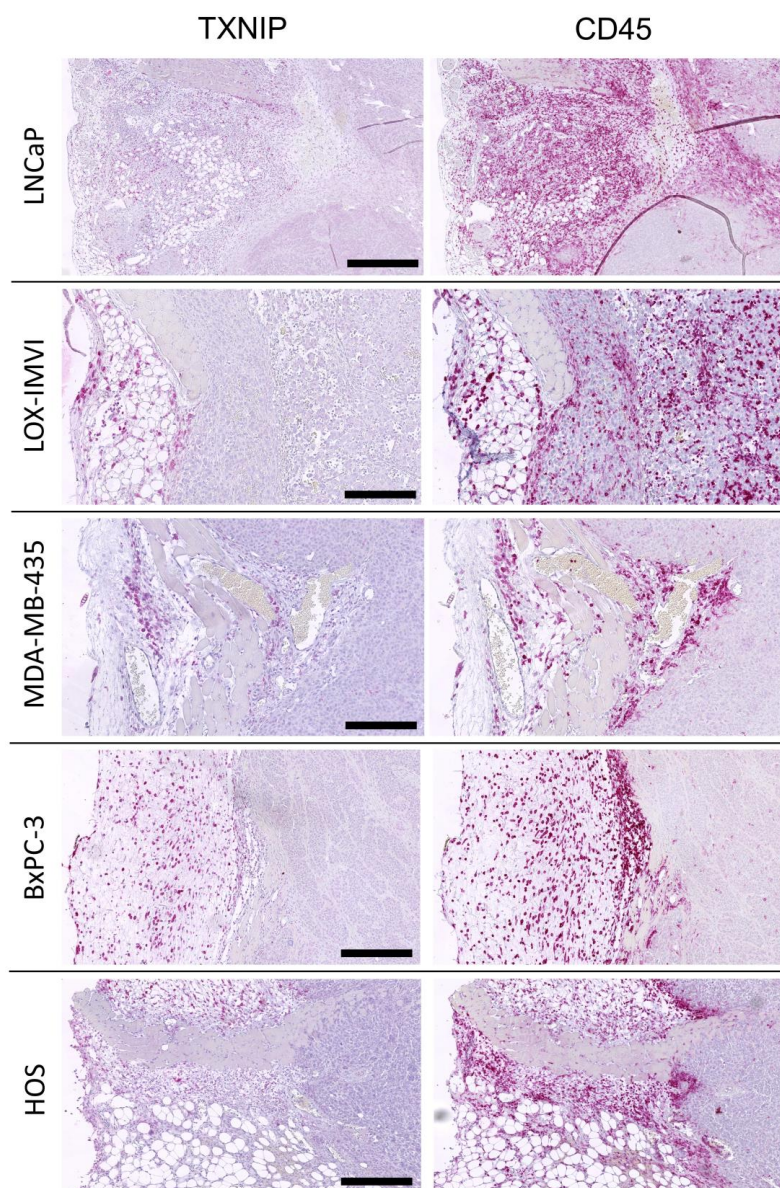


Figure 5. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) and CD45 immunostaining results in mouse xenograft tumors derived from different tumor cell lines. Scale bar: LNCaP = 1000 μ m, LOX-IMVI = 200 μ m, MDA-MB-435 = 200 μ m, BxPC-3 = 500 μ m, HOS = 200 μ m.

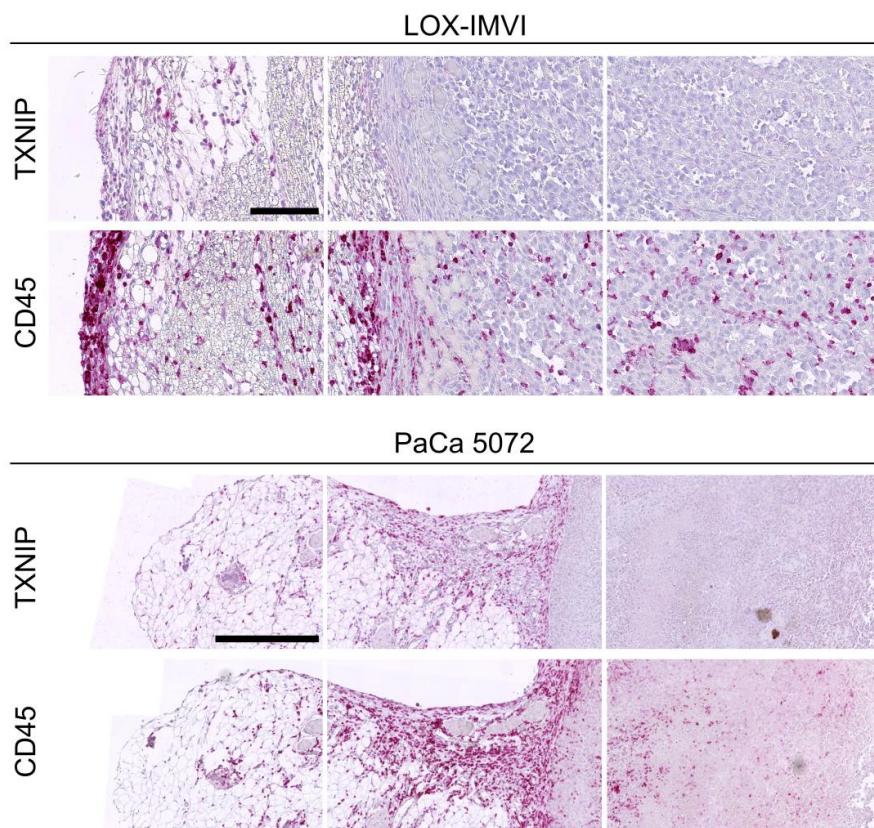


Figure 6. Downregulation of thioredoxin interacting protein (TXNIP) in intra- and peri-tumoral leukocytes. Scale bar: LOX-IMVI = 100 μ m, PaCa 5072 = 500 μ m.

Leukocyte infiltration was also assessed in the patient-derived tumor samples of the TMA. The percentage of tumor samples with TXNIP positive versus negative leukocytes in the connective tissues was assessed (Table 1). The results vary between 80% in prostate adenocarcinoma samples and 0% in tumors of the adrenal gland. The informative value, however, might be limited, because, due to the production process of the TMA, the proportion of connective tissues per spot was only small.

3. Discussion

TXNIP serves in different cellular functions, especially in glucose metabolism and redox homeostasis [9,11,25,26], and had initially been implicated to play an important pathophysiological role in various diseases including diabetes, inflammation, and arteriosclerosis [21,27]. However, in recent years, TXNIP gained attention in tumor biology as well as the redox state of a cell critically affects induction of apoptotic pathways [9,11]. TXNIP was suggested to act as a tumor suppressor protein and was found to be downregulated in several cancers [16,28–30]. So far, almost all investigations on the role of TXNIP in cancer, whether in clinical human tumor tissues or in human cancer cell lines, were focused on quantification of mRNA and not on TXNIP protein expression (reviewed by Zhou et al.) [31]. The lack of actual protein expression data is critical for the interpretation of the functional role of TXNIP in tissues as Yan et al. found TXNIP protein to be downregulated by miRNA373 in the human breast cancer cell line MCF7. Importantly, this effect was mediated through translational inhibition while mRNA levels of TXNIP were not affected [32]. Similar results have been obtained by Elgort et al., demonstrating that TXNIP downregulation is important in cell cycle progression and that TXNIP protein level is reduced prior to mRNA level during the early G1 phase [33]. These findings imply that mRNA quantification may underrate the importance of TXNIP downregulation in cancer progression and gives a rationale for studying TXNIP expression at the protein level.

Several studies concluded, based on experiments between TXNIP proficient and deficient cell line pairs, that TXNIP is a tumor suppressor (supporting evidence summarized in Table S1). As TXNIP protein is downregulated or lost in a high proportion of tumors across all entities and subtypes, our results are at least supportive of this possibility. Our findings are further corroborated by *in silico* analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) gene expression profiles across tumor samples and paired normal tissues from 31 tumor entities. In 16 out of 28 tumors TXNIP expression levels were significantly reduced compared to normal tissue and in the remaining 12 tumors a consistent tendency was evident (Figures S1 and S2). In our study, however, the remaining TXNIP-positive tumors showed marked heterogeneity in TXNIP expression levels ranging from low over medium to high. This pattern, for example, was found in renal cell carcinoma, thyroid cancer, breast cancer, and ductal pancreatic cancer. Therefore, further investigations on TXNIP expression on the tissue protein level may be useful to determine whether TXNIP can constitute different subsets of patients and might be a prognostic marker and to further delineate its role as a possible tumor suppressor.

Further, TXNIP is an endogenous inhibitor of TRX activity and expression. The TRX/TXNIP system (sometimes referred to as 'redoxosome') is an indispensable modulator of cellular redox state and ROS signaling. TRX and TXNIP exhibit reciprocal expression patterns, which not only holds true in the context of ROS production but also for several other biological events, such as apoptosis, inflammation, or neurodegeneration (reviewed by Yoshihara et al. [34]). Therefore, it is interesting to note that, in contrast to TXNIP, TRX is upregulated in various cancers [35]. An increase in TRX and decrease in TXNIP expression might be the two sides of the same medal, which was demonstrated in cell lines [8], as well as in clinical samples of gastric and colorectal cancer patients [29,36].

Pharmacological regulation of the TRX/TXNIP system might be an effective therapeutic approach. There is clear evidence that inhibition of TRX and/or TrxR exhibit anti-tumor activity *in vitro* and *in vivo* [3]. Inhibitors, such as auranofin or PX-12, exhibit anticancer activity in animal models and are approved for clinical cancer trials (NCT01737502, NCT03456700, NCT00736372, NCT00417287). For TXNIP, on the other side, expression inducing substances such as D-Allose or the HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid hydroxamic are promising candidates [3].

TXNIP has emerged as a key negative regulator of cellular glucose uptake [7,25,26,37] and many tumors rely on glucose fermentation instead of mitochondrial oxidative phosphorylation (also known as aerobic glycolysis or the 'Warburg effect'). This switch in cancer cell metabolism fuels new biosynthesis by increasing the availability of metabolites from glycolysis, which in turn promotes malignant growth (reviewed by Heiden et al. [38]). Thus, downregulation of TXNIP would confer a transformative advantage in cancer progression. The Warburg effect especially holds true for cancer cells grown *in vitro*, which might explain absent TXNIP expression in almost all tumor cell lines and all xenograft tumors. Intriguingly, glucose uptake is also a limiting factor in T Cell activation. Levrting et al. found that naïve T cells express high levels of TXNIP and that tumor necrosis factor (TNF) induces a rapid downregulation of TXNIP with increased glucose uptake in T cells [19]. Immune modulatory functions of TXNIP might control immune recognition and elimination of tumor cells. In our study, TXNIP was specifically absent in intra-tumoral and directly peritumoral leukocytes, while more distant leukocytes remained TXNIP-positive. As the xenograft tumors were grown in immunodeficient mice, which lack functional T- and B- lymphocytes, the only remaining lymphocytes in these mice are NK-cells. Brodbeck et al. demonstrated, that additional knock-out of NK-cell function in mice impedes primary tumor growth much less than the growth of distant metastases [39]. This finding could be in part explained by the fact that NK-cell activity in primary human xenograft tumors could be so much down-regulated by TXNIP, that they are functionally inactive. Thus, TXNIP might display immune activation in a tumor site and may aid in predicting response to modern immune therapy.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Lines and Cell Culture

The human small cell lung cancer cell lines H69AR1, H69AR3, NCI-H69 and SW2, human colon carcinoma cell lines HT-29 and HCT 116, human breast cancer cell lines DU4475, MCF-7 and MDA-MB-231, human melanoma cell lines FEMX-1, LOX-IMVI, MeWo, and MV3, human neuroblastoma cell lines LA-N-1 and LS, human Osteosarcoma cell lines HOS/Kelly and HOS/SK-N-SH, human pancreas cell lines PaCa 5072, PaCa 5061, BxPC-3, and PANC-1, human prostate cancer cell lines LNCap and PC-3 were analyzed. All cell lines were grown in Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium (GibcoTM, Waltham, MA, USA). For all cell lines, media were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 2mM L-Glutamine, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (GibcoTM, Waltham, MA, USA). The cells grow adherently except H60AR-1 and DU4475, which were cultured in suspension. All cells were maintained in a humidified atmosphere of 95% air plus 5% CO₂ at 37 °C.

4.2. Mouse Xenograft Tumors of Human Cancer Cell Lines

The xenografted primary human tumors grown in immunodeficient scid mice were retrieved from the files of the Institute of Anatomy and Experimental Morphology from previous experiments. Small cell lung cancer: H69AR, NCI-H69, NCI-H82, and SW2 [40]; colon cancer: HT-29 and SW2 [41,42]; breast cancer: DU4475, MCF-7, MDA-MB-231, and T-47D [41,43,44]; melanoma: FEMX-1, LOX-IMVI, MDA-MB-435, MeWo, and MV3 [43,45]; neuroblastoma: LA-N-1 and LS [46]; osteosarcoma: HOS and U2OS; pancreatic cancer: PaCa5072, PaCa5061, BxPC-3, and PANC-1 [47]; prostate cancer: DU145, LNCaP, LuCaP 23.1, PC-3, and VCaP [48].

4.3. Multi-Tumor Tissue Microarray (TMA)

For the production of TMAs, tissue cylinders with a diameter of 0.6 mm were punched from representative tumor or normal areas of each tissue block and brought into a recipient paraffin block. All tumor samples were obtained from the archives of the Institute of Pathology of the University Medical Center Hamburg Eppendorf. The use of archived diagnostic left-over tissues for the manufacturing of TMAs and their analysis for research purposes has been approved by local laws (HmbKHG, §12,1) and by the local ethics committee (Ethics commission Hamburg, WF-049/09). All work has been carried out in compliance with the Helsinki Declaration. Freshly cut TMA sections were immunostained on one day and in one experiment (see below).

4.4. Fixation, Embedding and Sectioning of Cancer Cells and Xenograft Tumors

Preparation of cancer cells as formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples was carried out as previously described [49]. Briefly, cancer cells were collected from culture flasks, fixed in formalin and then embedded into agar pellets. Agar pellets and formalin-fixed xenograft tumors were then subjected to standardized tissue infiltration using a Leica TP1020 tissue processor (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Subsequent paraffin embedding was performed using a Leica EG1160 Paraffin Embedding Center (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). FFPE samples were sectioned with a thickness of 4 µm, mounted on HistoBond® glass slides (Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) and allowed to air-dry, followed by drying in an incubator at 37 °C overnight.

4.5. Immunohistochemistry (IHC)

FFPE sections were de-paraffinized in two changes of xylene (5 min each) and rehydrated in a series of graded ethanol (100, 96, 70 and 50% for 5 min each). Sections were then washed in distilled water for 2 min. In case of CD45, tumor sections were heated twice in a 1:10 dilution of epitope retrieval solution (#S1699, Dako, Carpinteria, CA, USA) in a microwave oven (#YC-MG02U-S, Sharp) with 800W for 4 min each. In case of TXNIP, slides were heated in a steamer (#S2800, DakoCytomation Pascal,

Carpinteria, CA, USA) at 100 °C for 20 min in epitope retrieval solution (#S1699, Dako, Carpinteria, CA, USA). After cooling-down, sections were rinsed for 5 min each with Tris-buffered saline/0.1% Tween20 (TBS-T) and TBS (pH 7.6), respectively. The following incubation steps were carried out in a moist chamber. Sections were incubated either with primary rat anti-CD45 antibody (#550539, BD PharMingen, CA, USA) diluted 1:25 in antibody diluent (#S0809, Dako Carpinteria, CA, USA) or primary rabbit anti-TXNIP polyclonal antibody (#LS-B5829, LSBio, Seattle, WA, USA) diluted 1:200 in antibody diluent for 60 min each at room temperature (RT). For isotype control rat IgG2b antibody (#400622, BioLegend, San Diego, CA, USA; diluted 1:400) or rabbit IgG antibody (#ab37415, abcam, Berlin, Germany; diluted 1:1,000) were used. After incubation, slides were rinsed twice with TBS-T as well as with TBS for 5 min each. Subsequently, slides were incubated with secondary biotin-conjugated rabbit anti-rat antibody (#312-065-048, Jackson Immuno Research Europe Ltd., Ely, Cambridgeshire, United Kingdom) or swine anti-rabbit antibody (#E0353, Dako, Carpinteria, CA, USA) at a dilution of 1:100 or 1:200, respectively, in TBS for 30 min at RT, followed by rinsing twice with TBS-T and once with TBS for 5 min each. Next, sections were treated with Vectastain® ABC-AP Kit (#AK5000, Linaris, Drossenheim, Germany) according to the manufacturer's recommendations for 30 min at RT and again washed in TBS-T and TBS as described above. Finally, alkaline phosphatase enzyme activity was visualized by incubating the sections with Permanent Red solution (#ZUC001-125, Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany) for 20 min and counterstained with hematoxylin for 4 seconds, with intermediate washes under running tap water (3 min) and in aqua dest (2 min). Slides were dehydrated in a series of graded ethanol (70% for 15 sec, 96 and 100% for 5 min each) and three changes of xylene (5 min each) and finally covered with Eukitt® Mounting Medium (#03989, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) and coverslips.

4.6. Microscopy and Image Analysis

IHC processed sections were first evaluated using a ZEISS Axiophot 2 microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). Digital images were obtained with a ZEISS Axio Scan Z1 slide scanner equipped with a ZEISS EC Plan-Neofluar 20 × /0.50 Pol M27 objective (Carl Zeiss, Jena, Germany) and a Hitachi HV-F20SCL camera with 1600 × 1200 pixels (Hitachi Kokusai Electric America Ltd., New York, NY, USA). For image acquisition ZEISS ZEN 2.3 software was used (Carl Zeiss, Jena, Germany). Images were further processed with netScope Viewer software (Net-Base Software, Freiburg, Germany). Image analysis of xenograft tumor sections was carried out using Fiji, an open source image processing package from ImageJ (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2018), to determine the percentage of immunocompetent cells in the following localizations: adipose tissue, tumor capsule connective tissue, intratumoral connective tissue septae and immune cells in the tumor. The area of the specific tissue was measured followed by the measurement of the area of positive cells within the tissue. Positive cells were selected with contrast threshold adjustment as follows: Hue: 196/255, Saturation: 99/255, Brightness: 0/200. Proportions of CD45-positive cells in relation to TXNIP-positive cells were calculated and are stated in percent.

TXNIP staining was observed in the cytoplasm and the staining intensity was assessed on a four-step scale from negative, weak, moderate to strong expression. Further analysis included dichotomization of staining intensities (negative to weak = 'low', moderate to strong = 'high').

5. Conclusions

In conclusion, this study suggests that TXNIP downregulation is as a common feature in human tumor xenograft models and provides new insights into TXNIP expression on the protein level in various tumor entities. Further, TXNIP might display immune activation in a tumor site and may aid in predicting response to modern immune therapy.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/10/3028/s1>, Figure S1: Thioredoxin interacting protein (TXNIP) gene expression profiles across tumor samples and paired normal tissues (matched TCGA normal and GTEx data), Figure S2: Boxplot diagrams of thioredoxin interacting

protein (TXNIP) mRNA expression levels of tumor samples and paired normal tissues (matched TCGA normal and GTEx data), Figure S3: The TRX/TXNIP system, Figure S4: Thioredoxin interacting protein (TXNIP) is involved in tumorigenesis and cancer progression, Table S1: Experiments investigating the consequences of altered thioredoxin interacting protein (TXNIP) expression in cancer models.

Author Contributions: Conceived and designed the experiments: J.S. and U.S. Performed the experiments: J.S. Analyzed the data: J.S. Wrote the paper: J.S. Aided in conception, data analysis and writing the paper: L.C.B. Revised the manuscript: L.C.B., U.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We sincerely thank Guido Sauter and Priv.-Doz. Ronald Simon (Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany) for providing TMA samples. We would like to thank T. Gosau, C. Knies, and J. Schröder-Schwarz for excellent technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hayes, J.D.; Dinkova-Kostova, A.T.; Tew, K.D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* **2020**, *38*, 167–197. [\[CrossRef\]](#)
- Cao, X.; He, W.; Pang, Y.; Cao, Y.; Qin, A. Redox-dependent and independent effects of thioredoxin interacting protein. *Biol. Chem.* **2020**, *1*. [\[CrossRef\]](#)
- Jia, J.-J.; Geng, W.-S.; Wang, Z.-Q.; Chen, L.; Zeng, X.-S. The role of thioredoxin system in cancer: Strategy for cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2019**, *84*, 453–470. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, K.-S.; DeLuca, H.F. Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* **1994**, *1219*, 26–32. [\[CrossRef\]](#)
- Ludwig, D.L.; Kotanides, H.; Le, T.; Chavkin, D.; Bohlen, P.; Witte, L. Cloning, genetic characterization, and chromosomal mapping of the mouse VDUP1 gene. *Gene* **2001**, *269*, 103–112. [\[CrossRef\]](#)
- Patwari, P.; Higgins, L.J.; Chutkow, W.A.; Yoshioka, J.; Lee, R.T. The Interaction of Thioredoxin with Txnip EVIDENCE FOR FORMATION OF A MIXED DISULFIDE BY DISULFIDE EXCHANGE. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 21884–21891. [\[CrossRef\]](#)
- Patwari, P.; Chutkow, W.A.; Cummings, K.; Verstraeten, V.L.R.M.; Lammerding, J.; Schreiter, E.R.; Lee, R.T. Thioredoxin-independent Regulation of Metabolism by the α -Arrestin Proteins. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 24996–25003. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nishiyama, A.; Matsui, M.; Iwata, S.; Hirota, K.; Masutani, H.; Nakamura, H.; Takagi, Y.; Sono, H.; Gon, Y.; Yodoi, J. Identification of Thioredoxin-binding Protein-2/Vitamin D3 Up-regulated Protein 1 as a Negative Regulator of Thioredoxin Function and Expression. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21645–21650. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Junn, E.; Han, S.H.; Im, J.Y.; Yang, Y.; Cho, E.W.; Um, H.D.; Kim, D.K.; Lee, K.W.; Han, P.L.; Rhee, S.G.; et al. Vitamin D3 Up-Regulated Protein 1 Mediates Oxidative Stress Via Suppressing the Thioredoxin Function. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 6287–6295. [\[CrossRef\]](#)
- Han, S.H.; Jeon, J.H.; Ju, H.R.; Jung, U.; Kim, K.Y.; Yoo, H.S.; Lee, Y.H.; Song, K.S.; Hwang, H.M.; Na, Y.S.; et al. VDUP1 upregulated by TGF- β 1 and 1,25-dihydroxyvitamin D 3 inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression. *Oncogene* **2003**, *22*, 4035–4046. [\[CrossRef\]](#)
- Tobiome, K.; Matsuzawa, A.; Takahashi, T.; Nishitoh, H.; Morita, K.; Takeda, K.; Minowa, O.; Miyazono, K.; Noda, T.; Ichijo, H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* **2001**, *2*, 222–228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Saxena, G.; Chen, J.; Shalev, A. Intracellular Shuttling and Mitochondrial Function of Thioredoxin-interacting Protein. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 3997–4005. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jung, H.; Kim, M.J.; Kim, D.O.; Kim, W.S.; Yoon, S.-J.; Park, Y.-J.; Yoon, S.R.; Kim, T.-D.; Suh, H.-W.; Yun, S.; et al. TXNIP Maintains the Hematopoietic Cell Pool by Switching the Function of p53 under Oxidative Stress. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 75–85. [\[CrossRef\]](#)
- Kwon, H.-J.; Won, Y.-S.; Suh, H.-W.; Jeon, J.-H.; Shao, Y.; Yoon, S.-R.; Chung, J.-W.; Kim, T.-D.; Kim, H.-M.; Nam, K.-H.; et al. Vitamin D3 Upregulated Protein 1 Suppresses TNF- α -Induced NF- κ B Activation in Hepatocarcinogenesis. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 3980–3989. [\[CrossRef\]](#)
- Yamaguchi, F.; Takata, M.; Kamitori, K.; Nonaka, M.; Dong, Y.; Sui, L.; Tokuda, M. Rare sugar D-allose induces specific up-regulation of TXNIP and subsequent G1 cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells by stabilization of p27kip1. *Int. J. Oncol.* **2008**, *32*, 377–385. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

16. Nishizawa, K.; Nishiyama, H.; Matsui, Y.; Kobayashi, T.; Saito, R.; Kotani, H.; Masutani, H.; Oishi, S.; Toda, Y.; Fujii, N.; et al. Thioredoxin-interacting protein suppresses bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 1459–1466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ungerstedt, J.S.; Sowa, Y.; Xu, W.-S.; Shao, Y.; Dokmanovic, M.; Perez, G.; Ngo, L.; Holmgren, A.; Jiang, X.; Marks, P.A. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 673–678. [[CrossRef](#)]
18. Lee, K.N.; Kang, H.-S.; Jeon, J.-H.; Kim, E.-M.; Yoon, S.-R.; Song, H.; Lyu, C.-Y.; Piao, Z.-H.; Kim, S.-U.; Han, Y.-H.; et al. VDUP1 Is Required for the Development of Natural Killer Cells. *Immunity* **2005**, *22*, 195–208. [[CrossRef](#)]
19. Levring, T.B.; Kongsbak-Wismann, M.; Rode, A.K.O.; Al-Jaberi, F.A.H.; Lopez, D.V.; Met, Ö.; Woetmann, A.; Bonefeld, C.M.; Ødum, N.; Geisler, C. Tumor necrosis factor induces rapid down-regulation of TXNIP in human T cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 16725. [[CrossRef](#)]
20. Zhou, R.; Tardivel, A.; Thorens, B.; Choi, I.; Tschopp, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 136–140. [[CrossRef](#)]
21. Szpigiel, A.; Hainault, I.; Carlier, A.; Venteclef, N.; Batto, A.-F.; Hajdich, E.; Bernard, C.; Ktorza, A.; Gautier, J.-F.; Ferré, P.; et al. Lipid environment induces ER stress, TXNIP expression and inflammation in immune cells of individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia* **2018**, *61*, 399–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kim, S.-K.; Choe, J.-Y.; Park, K.-Y. TXNIP-mediated nuclear factor- κ B signaling pathway and intracellular shifting of TXNIP in uric acid-induced NLRP3 inflammasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *511*, 725–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhou, J.; Chng, W.-J. Roles of thioredoxin binding protein (TXNIP) in oxidative stress, apoptosis and cancer. *Mitochondrion* **2013**, *13*, 163–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sherman, S.I.; Angelos, P.; Ball, D.W.; Byrd, D.; Clark, O.H.; Daniels, G.H.; Dilawari, R.A.; Ehya, H.; Farrar, W.B.; Gagel, R.F.; et al. Thyroid carcinoma. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **2007**, *5*, 568–621. [[CrossRef](#)]
25. Chutkow, W.A.; Patwari, P.; Yoshioka, J.; Lee, R.T. Thioredoxin-interacting Protein (Txnip) Is a Critical Regulator of Hepatic Glucose Production. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 2397–2406. [[CrossRef](#)]
26. Parikh, H.; Carlsson, E.; Chutkow, W.A.; Johansson, L.E.; Storgaard, H.; Poulsen, P.; Saxena, R.; Ladd, C.; Schulze, P.C.; Mazzini, M.J.; et al. TXNIP Regulates Peripheral Glucose Metabolism in Humans. *PLOS Med.* **2007**, *4*, e158. [[CrossRef](#)]
27. Zhang, Y.; Huang, J.; Yang, X.; Sun, X.; Xu, Q.; Wang, B.; Zhong, P.; Wei, Z. Altered Expression of TXNIP in the peripheral leukocytes of patients with coronary atherosclerotic heart disease. *Medicine* **2017**, *96*. [[CrossRef](#)]
28. Gao, Y.; Qi, J.-C.; Li, X.; Sun, J.-P.; Ji, H.; Li, Q.-H. Decreased expression of TXNIP predicts poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol. Lett.* **2020**, *19*, 763–770. [[CrossRef](#)]
29. Lim, J.Y.; Yoon, S.O.; Hong, S.W.; Kim, J.W.; Choi, S.H.; Cho, J.Y. Thioredoxin and thioredoxin-interacting protein as prognostic markers for gastric cancer recurrence. *World J. Gastroenterol. WJG* **2012**, *18*, 5581–5588. [[CrossRef](#)]
30. Cadenas, C.; Franckenstein, D.; Schmidt, M.; Gehrman, M.; Hermes, M.; Geppert, B.; Schormann, W.; Maccoux, L.J.; Schug, M.; Schumann, A.; et al. Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2010**, *12*, R44. [[CrossRef](#)]
31. Zhou, J.; Yu, Q.; Chng, W.-J. TXNIP (VDUP-1, TBP-2): A major redox regulator commonly suppressed in cancer by epigenetic mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43*, 1668–1673. [[CrossRef](#)]
32. Yan, G.-R.; Xu, S.-H.; Tan, Z.-L.; Liu, L.; He, Q.-Y. Global identification of miR-373-regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics. *PROTEOMICS* **2011**, *11*, 912–920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Elgort, M.G.; O'Shea, J.M.; Jiang, Y.; Ayer, D.E. Transcriptional and Translational Downregulation of Thioredoxin Interacting Protein Is Required for Metabolic Reprogramming during G1. *Genes Cancer* **2010**, *1*, 893–907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yoshihara, E.; Masaki, S.; Matsuo, Y.; Chen, Z.; Tian, H.; Yodoi, J. Thioredoxin/Txnip: Redoxosome, as a Redox Switch for the Pathogenesis of Diseases. *Front. Immunol.* **2014**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lincoln, D.T.; Ali Emadi, E.M.; Tonissen, K.F.; Clarke, F.M. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: Over-expression in human cancer. *Anticancer Res.* **2003**, *23*, 2425–2433.

36. Lin, F.; Zhang, P.; Zuo, Z.; Wang, F.; Bi, R.; Shang, W.; Wu, A.; Ye, J.; Li, S.; Sun, X.; et al. Thioredoxin-1 promotes colorectal cancer invasion and metastasis through crosstalk with S100P. *Cancer Lett.* **2017**, *401*, 1–10. [[CrossRef](#)]
37. Yoshioka, J.; Imahashi, K.; Gabel, S.A.; Chutkow, W.A.; Burds, A.A.; Gannon, J.; Schulze, P.C.; MacGillivray, C.; London, R.E.; Murphy, E. Targeted Deletion of Thioredoxin-Interacting Protein Regulates Cardiac Dysfunction in Response to Pressure Overload. *Circ. Res.* **2007**, *101*, 1328–1338. [[CrossRef](#)]
38. Heiden, M.G.V.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029–1033. [[CrossRef](#)]
39. Brodbeck, T.; Nehmann, N.; Bethge, A.; Wedemann, G.; Schumacher, U. Perforin-dependent direct cytotoxicity in natural killer cells induces considerable knockdown of spontaneous lung metastases and computer modelling-proven tumor cell dormancy in a HT29 human colon cancer xenograft mouse model. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 244. [[CrossRef](#)]
40. Sodeur, S.; Ullrich, S.; Gustke, H.; Zangemeister-Wittke, U.; Schumacher, U. Increased numbers of spontaneous SCLC metastasis in absence of NK cells after subcutaneous inoculation of different SCLC cell lines into pfp/rag2 double knock out mice. *Cancer Lett.* **2009**, *282*, 146–151. [[CrossRef](#)]
41. Schumacher, U.; Adam, E. Lectin histochemical HPA-binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in severe combined immunodeficient mice. *Histochem. J.* **1997**, *29*, 677–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ghulam, J.; Stuerken, C.; Wicklein, D.; Pries, R.; Wollenberg, B.; Schumacher, U. Immunohistochemical Analysis of Transcription Factors and Markers of Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) in Human Tumors. *Anticancer Res.* **2019**, *39*, 5437–5448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Valentiner, U.; Hall, D.M.S.; Brooks, S.A.; Schumacher, U. HPA binding and metastasis formation of human breast cancer cell lines transplanted into severe combined immunodeficient (scid) mice. *Cancer Lett.* **2005**, *219*, 233–242. [[CrossRef](#)]
44. Schröder, C.; Schumacher, U.; Müller, V.; Wirtz, R.M.; Streichert, T.; Richter, U.; Wicklein, D.; Milde-Langosch, K. The transcription factor Fra-2 promotes mammary tumour progression by changing the adhesive properties of breast cancer cells. *Eur. J. Cancer* **2010**, *46*, 1650–1660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Thies, A.; Mauer, S.; Fodstad, O.; Schumacher, U. Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 609–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Valentiner, U.; Valentiner, F.-U.; Schumacher, U. Expression of CD44 Is Associated with a Metastatic Pattern of Human Neuroblastoma Cells in a SCID Mouse Xenograft Model. *Tumor Biol.* **2008**, *29*, 152–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Gebauer, F.; Wicklein, D.; Stübke, K.; Nehmann, N.; Schmidt, A.; Salamon, J.; Peldschus, K.; Nentwich, M.F.; Adam, G.; Tolstonog, G.; et al. Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp^{−−}/rag2^{−−} mice. *Gut* **2013**, *62*, 741–750. [[CrossRef](#)]
48. Lange, T.; Ullrich, S.; Müller, I.; Nentwich, M.F.; Stübke, K.; Feldhaus, S.; Knies, C.; Hellwinkel, O.J.C.; Vessella, R.L.; Abramjuk, C.; et al. Human Prostate Cancer in a Clinically Relevant Xenograft Mouse Model: Identification of $\beta(1,6)$ -Branched Oligosaccharides as a Marker of Tumor Progression. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 1364–1373. [[CrossRef](#)]
49. Böckelmann, L.; Starzonek, C.; Niehoff, A.-C.; Karst, U.; Thomale, J.; Schlüter, H.; Bokemeyer, C.; Aigner, A.; Schumacher, U. Detection of doxorubicin, cisplatin and therapeutic antibodies in formalin-fixed paraffin-embedded human cancer cells. *Histochem. Cell Biol.* **2020**. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) Is Differentially Expressed in Human Tumor Samples but Is Absent in Human Tumor Cell Line Xenografts: Implications for Its Use as an Immunosurveillance Marker

Joana Schröder, Udo Schumacher and Lukas Clemens Böckelmann

Table S1. Experiments investigating the consequences of altered thioredoxin interacting protein (TXNIP) expression in cancer models.

Methods	Model	Results	Reference
▪ TXNIP deficient mice and control strain	▪ Recombinant congenic strain HcB-19/Dem ▪ Parental control strain C3H/DiSnA	▪ TXNIP deficient mice had in increased incidence of HCC ▪ No tumor development in control strain ▪ Tumor incidence increased as mice aged ▪ Increased p53 and α-fetoprotein in TXNIP-deficient mice	[1]
▪ TXNIP KO mice and WT mice ▪ Ectopic overexpression <i>in vitro</i>	▪ C57B/6 knockout mice ▪ Human bladder cancer cell lines 253J, TCCSUP	▪ Bladder carcinogenesis was accelerated in TXNIP KO mice ◦ 100% after 8 weeks in KO mice ◦ 22% after 8 weeks in WT mice ◦ ERK activation	[2]
▪ TXNIP KO mice lung fibroblast cells and WT mice lung fibroblast cells	▪ C57B/6 knockout mice	▪ Overexpression in cell lines also led to ERK activation ▪ p27 is reduced in many tumors ▪ p27 expression was reduced in TXNIP^{-/-} cells (post-transcriptionally) ▪ overexpression of TXNIP restored the JAB1-induced p27 suppression ▪ TXNIP^{-/-} lung fibroblast cells in mice grew faster than their WT counterpart	[3]

- Overexpression in an <i>in vivo</i> orthotopic tumor model - Ectopic overexpression <i>in vitro</i>	- Athymic nude mice injected with T238 QCXIP and T238 cells - Human anaplastic thyroid cancer (ATC) cell lines TPC1, BCPAP, MDA-T41, K1 - Human differentiated thyroid cancer (DTC) cell lines HTh74, T238, C643, THJ11T, Ocut-2, 8505C	- TXNIP overexpression in orthotopic tumor model attenuates growth and reduced metastatic tumor burden - DTC cell lines have high endogenous TXNIP levels - ATC cell lines have low/absent TXNIP expression levels - TXNIP is lost in progression from well-differentiated to undifferentiated thyroid tumors - TXNIP overexpression in ATC cell line resulted in decreased growth	[4]
- TXNIP KO mice and WT mice - Ectopic overexpression <i>in vitro</i>	- C57B/6 knockout mice - Human gastric cancer cell line AGS	- Overall incidence of stomach tumors was higher in TXNIP KO mice compared to WT mice - TXNIP overexpression decreased growth of cell lines infected with <i>H. pylori</i> (increased apoptosis)	[5]
- Xenografts overexpressing TXNIP versus control vectors - Ectopic overexpression <i>in vitro</i>	- Athymic nude mice injected with NCI-Esc2 cells - Human esophageal adenocarcinoma cell lines (EACC) NCI-SB-Esc1, NCI-SB-Esc2, NCI-SB-Esc3, OE33, Flo-1	- Xenografts overexpressing TXNIP were significantly smaller than tumors derived from vector controls - Cancer cell lines (<i>in vitro</i>) - TXNIP overexpression inhibited proliferation in EACC (decreased soft agar colony formation)	[6]
TXNIP KO and WT mice hematopoietic cells	C57B/6 knockout mice	- ROS levels were elevated in TXNIP KO hematopoietic cells - increased apoptosis - TXNIP directly interacts with p53 (induction) - interaction is increased by oxidative stress	[7]
TXNIP knockdown <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	- Human breast cancer tumor samples - MMTV-Cre;Smad4^{f/f};Trp53^{f/f};Cdh1^{f/+} mice - Human breast cancer cell lines MCF7, T47D, MDA-MB-231	- TXNIP is downregulated in human breast cancers and animal mammary tumors on the protein level - especially in aggressive phenotypes - Degree of TXNIP expression is gradually decreased as tumors progressed from benign to malignant stages in animal mammary tumors - TXNIP downregulation enhanced growth of breast cancer cells and breast cancer xenografts - p27 is reduced	[8]
TXNIP KO mice and WT mice	C57B/6 knockout mice	- TXNIP KO mice are susceptible to chemically induced hepatocarcinogenesis - increased proliferation rate - loss of TXNIP results in increased TNF-α and NF-κB activation - TNF-α induced downregulation of TXNIP expression	[9]

▪ Fe-NTA-induced renal cell carcinoma	▪ Male Wistar rats	▪ TXNIP was one of the major target genes in renal carcinogenesis ◦ transcriptional silenced ◦ several mutations ▪ Loss of TXNIP was associated with renal tubular proliferation in vivo, irrespective of the molecular mechanisms involved (neoplastic or non-neoplastic)	[10]
▪ qRT-PCR measurement of mRNA	▪ Healthy controls, AML cell lines, and primary AML lines	▪ Repressed TXNIP expression in AML cell lines and primary AML cells	[11]

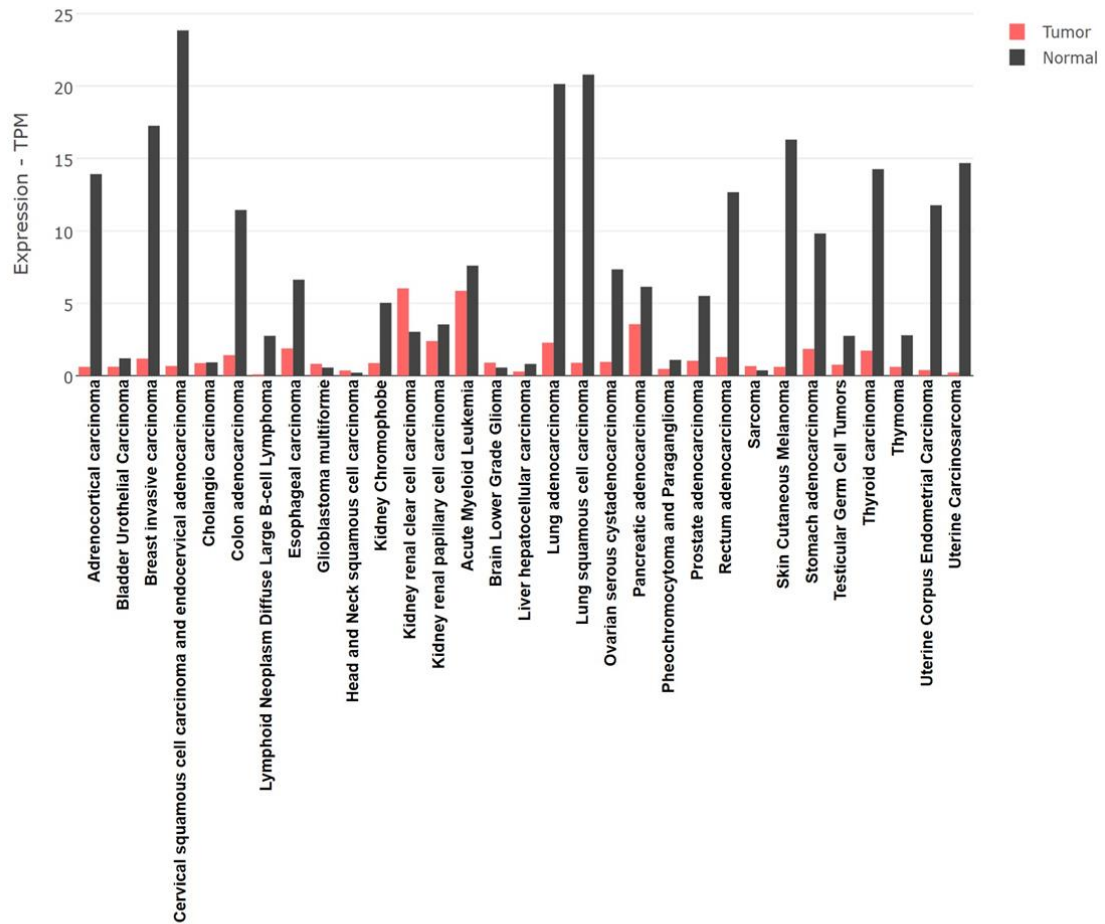
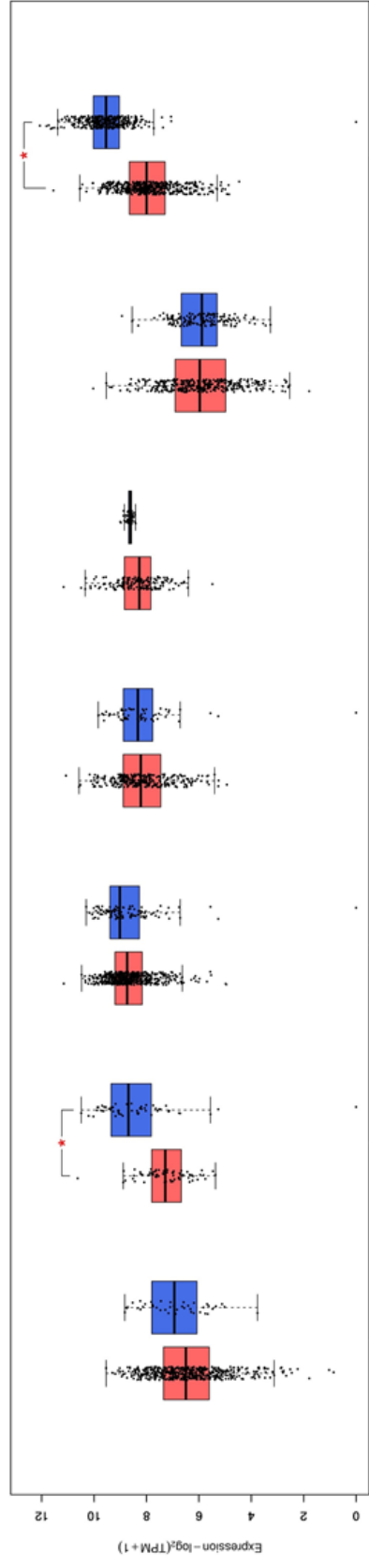
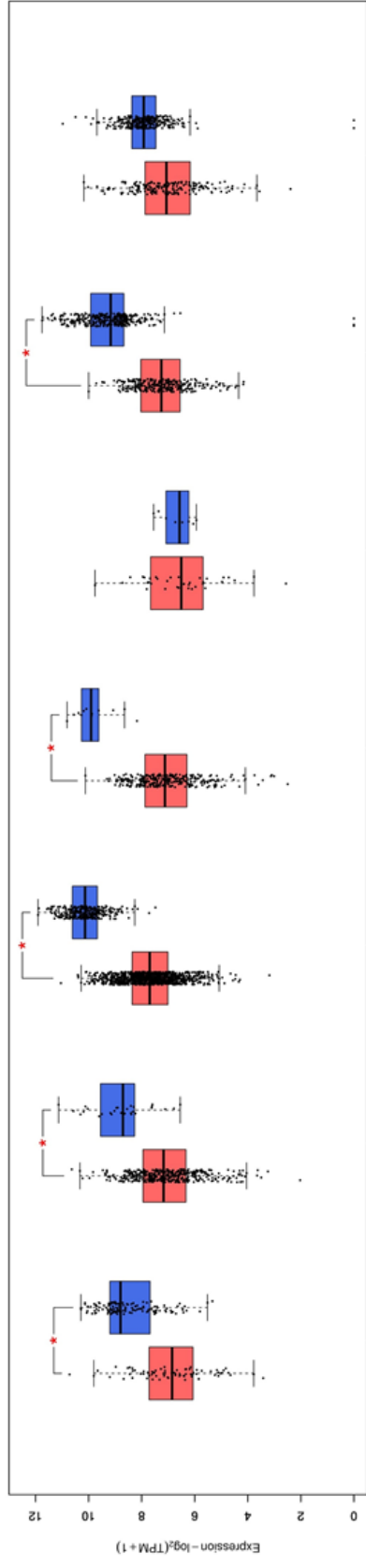


Figure S1. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) gene expression profiles across tumor samples and paired normal tissues (matched TCGA normal and GTEx data). Height of bar represents the median expression of certain tumor type or paired normal tissue. TPM = Transcripts Per Million. The Cancer Genome Atlas (TCGA) data were analyzed with Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 (GEPIA2) online tool [12].



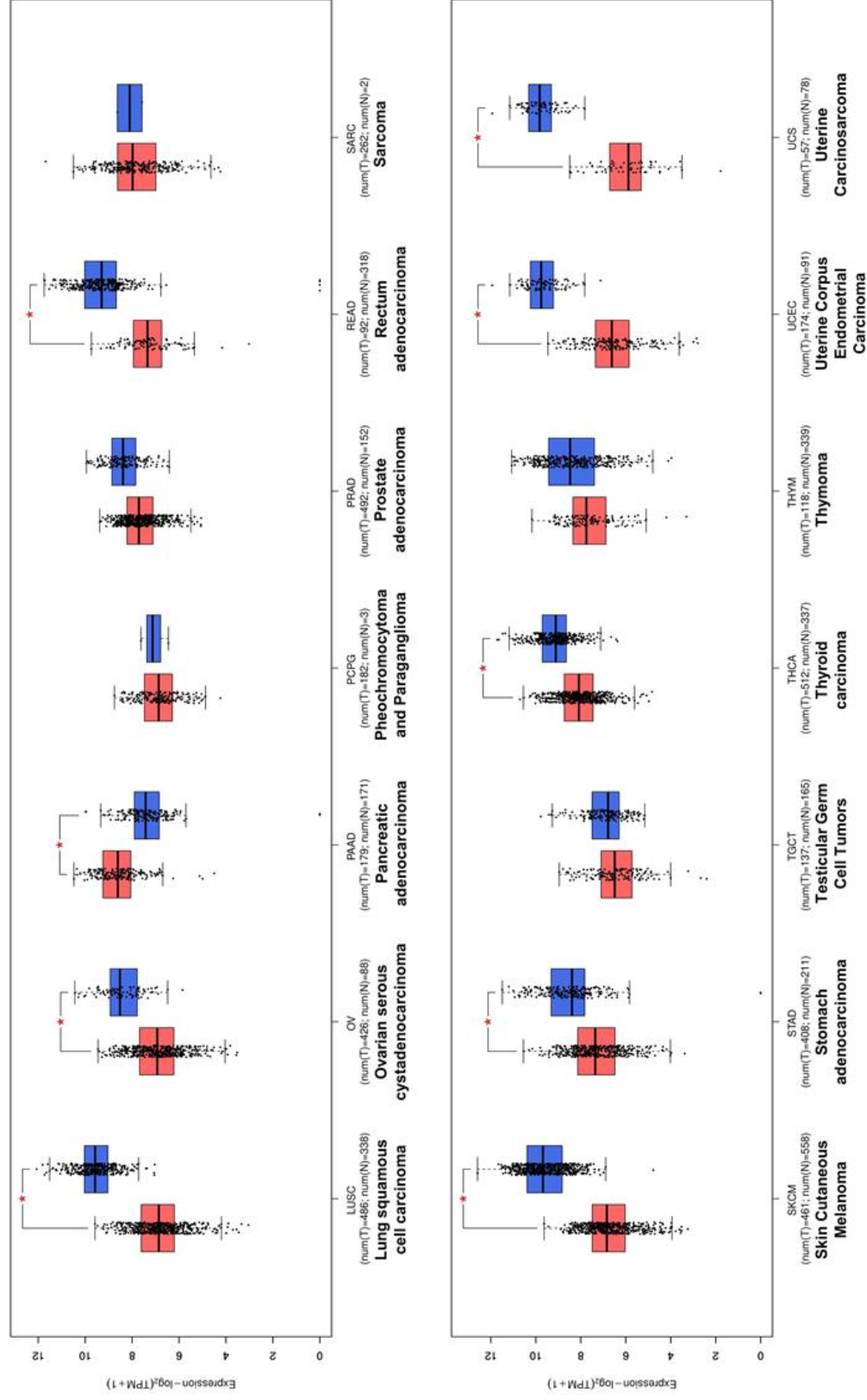


Figure S2. Boxplot diagrams of thioredoxin interacting protein (TXNIP) mRNA expression levels of tumor samples (red) and paired normal tissues (matched TCGA normal and GTEx data, blue). TPM = Transcripts Per Million. |Log₂FC| Cut-Off = 1. * p<0.01.

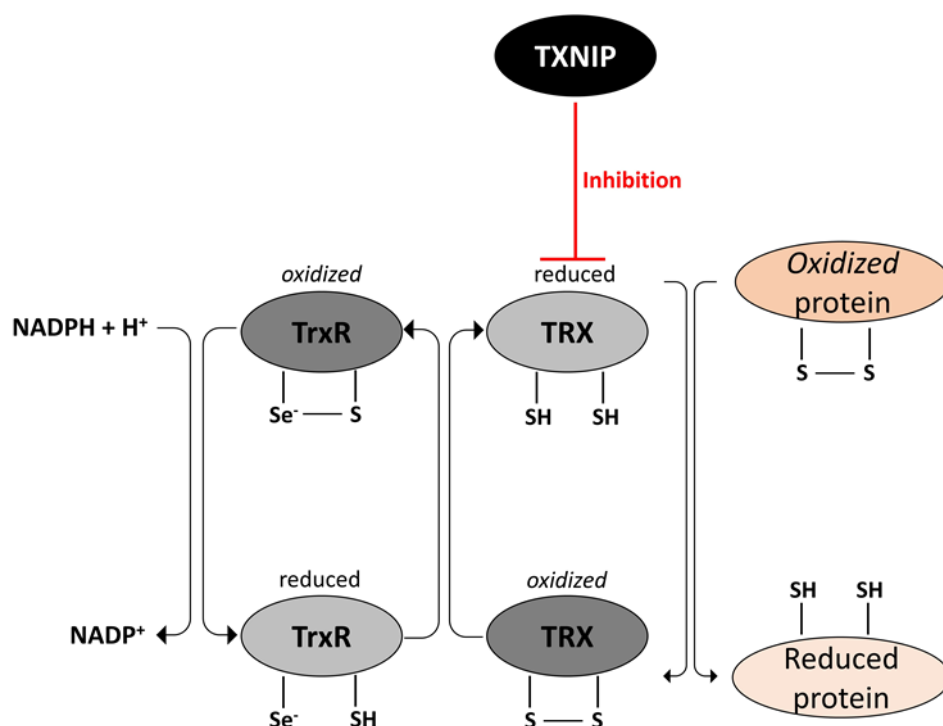


Figure S3. The TRX/TXNIP system. In its reduced form, oxidoreductase thioredoxin (TRX) catalyzes the reduction of oxidized cysteine residues and the cleavage of disulfide bonds of cellular proteins. TRX in turn is oxidized, and the reduced form is regenerated by TRX reductase (TrxR) via spending of NADPH. Thioredoxin interacting protein (TXNIP), the endogenous inhibitor of TRX activity, binds TRX only when it is in the reduced form.

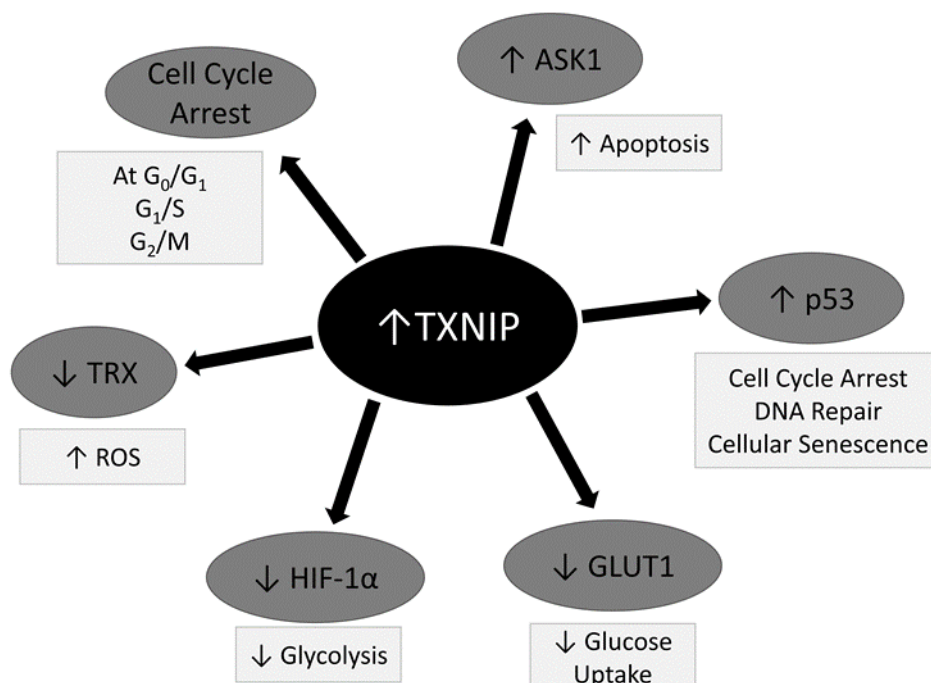


Figure S4. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) is involved in tumorigenesis and cancer progression.

References

1. Sheth, S.S.; Bodnar, J.S.; Ghazalpour, A.; Thippavong, C.K.; Tsutsumi, S.; Tward, A.D.; Demant, P.; Kodama, T.; Aburatani, H.; Lusis, A.J. Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice. *Oncogene* **2006**, *25*, 3528–3536, doi:10.1038/sj.onc.1209394.
2. Nishizawa, K.; Nishiyama, H.; Matsui, Y.; Kobayashi, T.; Saito, R.; Kotani, H.; Masutani, H.; Oishi, S.; Toda, Y.; Fujii, N.; et al. Thioredoxin-interacting protein suppresses bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 1459–1466, doi:10.1093/carcin/bgr137.
3. Jeon, J.-H.; Lee, K.-N.; Hwang, C.Y.; Kwon, K.-S.; You, K.-H.; Choi, I. Tumor Suppressor VDUP1 Increases p27kip1 Stability by Inhibiting JAB1. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 4485–4489, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2271.
4. Morrison, J.A.; Pike, L.A.; Sams, S.B.; Sharma, V.; Zhou, Q.; Severson, J.J.; Tan, A.-C.; Wood, W.M.; Haugen, B.R. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) is a novel tumor suppressor in thyroid cancer. *Mol. Cancer* **2014**, *13*, 62, doi:10.1186/1476-4598-13-62.
5. Kwon, H.-J.; Won, Y.-S.; Nam, K.-T.; Yoon, Y.-D.; Jee, H.; Yoon, W.-K.; Nam, K.-H.; Kang, J.-S.; Han, S.-U.; Choi, I.-P.; et al. Vitamin D3 upregulated protein 1 deficiency promotes N-methyl-N-nitrosourea and Helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis in mice. *Gut* **2012**, *61*, 53–63, doi:10.1136/gutjnl-2011-300361.
6. Feingold, P.L.; Surman, D.R.; Brown, K.; Xu, Y.; McDuffie, L.A.; Shukla, V.; Reardon, E.S.; Crooks, D.R.; Trepel, J.B.; Lee, S.; et al. Induction of Thioredoxin-Interacting Protein by a Histone Deacetylase Inhibitor, Entinostat, Is Associated with DNA Damage and Apoptosis in Esophageal Adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 2013–2023, doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-1240.
7. Jung, H.; Kim, M.J.; Kim, D.O.; Kim, W.S.; Yoon, S.-J.; Park, Y.-J.; Yoon, S.R.; Kim, T.-D.; Suh, H.-W.; Yun, S.; et al. TXNIP Maintains the Hematopoietic Cell Pool by Switching the Function of p53 under Oxidative Stress. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 75–85, doi:10.1016/j.cmet.2013.06.002.
8. Park, J.W.; Lee, S.H.; Woo, G.-H.; Kwon, H.-J.; Kim, D.-Y. Downregulation of TXNIP leads to high proliferative activity and estrogen-dependent cell growth in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *498*, 566–572, doi:10.1016/j.bbrc.2018.03.020.
9. Kwon, H.-J.; Won, Y.-S.; Suh, H.-W.; Jeon, J.-H.; Shao, Y.; Yoon, S.-R.; Chung, J.-W.; Kim, T.-D.; Kim, H.-M.; Nam, K.-H.; et al. Vitamin D3 Upregulated Protein 1 Suppresses TNF- α -Induced NF- κ B Activation in Hepatocarcinogenesis. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 3980–3989, doi:10.4049/jimmunol.1000990.
10. Dutta, K.K.; Nishinaka, Y.; Masutani, H.; Akatsuka, S.; Aung, T.T.; Shirase, T.; Lee, W.-H.; Yamada, Y.; Hiai, H.; Yodoi, J.; et al. Two distinct mechanisms for loss of thioredoxin-binding protein-2 in oxidative stress-induced renal carcinogenesis. *Lab. Invest.* **2005**, *85*, 798–807, doi:10.1038/labinvest.3700280.
11. Zhou, J.; Bi, C.; Cheong, L.-L.; Mahara, S.; Liu, S.-C.; Tay, K.-G.; Koh, T.-L.; Yu, Q.; Chng, W.-J. The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML. *Blood* **2011**, *118*, 2830–2839, doi:10.1182/blood-2010-07-294827.
12. Tang, Z.; Kang, B.; Li, C.; Chen, T.; Zhang, Z. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W556–W560, doi:10.1093/nar/gkz430.



1. Darstellung der Publikation mit Literaturnachweis

1.1. Einleitung

Krebs ist ein globales Gesundheitsproblem und stellt eine große Herausforderung für die Medizin dar. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO; Stand 2019) gehört Krebs weltweit zu den führenden Todesursachen vor dem 70. Lebensjahr (in 112 von 183 Ländern). Das „Global Cancer Observatory“ verzeichnete im Jahr 2020 19,3 Millionen neue Krebsfälle und fast 10 Millionen Todesfälle (Sung *et al.*, 2021). Allgemein zeigt sich zwar ein stabilisierender bzw. rückläufiger Trend in der Mortalitätsrate, dies gilt jedoch nur für entwickelte Länder (Coleman MP *et al.*, 1993). Auch im Hinblick auf die COVID-19-Pandemie steigt die Relevanz in der Suche nach geeigneten Therapien, da durch pandemie-bedingte verspätete diagnostische Tests die Zahl der Krebstodesfälle steigt (Lai *et al.*, 2020, Angelini *et al.*, 2023). Nicht zu vernachlässigen ist neben dem Kampf ums Überleben ebenso das seelische Wohlbefinden der Patienten, welches durch die Krebsdiagnose stark beeinflusst wird (Lang-Rollin und Berberich, 2018). All dies führt auch zu einer steigenden finanziellen Belastung der Gesundheitssysteme (Hall *et al.*, 2015). Es gibt zahlreiche therapeutische Strategien gegen Krebs, jedoch bereiten die vielfältigen Tumorentitäten und das lückenhafte Wissen über deren Tumorbilogie nach wie vor große Schwierigkeiten im Hinblick auf eine angemessene Behandlung. Eine Weiterentwicklung und Verbesserung bestehender Therapieformen ist dringend erforderlich. In den vergangenen Jahren lieferte die Krebsforschung neue Einblicke in verschiedene molekulare Mechanismen, welche auf genetischer und epigenetischer Ebene das Tumorwachstum begünstigen. Solche Erkenntnisse sind entscheidend für die Entwicklung zielgerichteter Therapien (Bledsoe und Plosky, 2020). Daher untersuchten wir in dieser Studie das Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP), welches an der Krebsentstehung beteiligt ist.

1.1.1. TXNIP und das TRX-system

TXNIP ist ein metabolisches Protein, welches eine wichtige Funktion in verschiedenen zellulären Prozessen einnimmt. Es wurde erstmals als 1,25 Dihydroxyvitamin D3 Upregulated Protein 1 (VDUP1) in der humanen promyelozytären HL-60 Leukämiezelllinie (Chen und DeLuca, 1994) beschrieben und ist auch als Thioredoxin Binding Protein 2 (TBP-2) bekannt. TXNIP befindet sich auf Chromosom 1q21.1, enthält acht Exons und hat eine Länge von 4174 Basenpaaren. Das entsprechende Protein besteht aus 391 Aminosäuren (Li *et al.*, 2015). Es wird ubiquitär exprimiert, ist in verschiedenen Tierarten nachweisbar und gilt daher als hoch konserviert (Ludwig *et al.*, 2001).

TXNIP spielt eine Rolle bei der Krebsentstehung, da es entscheidend an der zellulären Redox-Regulation mitwirkt. Oxidativer Stress entsteht durch eine übermäßige Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species, ROS) (Hayes *et al.*, 2020), welche in allen aeroben Zellen als Nebenprodukte aus Sauerstoff während Stoffwechselreaktionen erzeugt werden. Zu den ROS gehören Hydroxylradikale (HO), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Superoxidanion (O_2^-), Stickstoffmonoxid (NO) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Tonissen und Trapani, 2009). Um sich vor oxidativem Stress zu schützen, verfügen Zellen über Enzyme, die

Schäden an Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden verhindern (Hayes *et al.*, 2020). Ein solches System ist unter anderem das Thioredoxin-System (TRX-System). Es umfasst Thioredoxin (TRX), Thioredoxinreduktase (TrxR), Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) und Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) (Cao *et al.*, 2020, Jia *et al.*, 2019). TXNIP gehört zur Proteinfamilie der α -Arrestine und ist das einzige bekannte Mitglied, welches an TRX bindet (Patwari *et al.*, 2006, 2009). TRX ist hauptsächlich im Zytoplasma (Yoshihara *et al.*, 2013) und TXNIP fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert (World *et al.*, 2011). Um oxidativem Stress entgegenzuwirken, reduziert TRX oxidierte Proteine in der Zelle. Das resultierende oxidierte TRX wird wiederum von TrxR durch den Verbrauch von NADPH regeneriert (Cao *et al.*, 2020). Das TRX-System spielt zudem eine Rolle bei der Apoptose. TRX ist ein direkter Inhibitor der Apoptosis Stimulating Kinase 1 (ASK1), welches den programmierten Zelltod auslöst (Tobiume *et al.*, 2001). Eine exzessive ROS-Produktion sowie weitere apoptotische Stimuli führen zu einer schnellen Hochregulierung von TXNIP und einer Translokation ins Zytoplasma (World *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 2019). TXNIP konkurriert mit ASK1 um die Bindung an reduziertes TRX, indem es eine Disulfid-Bindung bildet und wirkt somit als negativer Modulator von TRX (Nishiyama *et al.*, 1999). Folglich steigt die Verfügbarkeit von aktiviertem ASK1 (Saxena *et al.*, 2010), was schlussendlich die Apoptose einleitet (Alhawiti *et al.*, 2017). Krebszellen haben im Vergleich zu normalen Zellen einen erhöhten Metabolismus und produzieren in der Regel hohe Mengen an ROS. Folglich erhöhen auch Krebszellen ihre Fähigkeit ROS abzufangen. Frühere Studien konnten zeigen, dass verschiedene Tumore erhöhte Mengen an TRX und TrxR aufweisen (Jia *et al.*, 2019). Zusammenfassend führen ROS anfänglich zu genomischer Instabilität, tragen zur Zelltransformation bei und fördern schließlich die Proliferation in transformierten Zellen (Cadenas *et al.*, 2010). TRX verhindert daher ursprünglich die Krebsentstehung, indem es oxidativen Stress verhindert. Sobald jedoch eine Zelle maligne entartet ist, unterstützt TRX das Krebswachstum durch seine anti-apoptotische Funktion (Tonissen und Trapani, 2009). TRX und TXNIP zeigen umgekehrte Expressionsmuster, d.h. TXNIP ist im Gegensatz zu TRX in Tumoren herunterreguliert (Watanabe *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurde TXNIP bereits in verschiedenen Malignitäten als Tumorsuppressor beschrieben. In mehreren Versuchen mit TXNIP-positiven bzw. -defizienten Mausmodellen oder Zelllinien konnte gezeigt werden, dass hohe TXNIP-Spiegel durch die pro-apoptotische Wirkung vor einer Krebsentstehung und der Entwicklung von Metastasen schützen (Morrison *et al.*, 2014, Kwon *et al.*, 2012, Feingold *et al.*, 2018). Eine Herunterregulierung von TXNIP steigert die Inzidenz der Krebsentstehung und erhöht die Proliferationsrate (Sheth *et al.*, 2006, Nishizawa *et al.*, 2011, Park *et al.*, 2018, Kwon *et al.*, 2010, Dutta *et al.*, 2005). Darüber hinaus zeigte sich, dass TXNIP die Aktivität von p53 in hämatopoetischen Zellen reguliert (Jung *et al.*, 2013, Jeon *et al.*, 2005) und das Zellwachstum in der G0/G1- und G1/S-Phase des Zellzyklus unterdrücken kann (Hu und Yu, 2018). Zudem war die Expression von p27 in TXNIP-herunterregulierten Zellen verringert (Jeon *et al.*, 2005).

1.1.2. Weitere Funktionen von TXNIP

Neben der Redox-Regulation spielt TXNIP in weiteren zellulären Prozessen, wie z.B. dem Glukose- und Lipidstoffwechsel eine entscheidende Rolle. TXNIP wirkt bei der Insulinproduktion von β -Zellen, bei der Glykolyse und der Glukoseaufnahme mit. Es reduziert die Expression vom Glucosetransporter 1 (GLUT1) und fördert deren Internalisierung (Muri *et al.*, 2018), wodurch die Fähigkeit zur Glukoseaufnahme und Zellteilung gehemmt wird (Levring *et al.*, 2019). Die Regulation von TXNIP erfolgt in

hohem Maße auf Transkriptionsebene (Wong und Hagen, 2013) der Transkriptionsfaktoren, MondoA Max-like Protein X (Mlx), Nuclear Factor γ (NF- γ) und Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP). Bei Stimulation mit Glucose induzieren diese die Expression von TXNIP (Hu und Yu, 2018). Somit überrascht es nicht, dass TXNIP auch bei Krankheiten wie Diabetes und Arteriosklerose eine Rolle spielt (Szpigel *et al.*, 2018, Zhang *et al.*, 2017).

Darüber hinaus übernimmt TXNIP auch eine wichtige Funktion bei der Inflammation. Durch die Aktivierung vom Nod-like Receptor Protein 3 (NLRP3) -Inflammasom und die Reifung von Interleukin-1 β , stimuliert TXNIP entzündliche Reaktionen (Zhou *et al.*, 2010, Szpigel *et al.*, 2018). Zusätzlich vermittelt TXNIP die Wirkung von Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B), einem zentralen Mediator in Entzündungsreaktionen, was wiederum die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms verstärkt (Kim *et al.*, 2019).

Eine weitere wichtige Funktion von TXNIP liegt im Bereich der zellulären Immunität (Cao *et al.*, 2020). Während der Proliferation von Thymozyten und peripheren T-Zellen exprimieren naive T-Zellen hohe Mengen an TXNIP und niedrige Mengen an TRX. Wenn T-Zellen durch ihr spezifisches Antigen und zusätzliche stimulierende Signale, wie z.B. den Tumornekrosefaktor (TNF) aktiviert werden, kommt es zu einer schnellen Herunterregulierung von TXNIP. In der Folge nimmt die Glukose- und Aminosäureverwertung zu, was ein wesentlicher Schritt für die Proliferation ist (Levring *et al.*, 2019). TRX hingegen wird aktiviert, wodurch Reduktionsmittel an die Ribonukleotid-Reduktase abgegeben werden können, um deren enzymatische Aktivität zu gewährleisten. Dies ist entscheidend im Prozess für die Replikation und Reparatur von DNA (Muri *et al.*, 2018, Lu und Holmgren, 2014).

1.1.3. Forschungsziel

Die meisten Studien über TXNIP konzentrierten sich bislang auf die Quantifizierung von mRNA und nicht auf die Expression des TXNIP-Proteins (Zhou *et al.*, 2011). Nach der Transkription eines Gens in mRNA kann sein Produkt jedoch post-transkriptionell noch verändert werden. Modifikationen der mRNA-Stabilität und/oder Effizienz der Translation werden zunehmend im Zusammenhang mit Krebs berichtet. Die Effizienz der Translation bestimmt z.B. die Quantität des entsprechenden Proteins. Veränderungen in diesen Prozessen können zur zellulären Transformation führen und der Zelle möglicherweise einen Wiedereintritt in den Zellzyklus ermöglichen (Audic und Hartley, 2004). Wie vorstehend beschrieben, ist bekannt, dass TXNIP auf der Transkriptionsebene stark reguliert wird (Wong und Hagen, 2013). Es gibt jedoch auch Studien, die zeigen, dass miRNA373 in der humanen Brustkrebszelllinie MCF7 eine Herunterregulierung von TXNIP bewirkt. Dieser Effekt wird durch translationale Hemmung vermittelt, während die mRNA-Spiegel von TXNIP nicht beeinflusst werden (Yan *et al.*, 2011). Es lässt sich also darauf schließen, dass auch post-transkriptionelle Mechanismen die Funktion von TXNIP regulieren können. Auf ähnliche Ergebnisse kamen auch Elgort *et al.* (2010), die zeigten, dass die Herunterregulierung von TXNIP für die Fortschreitung des Zellzyklus essenziell ist. Während der frühen G1-Phase sind zunächst die TXNIP-Spiegel und erst danach die mRNA-Spiegel reduziert. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die Quantifizierung von mRNA möglicherweise nicht mit der tatsächlichen TXNIP-Aktivität übereinstimmt und begründen somit die Erforschung von TXNIP auf Proteinebene.

Daher haben wir in dieser Arbeit die TXNIP-Expression in einem großen Gewebe-Mikroarray immunhistochemisch nachgewiesen. Darüber hinaus haben wir die TXNIP-Expression in weit verbreiteten Tumorzelllinien, die direkt aus 2D-Kulturen entnommen wurden sowie in primären Maus-Xenograft-Tumoren untersucht.

1.2. Ergebnisse

1.2.1. Primär humane Tumorproben (TMA)

Bei der Analyse unserer TMAs waren 2824 von 3662 Tumorproben interpretierbar. Insgesamt war das TXNIP-Protein in Tumoren aller Entitäten und Subtypen zum Großteil herunterreguliert oder fehlend. Die TXNIP-Expression aller Krebsarten war in 73% negativ, in 14% schwach, in 8% mäßig und in 5% stark. Zusammenfassend dominierten negative bis schwache Expressionsniveaus in der Mehrheit der klinischen Proben. Wie oben beschrieben, wurde TXNIP als Tumorsuppressor beschrieben und die Auswertung einiger von uns untersuchten Tumorarten stimmt mit dieser Vermutung überein. Bei Schilddrüsenkarzinomen korrelierte die Intensität der TXNIP-Färbung mit der Aggressivität des Tumors, und beim Mammakarzinom zeigten prognostisch günstigere Karzinome einen höheren Anteil an TXNIP-positiven Tumoren als prognostisch ungünstigere Tumoren. Des Weiteren waren beim Nierenzellkarzinom die benignen Onkozytome in den meisten Fällen TXNIP-positiv, während die TXNIP-Expression in malignen Nierenzellkarzinomen verloren ging. Bei Urothelkarzinomen korrelierte der Anteil an TXNIP-positiven Tumoren mit dem Tumorstadium. Beim Bronchialkarzinom zeigten sowohl der prognostisch ungünstige small cell lung cancer (SCLC), welcher ein explosionsartiges Wachstum aufweist, als auch Metastasenproben von SCLC überhaupt keine TXNIP-Expression. Beim non-small cell lung cancer (NSCLC) war die TXNIP-Expression meistens schwach.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen zeigte sich bei dem ebenfalls untersuchten Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom, Ovarialkarzinom und Endometriumkarzinom keine klare Musterung der TXNIP-Expression.

Interessanterweise wiesen einige der TXNIP-positiven Tumoren eine deutliche Heterogenität in den TXNIP-Expressionsniveaus auf. Diese reichten von niedrig über mittel bis hoch. Diese Muster wurden beispielsweise beim Onkozytom, neuroendokrinen Schilddrüsenkarzinom, verschiedenen Ovarialkarzinomen, duktalem und neuroendokrinen Pankreaskarzinomen gefunden.

Beim Vergleich von Adenokarzinomen mit Plattenepithelkarzinomen wiesen Adenokarzinome eine höhere Anzahl von TXNIP-positiven Tumoren auf.

Keimzelltumoren und Tumore mesenchymalen Ursprungs, wie Sarkome und Lymphome zeigten so gut wie keine TXNIP-Expression.

In einigen Tumoren konnte eine unbekannte TXNIP-positive Zellpopulation mit deutlicher Färbung ihres Zellkerns entdeckt werden. Diese Zellen wurden fast ausschließlich in einigen gastrointestinalen Tumoren und Ovarialtumoren beobachtet. Bei gastrointestinalen Tumoren befanden sich diese Zellen hauptsächlich in glandulären Strukturen von Adenomen und Adenokarzinomen. Weiterhin war diese positiv gefärbte Zellpopulation innerhalb papillärer Projektionen bei Ovarialtumoren zu finden.

1.2.2. Tumorzelllinien und primäre Maus-Xenograft-Tumoren

Tumormodelle, insbesondere Maus-Xenografts, sind in der Krebsforschung von großer Bedeutung. Dennoch kann die Tumorbiologie erheblich von Patiententumoren abweichen. Daher haben wir die TXNIP-Expression in menschlichen Tumorzelllinien und gepaarten Maus-Xenograft-Tumoren untersucht. Die TXNIP-Expression war positiv in Kolonkarzinom-, Mammakarzinom- und Pankreaskarzinomzellen. Im Vergleich mit unseren TMA-Proben zeigten Pankreaskarzinom und Kolonkarzinom

kein klares Muster in der TXNIP-Färbung. In allen anderen getesteten Zelllinien war die TXNIP-Expression immunohistochemisch nicht vorhanden. In allen getesteten Maus-Xenograft-Tumoren war die TXNIP-Expression vollständig fehlend.

1.2.3. Tumorinfiltrierende Leukozyten

Um die Rolle von TXNIP in Immunzellen zu bewerten, haben wir die TXNIP-Expression in peri- und intratumoralen Leukozyten in unseren Maus-Xenograft-Tumoren immunohistochemisch nachgewiesen, da TXNIP eine Rolle bei der Aktivierung von Immunzellen spielen könnte (Levring *et al.*, 2019). Als interne Kontrolle wiesen wir in einem zweiten Schritt die Leukozyten durch ihre CD45+-Oberflächenexpression in den Maus-Xenograft-Tumoren nach. Die Leukozyten grenzten sich dicht angesiedelt am Rand des Tumors und innerhalb des Tumors ab. Die TXNIP-Expression wurde hingegen in unmittelbarer Nähe des primären Tumorgewebes graduell geringer und war in Leukozyten direkt angrenzend an das Tumorgewebe nicht vorhanden. Die Anzahl der tumorinfiltrierenden CD45+-Leukozyten war in Pankreaskarzinomen am höchsten. Die Leukozyteninfiltration wurde auch in den primär humanen Tumorproben der TMAs bewertet. Pankreaskarzinome zeigten besonders hohe Zahlen von TXNIP-positiven Leukozyten, was mit unseren Ergebnissen in den Maus-Xenograft-Tumoren korreliert. Der Informationswert könnte jedoch begrenzt sein, da der Anteil des Bindegewebes pro Probe durch den Herstellungsprozesses des TMAs nur gering war.

1.3. Diskussion

TXNIP wird ubiquitär exprimiert, ist über verschiedene Arten hinweg hoch konserviert (Ludwig *et al.*, 2001) und erfüllt in jeder Zelle nahezu die gleiche Funktion. Demgegenüber nimmt TXNIP jedoch nicht dieselbe Rolle in der Pathologie unterschiedlicher Krankheiten ein. Überexprimiertes TXNIP führt zur Progression von Krankheiten wie Diabetes, Arteriosklerose, neurodegenerativen Erkrankungen und zerebrovaskulären Krankheiten, während eine niedrige TXNIP Expression eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielt (Pan *et al.*, 2022). Erkenntnisse über TXNIP im physiologischen Zustand, deren Veränderungen in verschiedenen Krankheiten und die Aufrechterhaltung einer intrazellulären Balance sind daher von Interesse. In den letzten Jahren hat TXNIP in der Tumorbilogie zunehmend Aufmerksamkeit erlangt (Tobiume *et al.*, 2001, Junn *et al.*, 2000). Da Krebs weltweit eine der führenden Todesursachen ist und damit ein bedeutendes Gesundheitsproblem darstellt (Siegel *et al.*, 2022), ist die Verbesserung unseres Wissens über die Tumorbilogie relevant.

Die zentrale Frage dieser Studie war, ob TXNIP eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese spielt und ob seine Expression in verschiedenen Tumorarten und Subtypen unterschiedlich ist. Um diese Fragen zu beantworten, haben wir die TXNIP-Expression auf Proteinebene in Multi-Tumor-Gewebe-Mikroarrays, Maus-Xenograft-Tumoren und humanen Tumorzelllinien untersucht.

In unseren TMAs war das TXNIP-Protein in allen Tumorentitäten und -subtypen zum Großteil herunterreguliert oder fehlend. Frühere Studien legten nahe, dass TXNIP als Tumorsuppressor wirken könnte, was durch unsere Ergebnisse gestützt wurde. Mehrere Karzinome wiesen einen Zusammenhang zwischen der TXNIP-Expression und der Malignität oder Prognose auf. Dies unterstützt ebenfalls die Ansicht früherer Forschungen, dass TXNIP als prognostischer Marker bei Krebserkrankungen nützlich

sein könnte, da in den meisten Tumoren eine hohe TXNIP-Expression mit einer besseren Prognose verbunden ist (Chen *et al.*, 2020). Insgesamt scheint eine Veränderung der TXNIP-Expression eine größere Rolle bei Karzinomen zu spielen, welche epithelialen Ursprungs sind. Malignitäten anderen histologischen Ursprungs, wie z.B. Keimzelltumoren oder mesenchymale Tumore wie Sarkome und Lymphome wiesen praktisch keine TXNIP-Expression auf. Bei diesen Tumoren konnte folglich kein Zusammenhang zwischen der TXNIP-Expression und der Aggressivität des Tumors hergestellt werden. Die aktuelle Forschung hat sich hauptsächlich auf die Auswirkungen der TXNIP-Expression in Karzinomen konzentriert, was möglicherweise ihre größere Bedeutung in diesen Tumor-Phänotypen unterstreicht (Sherman *et al.*, 2007, Gao *et al.*, 2020, Gunes *et al.*, 2018). Einige der TXNIP-positiven Karzinome wiesen eine deutliche Heterogenität in den TXNIP-Expressionsniveaus auf, die von niedrig über mittel bis hoch reichten. Eine interessante klinische Fragestellung wäre, ob die TXNIP-Expression innerhalb derselben Tumorentität verschiedene Untergruppen von Patienten kennzeichnet und somit womöglich Aufschlüsse über die Gründe eines schlechten Therapieansprechens gibt. Tatsächlich sind Redox-Pufferungssysteme, wie das TRX-System auch für die Elimination von ROS verantwortlich, welche durch Chemotherapeutika generiert wurden und somit teilweise für Chemotherapieresistenzen verantwortlich (Woolston *et al.*, 2013, Hu und Yu, 2018).

TXNIP wird physiologisch in vielen Geweben exprimiert, der Grad der Expression variiert jedoch in verschiedenen Gewebetypen. Beispielsweise wird TXNIP in Lungengewebe stark exprimiert, während es in Leber- und Gehirngewebe weniger stark exprimiert wird (Hu und Yu, 2018). In Bezug auf unsere Ergebnisse war die TXNIP-Expression beim SCLC vollständig fehlend und beim NSCLC nur schwach ausgeprägt, was die wichtige physiologische Rolle von TXNIP im Lungengewebe unterstreicht. Schlussfolgernd könnten Veränderungen in der TXNIP-Expression eine größere Auswirkung in Geweben haben, in denen TXNIP physiologisch bedeutsamer ist.

In allen getesteten Maus-Xenograft-Tumoren war die TXNIP-Expression vollständig fehlend. Somit scheint die Herunterregulierung von TXNIP eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Tumoren in den Maus-Xenografts zu spielen. Eine Erklärung hierfür liefert der Warburg-Effekt, der besagt, dass viele Tumoren auf die Fermentation von Glukose anstelle von mitochondrialer oxidativer Phosphorylierung angewiesen sind. Diese Umstellung im Zellmetabolismus dient der neuen Biosynthese und fördert das maligne Wachstum (Heiden *et al.*, 2009). Da sich TXNIP als negativer Regulator der zellulären Glukoseaufnahme erwiesen hat, würde die Herunterregulierung von TXNIP einen transformatorischen Vorteil im Fortschreiten des Krebses liefern. Der Warburg-Effekt gilt zudem insbesondere für in vitro gezüchtete Krebszellen.

Aufgrund der vielfältigen Funktionen, die TXNIP ausübt, untersuchten wir in unserer Studie nicht nur die TXNIP-Expression in Tumorzellen, sondern auch in den umgebenden Immunzellen. Aktivierte T-Zellen zeigen eine signifikante Zunahme der Glukose- und Aminosäureverwertung, die für die Nukleotid-Biosynthese und das Zellwachstum entscheidend sind. Folglich nimmt die TXNIP-Expression in T-Zellen bei Aktivierung deutlich ab, während die TRX-Expression zunimmt (Muri *et al.*, 2018). Naive T-Zellen exprimieren zunächst hohe Mengen an TXNIP und der Tumornekrosefaktor (TNF) führt zu einer schnellen Herunterregulierung von TXNIP (Levring *et al.*, 2019). Da unsere Maus-Xenograft-Tumoren in immundefizienten Mäusen gezüchtet wurden, welche keine funktionellen T- und B-Lymphozyten enthalten, sind die einzigen verbleibenden Lymphozyten in diesen Mäusen Natural

Killer Cells (NK-Zellen). NK-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der ersten Verteidigungslinie gegen transformierte Zellen, was sie zu einem interessanten Instrument in der modernen Immuntherapie macht (Persyn *et al.*, 2022). Persyn *et al.* zeigten, dass die TXNIP-Expression in humanen hämatopoetischen Stammzellen bei reifen NK-Zellen hoch und in allen frühen Differenzierungsstadien niedrig ist. Folglich scheint TXNIP die Reifung humaner NK-Zellen zu fördern. Der Knock-down von TXNIP führt wiederum zu einer reduzierten Proliferation in den frühen NK-Differenzierungsstadien und einer stark reduzierten Anzahl von NK-Zellen. Die Herunterregulierung von TXNIP hat jedoch keinen Effekt auf die zytotoxische Aktivität oder die Zytokinproduktion von NK-Zellen. In unseren humanen Maus-Xenograft-Modellen wurden die an den Tumor angrenzenden Leukozyten immunhistochemisch mit einem CD45+-Antikörper kenntlich gemacht. Diese stellten sich dicht besiedelt um den Tumor herum und im Tumor selbst dar. Im Gegensatz dazu, zeigte sich in einer zweiten Färbung, dass die TXNIP-Expression in diesen Leukozyten graduell abnahm, je näher sie sich am Tumorgewebe befanden und waren direkt entlang des Tumorgewebes gänzlich negativ. Daraus könnte geschlossen werden, dass NK-Zellen, die direkt an den Tumor angrenzen, keine funktionell reifen Zellen sind und daher ihre anti-tumorale Wirkung nicht ausüben können. Brodbeck *et al.* (2014) zeigten, dass der zusätzliche Knock-out der NK-Zell-Funktion bei Mäusen insbesondere das Wachstum von entfernten Metastasen beeinträchtigt, jedoch nur einen geringen Effekt auf das Wachstum des primären Tumors hat. Aufgrund dieser Ergebnisse spekulierten wir in der oben beigefügten Publikation, dass die Aktivität von NK-Zellen in den Maus-Xenograft-Tumoren durch TXNIP so maßgeblich herunterreguliert sein könnte, dass sie funktional inaktiv sind. Wie oben beschrieben, legen neuere Erkenntnisse jedoch nahe, dass TXNIP die Funktion von NK-Zellen nicht negativ beeinflusst, sondern in reifen Zellen hoch vertreten ist. Allerdings führt der Knock-down von TXNIP zu einem verringerten prozentualen Anteil an NK-Zellen, was mit einer insgesamt geringeren zytotoxischen Aktivität einhergehen könnte (Persyn *et al.*, 2022). Obwohl die genauen immunmodulatorischen Funktionen von TXNIP bis heute unklar sind, könnte TXNIP zur Immunerkennung und damit zur Eliminierung von Tumorzellen beitragen. Die Expression von TXNIP könnte den Differenzierungsstatus von Immunzellen in Gewebeproben anzeigen und folglich prognostische Informationen über die Wirkung neuartiger Immuntherapien liefern.

In den letzten Jahren gab es bedeutende biotechnologische Fortschritte in der Entwicklung von neuen möglichen Wirkstoffen für die Krebstherapie (Tsimberidou *et al.*, 2020). Bisherige Behandlungsmöglichkeiten, wie Chemotherapie, Chirurgie, Strahlentherapie, Hormontherapie, Immuntherapie usw. zielen jedoch nicht nur auf die Krebszellen ab, sondern verursachen auch Schäden an den gesunden umliegenden Geweben (Wang *et al.*, 2018). Aus diesem Grund sind Kombinationstherapien, die den Tumor von verschiedenen Standpunkten aus angreifen, zu einem neuen therapeutischen Ansatz geworden (Tsimberidou *et al.*, 2020). Einer dieser Standpunkte könnte das Mikroumfeld des Tumors sein. Dieses umfasst die nicht zum Krebs zugehörigen Zellen und die Proteine, die von allen Zellen im Tumor produziert werden. Tumore sind teilweise abhängig von Interaktionen mit nicht-malignen Zellen und Elementen im Stroma, die zum Tumorstadium beitragen. Das TRX-System spielt eine entscheidende Rolle im Mikroumfeld von Tumoren und deren Störung beeinträchtigt die Fähigkeit einer Zelle, sich gegen tumorauslösende Prozesse zu schützen. Die Wirkungen neuer Krebsmedikamente können durch Veränderungen im Mikroumfeld überwacht werden (Wang *et al.*, 2018). TRX und TXNIP weisen wechselseitige Expressionsmuster auf (Yoshihara *et al.*, 2013), dementsprechend ist

TXNIP im Gegensatz zu TRX in den meisten Krebsarten herunterreguliert (Lincoln *et al.*, 2003). Es gibt klare Hinweise darauf, dass die Hemmung von TRX und/oder TrxR in vitro und in vivo eine antitumorale Aktivität aufweist. Hemmstoffe gegen TRX wie Auranofin oder PX-12 zeigen eine antikarzinogene Aktivität in Tiermodellen und sind für klinische Studien zugelassen. Auf der anderen Seite gibt es auch vielversprechende Kandidaten, welche die TXNIP-Expression induzieren, wie z.B. Substanzen wie D-Allose oder der HDAC-Inhibitor Suberoylanilidhydroxamsäure (Jia *et al.*, 2019). Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass die TXNIP-Expression durch einige klassische chemotherapeutische Medikamente wie 5-Fluorouracil, Anisomycin, Dexamethason und Ceramid stark induziert wird (Hu und Yu, 2018). Daher könnte die pharmakologische Regulation des TRX/TXNIP-Systems einen effektiven therapeutischen Ansatz darstellen.

Wie bereits oben erwähnt, erzeugen einige klassische Krebsmedikamente wie Cisplatin und Anthrazykline ROS als Nebenprodukte, die es den Chemotherapeutika ermöglichen, ihre schädigende Wirkung auszuüben. Da Redox-Pufferungssysteme wie das Thioredoxin-System in Krebszellen oft überexprimiert sind, sind sie unter anderem für die Chemotherapieresistenz verantwortlich (Woolston *et al.*, 2013, Hu und Yu, 2018). Dies unterstützt die Idee, TXNIP-induzierende therapeutische Wirkstoffe als adjuvante Therapie einzusetzen.

1.4. Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass die Herunterregulierung von TXNIP ein gemeinsames Merkmal in humanen Tumor-Xenograft-Modellen ist. Des Weiteren liefern wir neue Einblicke in die TXNIP-Expression auf Proteinebene in verschiedenen Tumorentitäten und zeigen, dass TXNIP in den meisten humanen Tumoren herunterreguliert wird. Die Regulierung des TRX/TXNIP-Systems als Behandlungsziel könnte eine wichtige Strategie in der zukünftigen Krebstherapie sein. Messungen der TXNIP-Expression könnten neue Erkenntnisse über Patientenuntergruppen in bestimmten Tumorentitäten liefern und Aufschluss über Therapieresistenzen liefern. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass TXNIP möglicherweise an der Aktivierung des Immunsystems gegen den Tumor beteiligt ist und könnte daher prognostische Informationen hinsichtlich neuer moderner Immuntherapien liefern. Da eine hohe TXNIP-Expression mit einer insgesamt besseren Prognose verbunden ist, könnte TXNIP als Biomarker zur Vorhersage der Prognose bei Malignomen eingesetzt werden.

1.5. Literaturverzeichnis

- Alhawiti, N. M. *et al.* (2017) 'TXNIP in Metabolic Regulation: Physiological Role and Therapeutic Outlook', *Current Drug Targets*. Bentham Science Publishers Ltd., 18(9), p. 1095. doi: 10.2174/1389450118666170130145514.
- American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 285(6), pp. 3997–4005. doi: 10.1074/jbc.M109.034421.
- Angelini, M. *et al.* (2023) 'Decrease of cancer diagnosis during COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis', *European Journal of Epidemiology*, 38, pp. 31–38. doi: 10.1007/s10654-022-00946-6.
- Audic, Y. and Hartley, R. S. (2004) 'Post-transcriptional regulation in cancer', *Biology of the Cell*. Portland Press Ltd., 96(7), pp. 479–498. doi: 10.1016/J.BIOLCEL.2004.05.002.
- Bledsoe, K. and Plosky, B. (2020) 'The Cycle of Basic and Applied Cancer Research', *Molecular Cell*. Elsevier, 78(6), p. 987. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2020.05.037.
- Brodbeck, T. *et al.* (2014) 'Perforin-dependent direct cytotoxicity in natural killer cells induces considerable knockdown of spontaneous lung metastases and computer modelling-proven tumor cell dormancy in a HT29 human colon cancer xenograft mouse model', *Molecular Cancer*. BioMed Central, 13(1). doi: 10.1186/1476-4598-13-244.
- Cadenas, C. *et al.* (2010) 'Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer', *Breast Cancer Research*. BioMed Central, 12(3), p. R44. doi: 10.1186/bcr2599.
- Cao, X. *et al.* (2020) 'Redox-dependent and independent effects of thioredoxin interacting protein', (639).
- Chen, K. S. and DeLuca, H. F. (1994) 'Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D-3', *BBA - Gene Structure and Expression*, 1219(1), pp. 26–32. doi: 10.1016/0167-4781(94)90242-9.
- Chen, Y. *et al.* (2020) 'Research Progress of TXNIP as a Tumor Suppressor Gene Participating in the Metabolic Reprogramming and Oxidative Stress of Cancer Cells in Various Cancers', *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A., p. 568574. doi: 10.3389/fonc.2020.568574.
- Coleman MP *et al.* (1993) 'Trends in cancer incidence and mortality', *IARC scientific publications*. IARC Sci Publ, (121), pp. 1–15. doi: 10.3109/9780415874984-2.
- Dutta, K. K. *et al.* (2005) 'Two distinct mechanisms for loss of thioredoxin-binding protein-2 in oxidative stress-induced renal carcinogenesis', *Laboratory Investigation*. Nature Publishing Group, 85(6), pp. 798–807. doi: 10.1038/labinvest.3700280.
- Elgort, M. G. *et al.* (2010) 'Transcriptional and Translational Downregulation of Thioredoxin Interacting Protein Is Required for Metabolic Reprogramming during

- G1', *Genes & Cancer*. Impact Journals, LLC, 1(9), p. 893. doi: 10.1177/1947601910389604.
- Feingold, P. L. *et al.* (2018) 'Induction of thioredoxin-interacting protein by a histone deacetylase inhibitor, entinostat, is associated with DNA damage and apoptosis in esophageal adenocarcinoma', *Molecular Cancer Therapeutics*. American Association for Cancer Research Inc., 17(9), pp. 2013–2023. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-1240.
- Gao, Y. *et al.* (2020) 'Decreased expression of TXNIP predicts poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma', *Oncology Letters*. Spandidos Publications, 19(1), pp. 763–770. doi: 10.3892/ol.2019.11165.
- Gunes, A. *et al.* (2018) 'Thioredoxin interacting protein promotes invasion in hepatocellular carcinoma', *Oncotarget*, 9(96), pp. 36849–36866. doi: 10.18632/oncotarget.26402.
- Hall, P. S. *et al.* (2015) 'Costs of cancer care for use in economic evaluation: a UK analysis of patient-level routine health system data', *British Journal of Cancer*. doi: 10.1038/bjc.2014.644.
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T. and Tew, K. D. (2020) 'Oxidative Stress in Cancer', *Cancer Cell*. Elsevier Inc., 38(2), pp. 167–197. doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.001.
- Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. and Thompson, C. B. (2009) 'Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation', *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 324(5930), p. 1029. doi: 10.1126/SCIENCE.1160809.
- Hu, J. and Yu, Y. (2018) 'The Function of Thioredoxin-Binding Protein-2 (TBP-2) in Different Diseases', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited, 2018. doi: 10.1155/2018/4582130.
- Jeon, J. H. *et al.* (2005) 'Tumor suppressor VDUP1 increases p27kip1 stability by inhibiting JAB1', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 65(11), pp. 4485–4489. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2271.
- Jia, J. J. *et al.* (2019) 'The role of thioredoxin system in cancer: strategy for cancer therapy', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, 84(3), pp. 453–470. doi: 10.1007/s00280-019-03869-4.
- Jung, H. *et al.* (2013) 'TXNIP maintains the hematopoietic cell pool by switching the function of p53 under oxidative stress', *Cell Metabolism*. Elsevier, 18(1), pp. 75–85. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.002.
- Junn, E. *et al.* (2000) 'Vitamin D 3 Up-Regulated Protein 1 Mediates Oxidative Stress Via Suppressing the Thioredoxin Function', *The Journal of Immunology*. The American Association of Immunologists, 164(12), pp. 6287–6295. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6287.
- Kim, S. K., Choe, J. Y. and Park, K. Y. (2019) 'TXNIP-mediated nuclear factor- κ B signaling pathway and intracellular shifting of TXNIP in uric acid-induced NLRP3 inflammasome', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 511(4), pp. 725–731. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.02.141.
- Kwon, H.-J. *et al.* (2010) 'Vitamin D 3 Upregulated Protein 1 Suppresses TNF- α -Induced NF- κ B Activation in Hepatocarcinogenesis', *The Journal of Immunology*.

- The American Association of Immunologists, 185(7), pp. 3980–3989. doi: 10.4049/jimmunol.1000990.
- Kwon, H. J. *et al.* (2012) 'Vitamin D 3 upregulated protein 1 deficiency promotes N-methyl-N-nitrosourea and *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis in mice', *Gut*, 61(1), pp. 53–63. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300361.
- Lai, A. G. *et al.* (2020) 'Estimated impact of the COVID-19 pandemic on cancer services and excess 1-year mortality in people with cancer and multimorbidity: near real-time data on cancer care, cancer deaths and a population-based cohort study', *BMJ Open*, 10. doi: 10.1136/bmjopen-2020-043828.
- Lang-Rollin, I. and Berberich, G. (2018) 'Psycho-oncology', *Dialogues in Clinical Neuroscience*. Taylor & Francis, 20(1), p. 13. doi: 10.31887/DCNS.2018.20.1/ILANGROLLIN.
- Levring, T. B. *et al.* (2019) 'Tumor necrosis factor induces rapid down-regulation of TXNIP in human T cells', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-53234-x.
- Li, Y. *et al.* (2015) 'Hypoxia induced high expression of thioredoxin interacting protein (TXNIP) in non-small cell lung cancer and its prognostic effect', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(7), pp. 2953–2958. doi: 10.7314/APJCP.2015.16.7.2953.
- Lu, J. and Holmgren, A. (2014) 'The thioredoxin antioxidant system', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 66, pp. 75–87. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.
- Ludwig, D. L. *et al.* (2001) 'Cloning, genetic characterization, and chromosomal mapping of the mouse VDUP1 gene', *Gene*, 269(1–2), pp. 103–112. doi: 10.1016/S0378-1119(01)00455-3.
- Morrison, J. A. *et al.* (2014) 'Thioredoxin interacting protein (TXNIP) is a novel tumor suppressor in thyroid cancer', *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd., 13(1), p. 62. doi: 10.1186/1476-4598-13-62.
- Muri, J. *et al.* (2018) 'The thioredoxin-1 system is essential for fueling DNA synthesis during T-cell metabolic reprogramming and proliferation', *Nature Communications*. Springer US, 9(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41467-018-04274-w.
- Nishiyama, A. *et al.* (1999) 'Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D3 up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 274(31), pp. 21645–21650. doi: 10.1074/jbc.274.31.21645.
- Nishizawa, K. *et al.* (2011) 'Thioredoxin-interacting protein suppresses bladder carcinogenesis', *Carcinogenesis*. Oxford Academic, 32(10), pp. 1459–1466. doi: 10.1093/carcin/bgr137.
- Pan, M. *et al.* (2022) 'TXNIP: A Double-Edged Sword in Disease and Therapeutic Outlook', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited, 2022. doi: 10.1155/2022/7805115.
- Park, J. W. *et al.* (2018) 'Downregulation of TXNIP leads to high proliferative activity and estrogen-dependent cell growth in breast cancer', *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 498(3), pp. 566–572. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.020.
- Patwari, P. *et al.* (2006) 'The interaction of thioredoxin with Txnip: Evidence for formation of a mixed disulfide by disulfide exchange', *Journal of Biological Chemistry*. NIH Public Access, 281(31), pp. 21884–21891. doi: 10.1074/jbc.M600427200.
- Patwari, P. *et al.* (2009) 'Thioredoxin-independent regulation of metabolism by the α -arrestin proteins', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 284(37), pp. 24996–25003. doi: 10.1074/jbc.M109.018093.
- Persyn, E. *et al.* (2022) 'TXNIP Promotes Human NK Cell Development but Is Dispensable for NK Cell Functionality', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI, 23(19). doi: 10.3390/IJMS231911345/S1.
- Research Online, G. (2003) 'The Thioredoxin-Thioredoxin Reductase System: Over-Expression in Human Cancer Author Link to published version'. Available at: <http://hdl.handle.net/10072/6315http://ar.iijournals.org/> (Accessed: 3 March 2022).
- Saxena, G., Chen, J. and Shalev, A. (2010) 'Intracellular shuttling and mitochondrial function of thioredoxin- interacting protein', *Journal of Biological Chemistry*.
- Sung, H. *et al.* (2021) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. American Cancer Society, 71(3), pp. 209–249. doi: 10.3322/CAAC.21660.
- Sherman, S. I. *et al.* (2007) 'Thyroid carcinoma', in *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. Harborside Press, pp. 568–621. doi: 10.6004/jnccn.2007.0052.
- Sheth, S. S. *et al.* (2006) 'Hepatocellular carcinoma in Txnip-deficient mice', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 25(25), pp. 3528–3536. doi: 10.1038/sj.onc.1209394.
- Siegel, R. L. *et al.* (2022) 'Cancer statistics, 2022', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. American Cancer Society, 72(1), pp. 7–33. doi: 10.3322/CAAC.21708.
- Szpigiel, A. *et al.* (2018) 'Lipid environment induces ER stress, TXNIP expression and inflammation in immune cells of individuals with type 2 diabetes', *Diabetologia*. Springer Verlag, 61(2), pp. 399–412. doi: 10.1007/s00125-017-4462-5.
- Tobiume, K. *et al.* (2001) 'ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis', *EMBO Reports*. European Molecular Biology Organization, 2(3), pp. 222–228. doi: 10.1093/embo-reports/kve046.
- Tonissen, K. F. and Trapani, G. Di (2009) 'Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy', *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(1), pp. 87–103. doi: 10.1002/mnfr.200700492.
- Tsimberidou, A. M. *et al.* (2020) 'Review of Precision Cancer Medicine: Evolution of the Treatment Paradigm', *Cancer treatment reviews*. NIH Public Access, 86, p. 102019. doi: 10.1016/J.CTRV.2020.102019.
- Wang, J. J., Lei, K. F. and Han, F. (2018) 'Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments', *European review for medical and pharmacological*

- sciences*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 22(12), pp. 3855–3864. doi: 10.26355/EURREV_201806_15270.
- Watanabe, R. *et al.* (2010) 'Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2', *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc., 127(3), pp. 261–270. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.04.004.
- Wong, R. W. and Hagen, T. (2013) 'Mechanistic target of rapamycin (mTOR) dependent regulation of thioredoxin interacting protein (TXNIP) transcription in hypoxia', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 433(1), pp. 40–46. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.070.
- Woolston, C. M. *et al.* (2013) 'Thioredoxin interacting protein and its association with clinical outcome in gastro-oesophageal adenocarcinoma', *Redox Biology*. Elsevier B.V., 1(1), pp. 285–291. doi: 10.1016/j.redox.2013.04.006.
- World, C., Spindel, O. N. and Berk, B. C. (2011) 'Thioredoxin-interacting protein mediates TRX1 translocation to the plasma membrane in response to tumor necrosis factor- α A key mechanism for vascular endothelial growth factor receptor-2 transactivation by reactive oxygen species', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(8), pp. 1890–1897. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.226340.
- Yan, G. R. *et al.* (2011) 'Global identification of miR-373-regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics', *PROTEOMICS*. John Wiley & Sons, Ltd, 11(5), pp. 912–920. doi: 10.1002/PMIC.201000539.
- Yoshihara, E. *et al.* (2013) 'Thioredoxin/Txnip: Redoxisome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases', *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fimmu.2013.00514.
- Zhang, Y. *et al.* (2017) 'Altered Expression of TXNIP in the peripheral leukocytes of patients with coronary atherosclerotic heart disease', *Medicine*. Wolters Kluwer Health, 96(49). doi: 10.1097/MD.00000000000009108.
- Zhou, J., Yu, Q. and Chng, W. J. (2011) 'TXNIP (VDUP-1, TBP-2): A major redox regulator commonly suppressed in cancer by epigenetic mechanisms', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd, 43(12), pp. 1668–1673. doi: 10.1016/j.biocel.2011.09.005.
- Zhou, R. *et al.* (2010) 'Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 11(2), pp. 136–140. doi: 10.1038/ni.1831.

2. Zusammenfassung in englischer Sprache

Thioredoxin interacting protein (TXNIP) is a metabolic protein which plays a crucial role in various cellular processes such as redox homeostasis, glucose uptake, lipid metabolism and the immune system. Abnormal TXNIP levels are notable e.g., in type II diabetes, cardiovascular diseases, and tumors. One essential factor in tumourigenesis is oxidative stress which is caused by the excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS). To prevent harm from ROS, cells provide specific antioxidant defence systems, such as the thioredoxin system. It includes thioredoxin (TRX), thioredoxin reductase (TrxR), α -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and thioredoxin interacting protein (TXNIP). If such system is disturbed it interferes with a cell's ability to protect against tumourigenic processes. TRX and TXNIP exhibit reciprocal expression patterns, meaning that TXNIP, in contrast to TRX, is downregulated in various cancers. Hence, TXNIP has been proposed as a tumor suppressor gene in a variety of malignancies. So far, almost all the investigations on the role of TXNIP in cancer were focused on quantification of mRNA and not on TXNIP protein expression. Therefore, we employed immunohistochemical detection of TXNIP protein in a large multi-tumor tissue microarray consisting of 2,824 samples from 94 different tumor entities. In our study, TXNIP was downregulated or lost in a high proportion of tumours across all entities and subtypes and in these cases was differently expressed depending on tumor stage and subtype. This supports the approach of former studies, that TXNIP might be useful as a prognostic marker in malignancies, since in most tumours, a high TXNIP expression relates to an overall better prognosis.

In this study, we further analysed TXNIP expression in primary mouse xenograft tumors derived from human cancer cell lines and found it was immunohistochemically absent in all xenograft tumors investigated. Hence, loss of TXNIP suggests a critical role for the development of tumors in xenografts. We also detected leucocytes by staining our xenograft samples with a CD45+ antibody, which delineated the leucocytes densely packed in direct proximity to the tumour and within the tumour itself. Intriguingly, we detected that TXNIP expression in leucocytes in the xenograft tumors samples became gradually lower in the proximity of the primary tumor tissue and was absent in leukocytes directly adjacent to tumor tissue. Thus, immune-modulatory functions of TXNIP might control immune recognition and, elimination of tumour cells might be distinct in different tumour entities. Hence TXNIP expression might be used to monitor the functional state of tumor-infiltrating leukocytes in tissue sections and may help to predict response to modern immune therapy.

3. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) ist ein metabolisches Protein, welches eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen wie der Redox-Regulation Glukoseaufnahme, dem Lipidstoffwechsel und Immunsystem spielt. Veränderungen im TXNIP-Spiegel sind z.B. bei Erkrankungen wie Typ-II-Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Tumoren bekannt. Eine maßgebliche Ursache, die zur Tumorentstehung beiträgt ist oxidativer Stress, welcher durch eine übermäßige Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species, ROS) verursacht wird. Um Schäden durch ROS zu verhindern, verfügen Zellen über spezifische antioxidative Abwehrsysteme, wie das Thioredoxin-System. Dieses umfasst Thioredoxin (TRX), Thioredoxin-Reduktase (TrxR), α -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) und Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP). Zellen schützen sich unter anderem durch dieses System gegen eine maligne Entartung. Folglich kann es bei einer Störung des TRX-Systems zur Krebsentstehung kommen. TRX und TXNIP zeigen wechselseitige Expressionsmuster, d.h. TXNIP ist im Gegensatz zu TRX in verschiedenen Tumorentitäten herunterreguliert. Aus diesem Grund wurde TXNIP bereits in verschiedenen Malignitäten als Tumorsuppressor beschrieben. Die meisten Studien über TXNIP konzentrierten sich bislang auf die Quantifizierung von mRNA und nicht auf die Expression des TXNIP-Proteins. Daher haben wir in dieser Arbeit das TXNIP Protein immunhistochemisch in einem großen Gewebe-Mikroarray mit 2.824 Proben aus 94 verschiedenen Tumorentitäten untersucht. Insgesamt war das TXNIP-Protein in Tumoren aller Entitäten und Subtypen zum Großteil herunterreguliert oder fehlend. Die Intensität der Färbung korrelierte in einigen Tumorentitäten mit dem Tumorstadium oder der Aggressivität des Tumors. Diese Ergebnisse unterstützen die Ansicht früherer Studien, dass TXNIP als prognostischer Marker bei Krebserkrankungen nützlich sein könnte, denn in den meisten Tumoren ist eine hohe TXNIP-Expression mit einer insgesamt besseren Prognose verbunden.

Des Weiteren wurde in dieser Studie die Expression von TXNIP in primären Maus-Xenograft-Tumoren untersucht, welche in allen Proben negativ war. Somit scheint die Runterregulierung von TXNIP eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Tumoren in Xenografts zu spielen. Außerdem untersuchten wir in unseren Xenograft-Proben die an den Tumor angrenzenden Leukozyten immunhistochemisch mit einem CD45+- und TXNIP-Antikörper. Die Leukozyten stellten sich dicht besiedelt um den Tumor herum und im Tumor selbst dar. Die TXNIP-Expression hingegen, nahm in diesen Leukozyten graduell ab, je näher sie sich am Tumor befanden und waren direkt entlang des Tumorgewebes gänzlich negativ. Folglich kommt TXNIP eine immunmodulatorische Funktion zu und ist möglicherweise an der Aktivierung des Immunsystems gegen den Tumor beteiligt. Aus diesem Grund könnte die TXNIP-Expression von Leukozyten in Gewebeproben wertvolle prognostische Informationen über die Wirkung hinsichtlich neuer moderner Immuntherapien liefern.

4. Erklärung des Eigenanteils

Diese Arbeit wurde im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Udo Schumacher durchgeführt.

Die Gewebe-Mikroarrays wurden aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (Direktor: Prof. Dr. G. Sauter) bezogen. Die Krebszellenlinien und primären Maus-Xenograft-Tumoren wurden aus dem Archiv des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie aus früheren Experimenten bezogen.

Hiermit versichere ich, Joana Schröder, dass ich die folgenden Anteile für die Erstellung der Publikationspromotion „Thioredoxin Interacting protein (TXNIP) Is Differentially expressed in Human Tumour samples but Is Absent in Human Tumour Cell Line Xenografts: Implications for Its Use as an Immunosurveillance Marker“ selbständig erarbeitet habe:

- Ausarbeitung der Methodik unter Mithilfe von Prof. Dr. med. Udo Schumacher
- Alle Versuche nach Einarbeitung durch Maike Märker (Technische Assistenz) mit Unterstützung von Christine Knies
- Literaturrecherche und -auswertung
- Bildanalyse der 2.824 Gewebe-Mikroarrays, der Xenograft- und Zellen-in-Agar-Proben
- Entwurf und Bearbeitung des Manuskriptes
- Erstellung der Tabellen und Abbildungen

Der Anteil des Ko-Autors Lukas Clemens Böckelmann an der Publikation besteht in dem Fertigstellen des Manuskriptes sowie dem Einbringen der Expressionsdatensätze und deren Analyse.

5. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Schumacher, für die freundliche Überlassung des Themas und die Mitwirkung bei der Erstellung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. med. Lukas Böckelmann für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Fertigstellung des Papers.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ronald Simon (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) für die Bereitstellung der TMA-Proben bedanken. Ich danke Tobias Gosau, Maike Märker, Christine Knies, and Jennifer Schröder-Schwarz für ihre technische Assistenz und dafür, dass sie mir bei technischen Fragen zu meinen Versuchen halfen.

Außerdem danke ich meinen Eltern und meiner Schwester, auf die ich immer zählen kann. Insbesondere möchte ich meinem Vater danken, der mir immer mit einem Rat zu dieser Arbeit zur Seite stand.

Meinem Partner danke ich für die Geduld und Fürsorge während dieser Doktorarbeit und auch meinen Freunden, für ihre Ermutigungen und seelische Unterstützung.

6. Lebenslauf

Entfällt aus Datenschutzrechtlichen Gründen.

7. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: 