



**Untersuchungen zum antiproliferativen Potential von Stoff-
wechselinhibitoren bei tumorphysiologischen Sauerstoffkon-
zentrationen**

**(Investigations on antiproliferative potential of metabolism inhibitors in
the presence of tumor physiological concentrations of oxygen)**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse „Infektion und Immunität“

Vorgelegt von

Constantin Johannes Sebastian Jürgens

aus

Oldenburg (Oldb.)

Würzburg, 2016

Eingereicht am: 29.02.2016

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Eilers

1. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. C. Otto

2. Betreuer: Prof. Dr. hum. biol. U. Kämmerer

3. Betreuer: PD. Dr. med. U. Steger

Tag des Promotionskolloquiums: 14.10.2016

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Meiner Frau

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Eigenschaften malignen Wachstums	1
1.2	Biochemische Grundlagen des Zellstoffwechsels	2
1.3	Aufbau von Mitochondrien und Funktion der Atmungskette.....	6
1.4	Mechanismen zur Anpassung an Hypoxie	9
1.5	Die Isoenzyme der Laktatdehydrogenase (LDH)	10
1.6	Die Monocarboxylat-Transporter.....	11
1.7	Ziele	13
2	Fragen	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Kulturmedien und Pufferlösungen.....	16
3.2	Zelllinien.....	18
3.3	Der Kristallviolett-Assay	19
3.4	Bestimmung von Laktat und Glukose	20
3.5	Western Blot-Analysen	22
3.6	Messungen zum Sauerstoffverbrauch mit der Clark-Elektrode.....	23
3.7	Statistische Auswertung.....	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Charakterisierung kolorektaler Karzinomzelllinien	32
4.2	Untersuchungen zur Effektivität der Atmungskette	34
4.3	Biochemische Untersuchungen zum Glukosestoffwechsel.....	39
4.4	IC ₅₀ -Werte für 5-FU, NaOx und αCHC.....	43
4.5	IC ₅₀ -Werte für die Kombination aus 5-FU und NaOx	45
4.6	IC ₅₀ -Werte für die Kombination aus 5-FU und αCHC.....	47
4.7	Antiproliferative Effekte der Kombination 5-FU, NaOx und αCHC	48
4.8	Antiproliferative Effekte von 5-FU, NaOx und αCHC in der Langzeitkultur. ...	56
5	Beantwortung der Fragen	59
6	Diskussion	61
6.1	Die Bedeutung der Glykolyse für malignes Wachstum	61
6.2	Mitochondrien maligner und nicht-maligner Zellen.....	65
6.3	Antiproliferative Effekte der Kombination aus NaOx und αCHC	67
6.4	Weitere Targetstrukturen im Tumorstoffwechsel.....	70
7	Ausblick	73
8	Zusammenfassung	74
9	Summary	76
10	Literaturverzeichnis	78
11	Appendix	87
	Eidesstattliche Erklärung, Affidavit, Danksagung u. Curriculum Vitae	

1 Einleitung

1.1 Eigenschaften malignen Wachstums

Zahlreiche aktuelle Innovationen in der Onkologie haben Krebstherapien effektiver werden lassen (Kantarjian H et al., 2002; Piccart-Gebhart MJ et al., 2005; Shen YC et al., 2010). Immer häufiger ergänzen sogenannte *Biologics* wie monoklonale Antikörper und *small molecules* etablierte medikamentöse Krebstherapien. Sie hemmen entweder gezielt den Signalfuss in die Krebszelle oder blockieren innerhalb der Krebszelle solche Signalwege, die zur Tumorbildung bzw. Metastasierung beitragen. Trotzdem bleiben maligne Erkrankungen auch weiterhin eine therapeutische Herausforderung. Sie stellen mit 28,8 % bei Männern und 22,4 % bei Frauen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland nach Herz-Kreislaufkrankungen dar (www.dkfz.de, Zahlen für 2012). Die Weltgesundheitsbehörde WHO erwartet im Jahr 2030 weltweit einen Anstieg der durch Krebserkrankungen verursachten Todesfälle um 45 % (www.who.int, Zahlen für Juli 2013).¹⁾

Das Ziel in der Onkologie muss daher weiterhin sein, neue molekulare Strukturen zu identifizieren und ihre Eignung für therapeutische Ansätze zu prüfen. So wird seit einigen Jahren der Stoffwechsel von Tumoren wieder intensiv untersucht, nachdem dieser bereits in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts im Fokus des wissenschaftlichen Interesses stand. So berichteten Warburg und Minami im Jahr 1923 über eine starke Bildung von Milchsäure²⁾ an Gewebeschnitten solider Tumoren in Gegenwart von Sauerstoff (Warburg O, Minami S, 1923). In normalen Körperzellen wird die Bildung von Milchsäure durch Anwesenheit von Sauerstoff gehemmt, was als Pasteur-Effekt³⁾ bezeichnet wird (Pasteur L, 1861). Für die von Warburg beobachtete Eigenschaft von Tumoren hat sich die Bezeichnung Warburg-Effekt durchgesetzt. Es gilt als allgemein

¹⁾ Der von der WHO prognostizierte weltweite Anstieg der Krebserkrankungen im Jahr 2030 soll von 8,7 auf 12,6 Millionen ansteigen.

²⁾ Bei den in der Zelle vorherrschenden physiologischen Bedingungen liegt Milchsäure zum größten Teil in Form ihres Anions, dem Laktat, vor: $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^- + \text{H}^+$.

³⁾ Der von Louis Pasteur 1861 bei Hefen entdeckte Effekt beschreibt einen stärkeren Verbrauch an Glukose bei anaeroben als bei aeroben Bedingungen; gleichzeitig bilden sie mehr Ethanol (alkoholische Gärung). Ein ähnlicher Effekt unter anaeroben Bedingungen ist auch am Muskel zu beobachten, wobei dieser Laktat bildet.

akzeptiert, dass der Warburg-Effekt Tumorzellen ermöglicht, sich perfekt an die in soliden Tumoren vorherrschenden hypoxischen Bedingungen anzupassen (Solaini G et al., 2010).

1.2 Biochemische Grundlagen des Zellstoffwechsels

Jede Zelle benötigt zur Aufrechterhaltung ihrer strukturellen Integrität und zahlreichen Funktionen Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Je nach Stoffwechsellage deckt die Zelle dabei ihren Energiebedarf zu unterschiedlichen Teilen aus dem Abbau von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen. Dabei entstehen verschiedenste Zellkomponenten wie die Vorstufen von Makromolekülen (z. B. Pentosen für die Synthese von Nukleinsäuren), das für reduktive Biosynthesen wichtige Reduktionsäquivalent NADPH⁴⁾ und der zelluläre Energieträger ATP. Ein überaus wichtiger Energielieferant für den Zellstoffwechsel ist Glukose, die im Zytosol über den Embden-Meyerhof-Weg (Glykolyse) metabolisiert wird (Dashty M, 2013). Bei der Glykolyse, über die nahezu sämtliche biologischen Systeme verfügen, handelt es sich um einen mehrstufigen enzymatischen Abbau von Glukose zur Energiegewinnung. Im ersten Abschnitt des Glukosekatabolismus wird Glukose in der Glykolyse zu Pyruvat oxidiert⁵⁾, wobei gleichzeitig ATP und die Reduktionsäquivalente bzw. Cofaktoren NADH+H⁺ gebildet werden (Locasale JW, Cantley LC, 2011; Horn F, 2012; Dashty M, 2013). Im zweiten Abschnitt des Glukosekatabolismus wird Pyruvat verstoffwechselt, wobei die An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff darüber entscheidet, über welchen der beiden zur Verfügung stehenden Stoffwechselwege Pyruvat abgebaut wird.

Bei Anwesenheit von Sauerstoff (aerobe Bedingungen oder Normoxie) wird Pyruvat in die Mitochondrien überführt. Den Zugang zum Citratzyklus stellt der Multienzymkomplex Pyruvat-Dehydrogenase her, der durch oxidative Decarboxylierung aus Pyruvat das Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) herstellt

⁴⁾ Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat.

⁵⁾ Der Kohlenstoff in Pyruvat weist eine höhere Oxidationsstufe (nämlich +0,7) auf als in Glukose (±0). Die Oxidationsstufe ergibt sich aus dem Verhältnis von Kohlenstoff (C) zu Wasserstoff (H). Das C:H-Verhältnis in Glukose beträgt 1:2 und in Pyruvat 1:1,3. Das bedeutet, dass der Kohlenstoff in Glukose stärker reduziert vorliegt als in Pyruvat.

(Dashty M, 2013). Die beiden Kohlenstoffatome im Acetyl-CoA werden anschließend im Citratzyklus zu zwei Molekülen Kohlendioxid (CO_2) oxidiert (Mathupala SP et al., 2009; Dang CV, 2012; Dashty M, 2013). Bei der Oxidation von Acetyl-CoA werden pro C_2 -Körper vier Paare an Wasserstoffatomen ($4\text{H}_2 = 8\text{H}^+ + 8\text{e}^-$) auf die Reduktionsäquivalente NAD^+ und FAD übertragen. Dabei entstehen drei Moleküle $\text{NADH} + \text{H}^+$ und ein Molekül FADH_2 (Horn F, 2012; Dashty M, 2013). In der inneren Mitochondrienmembran wird die Oxidation der Reduktionsäquivalente mit der Bildung von ATP gekoppelt, was als oxidative Phosphorylierung bezeichnet wird. Hierbei werden die Wasserstoffatom-Paare auf Sauerstoff übertragen und zu Wasser (H_2O) reduziert: $4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$. Insgesamt entstehen aus einem Molekül Glukose über Glykolyse, Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung (OxPh) bis zu 30 Moleküle ATP (Tab. 1.1; Horn F, 2012).

Bei Abwesenheit von Sauerstoff (anaerobe Bedingungen oder Hypoxie ⁶⁾ verbleibt Pyruvat im Zytosol und wird dort durch die Laktat-Dehydrogenase zu Laktat reduziert (Dashty M, 2013). Bei dieser Reaktion werden die Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ regeneriert. Das ist notwendig, damit auch weiterhin oxidierte Reduktionsäquivalente für die Glykolyse zur Verfügung stehen und diese nicht stoppt. Bei der sogenannten Milchsäuregärung oder anaeroben Glykolyse ⁷⁾ wird kein weiteres ATP gebildet. Milchsäuregärung und Glykolyse weisen somit die gleiche ATP-Bilanz auf (Tab. 1.1). Im Vergleich zu den Stoffwechselwegen Glykolyse, Citratzyklus und OxPh sind die beiden Stoffwechselwege Glykolyse und Milchsäuregärung hinsichtlich der ATP-Ausbeute (30 versus 2 Moleküle ATP pro Molekül Glukose) wesentlich ineffizienter (Tab. 1.1). Ein über die Glykolyse ausreichend hoher Glukoseumsatz kann dieses Defizit ausgleichen (Vander Heiden MG et al., 2009; Locasale JW, Cantley LC, 2011).

⁶⁾ Beide Begriffe sind nicht synonym zu verwenden (ebenso wenig wie „aerob“ und „Normoxie“). Für die Untersuchungen in dieser Arbeit ist zudem der Begriff Hypoxie, also die Minderversorgung mit Sauerstoff, zutreffender. Der Begriff anaerob bedeutet ohne Sauerstoff lebend und kann für eukaryotische Zellen nur ein temporärer Zustand sein.

⁷⁾ Die Begriffe „aerobe“ und „anaerobe“ Glykolyse, die im englischsprachigen Raum häufig verwendet werden (aerobic, anaerobic glycolysis), sind etwas unglücklich, da die Glykolyse per se keinen Sauerstoff benötigt. Mit dem Begriff „aerobic glycolysis“ wird sowohl die Zellatmung als auch der Warburg-Effekt bezeichnet und mit dem Begriff „anaerobic glycolysis“ die Milchsäuregärung.

Auch wenn der Warburg-Effekt und die Milchsäuregärung die Bildung von Milchsäure gemeinsam haben, sind beide Stoffwechselsituationen nicht identisch, da sie sich in der Energiebilanz erheblich unterscheiden (Tab. 1.1). Bereits Warburg erkannte, dass Tumoren bei Normoxie Glukose nicht ausschließlich vergären (im Ggs. zur Hypoxie). So werden ca. 15-45 % des Pyruvats im Zytosol zu Laktat reduziert und ca. 55-85 % des Pyruvats in den Mitochondrien für die Atmung eingesetzt (Warburg O, 1955; Vander Heiden MG et al., 2009). Das bedeutet, dass in Krebszellen durch den Warburg-Effekt die drei Stoffwechselwege Glykolyse, Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung in einem anderen Verhältnis zueinander stehen als in normalen bzw. benignen Zellen. Das bedeutet ebenfalls, dass solche Zellen zwar weniger ATP als benigne Zellen bilden, aber doch wesentlich mehr als die 2 Moleküle ATP pro Molekül Glukose aus der Glykolyse. Werden 15 % von dem in der Glykolyse gebildeten Pyruvat zu Laktat reduziert, so stehen noch 85 % des Pyruvats für die Oxidation in den Mitochondrien zur Verfügung bei einer Ausbeute an ATP von immer noch ca. 22 Molekülen (!) pro Molekül Glukose (Tab. 1.1). Steigt der Anteil an Pyruvat, der zu Laktat reduziert wird, auf 45 % an (wie von Warburg berechnet), so ist die Zelle immer noch in der Lage, ca. 17 Moleküle ATP pro Molekül Glukose zu bilden. Die Situation ändert sich, sobald die Versorgung mit Sauerstoff nicht mehr ausreicht. Unter anaeroben Bedingungen bzw. Hypoxie unterscheiden sich Krebszellen und benigne Zellen nicht mehr in ihrem Stoffwechsel. In Hypoxie sind maligne und benigne Zellen zudem vollständig von Glukose abhängig, da dies der einzige Energieträger ist, mit dem eukaryotische Zellen auch ohne Sauerstoff Energie gewinnen können (Krebs HA, 1972; Racker E, 1974). Im Gegensatz zu Tumorzellen bilden benigne Zellen Laktat ausschließlich in Hypoxie (Warburg O, 1925; Krebs HA, 1972) bzw. während ihrer Teilungsphase (Wang T et al., 1976).

Tab. 1.1: Energiebilanz des Glukoseabbaus bei Ab- und Anwesenheit von Sauerstoff. Der Gewinn an ATP pro Molekül Glukose ist für die anaerobe und aerobe Situation berechnet. Diesen Berechnungen ist der ATP-Gewinn beim Warburg-Effekt (aerobe Glykolyse), der definitionsgemäß in Gegenwart von Sauerstoff (Normoxie, aerob) abläuft, gegenübergestellt.

	Substrat	Produkt	ATP
Anaerob			
Glykolyse	1 Glukose	2 Pyruvat + 2 ATP + 2 NADH+H ⁺	2
Milchsäuregärung	2 Pyruvat + 2 NADH+H ⁺	2 Laktat + 2 NAD ⁺	
			2
Aerob			
Glykolyse	1 Glukose	2 Pyruvat + 2 ATP + 2 NADH+H ⁺	2
PDH ¹⁾	2 Pyruvat	2 Acetyl-CoA + 2 NADH+H ⁺	
Citratzyklus	2 Acetyl-CoA	6 NADH+H ⁺ + 2 GTP + 2 FADH ₂	2 ⁴⁾
OxPh ²⁾	10 NADH+H ⁺ ³⁾	23,1 ATP + 10 H ₂ O	23,1
OxPh	2 FADH ₂	2,76 ATP + 2 H ₂ O	2,76
			29,86
Warburg-Effekt			
Glykolyse	1 Glukose	2 Pyruvat + 2 ATP + 2 NADH+H ⁺	2
Milchsäuregärung	0,3 Pyruvat + 0,3 NADH+H ⁺ ⁵⁾	0,3 Laktat + 0,3 NAD ⁺	
PDH	1,7 Pyruvat	1,7 Acetyl-CoA + 1,7 NADH+H ⁺	
Citratzyklus	1,7 Acetyl-CoA	5,1 NADH+H ⁺ + 1,7 GTP + 1,7 FADH ₂	1,7 ⁴⁾
OxPh	6,8 NADH+H ⁺	15,71 ATP + 6,8 H ₂ O	15,71
OxPh	1,7 FADH ₂	2,35 ATP + 1,7 H ₂ O	2,35
			22,76

¹⁾ PDH: Pyruvat-Dehydrogenase; ²⁾ OxPh (Oxidative Phosphorylierung). Der ATP-Gewinn durch Oxidation der Reduktionsäquivalente wurde wie folgt berechnet: Pro Mol NADH+H⁺ werden 2,31 mol ATP und pro Mol FADH₂ 1,38 mol ATP gebildet (Brand M, 2005; Horn F, 2012); ³⁾ Die 10 Moleküle NADH+H⁺ kommen wie folgt zustande: 2 NADH+H⁺ aus der Glykolyse, 2 NADH+H⁺ aus der Reaktion der PDH und 6 NADH+H⁺ aus dem Citratzyklus; ⁴⁾ GTP und ATP sind energetisch identisch (Horn F, 2012); ⁵⁾ Die Berechnungen zum Warburg-Effekt basieren auf den Angaben von Warburg (1955) und Van der Heiden und Kollegen (2009); s. auch Text. Zur Ermittlung der ATP-Bilanz wurde angenommen, dass 15 % des Pyruvats zu Laktat reduziert wird. Der Energiebedarf durch den Transport von NADH+H⁺, das in der Glykolyse gebildet wird, in die Mitochondrien wurde bei der Bilanzierung nicht berücksichtigt.

1.3 Aufbau von Mitochondrien und Funktion der Atmungskette

Da in der vorliegenden Arbeit auch die Funktion von Mitochondrien in Krebszellen untersucht wurde, wird an dieser Stelle ein kurzer Überblick zum Aufbau von Mitochondrien und zur Funktionsweise der Atmungskette gegeben (Abb. 1.1).

Mitochondrien sind ovale Zellorganellen und bestehen aus den vier Kompartimenten äußere (Doppel-) Membran (AM), Intermembranraum (IMR), innere Membran (IM) und mitochondriale Matrix. Die Oberfläche der inneren Membran wird durch sogenannte Cristae vergrößert (Kulawiak B et al., 2013; Chaban Y et al., 2014), in der sich mehrere Kopien der Proteinkomplexe I-IV und der ATP-Synthase (Komplex V) befinden (Abb. 1.1). Die vier Komplexe der Atmungskette und die ATP-Synthase sind für die Energiegewinnung der Zelle zuständig (Chaban Y et al., 2014).

Die ATP-Synthase an der Atmungskette wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet. Hierzu werden die Elektronen von den Reduktionsäquivalenten $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 über die Komplexe I und II in die Elektronentransportkette eingeschleust, über die Komplexe III und IV transportiert und anschließend auf molekularen Sauerstoff übertragen. Die Energie der Elektronen wird dazu genutzt, um über die Komplexe I, III und IV Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum zu transportieren. Dieser Protonengradient oder elektrochemische Gradient verfügt über ein ausreichend großes Potential, um die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP durch die ATP-Synthase zu ermöglichen (Kulawiak B et al., 2013; Chaban Y et al., 2014).

Komplex I, auch als NADH-Dehydrogenase bezeichnet, besitzt einen hydrophilen Arm in der Matrix und einen hydrophoben Arm in der Membran (Wiedemann J, 2012; Chaban Y et al., 2014). An seinem hydrophilen Arm bindet $\text{NADH} + \text{H}^+$, das zwei Elektronen übergibt, die innerhalb von Komplex I über sieben Eisen-Schwefel-Komplexe zum hydrophoben Arm übertragen werden. Von dort werden sie an das Coenzym Ubiquinon (UQ) abgegeben, das dadurch zu Ubiquinol

(UQH₂) reduziert wird. Gleichzeitig transportiert Komplex I vier Protonen in den Intermembranraum (Wiedemann J, 2012; Chaban Y et al., 2014).

Komplex II oder Succinat-Dehydrogenase ist neben Komplex I die zweite Eintrittsstelle für Elektronen in die Atmungskette (Kulawiak B et al., 2013; Chaban Y et al., 2014). Komplex II transportiert keine Protonen über die innere Membran, sondern überträgt ausschließlich Elektronen auf Ubiquinon (Kulawiak B et al., 2013; Chaban Y et al., 2014). Komplex II ist die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus, die die Oxidation (Dehydrierung) von Succinat zu Fumarat katalysiert und die Elektronen vom gebildeten FADH₂ an Ubichinon abgibt (Chaban Y et al., 2014).

Komplex III, der auch als Cytochrom-c-Oxidoreduktase bezeichnet wird, überträgt die Elektronen vom Ubichinol auf Cytochrom c. Dies geschieht über den sogenannten Q-Zyklus, auf den an dieser Stelle nicht näher eingegangen wird. Der Q-Zyklus ist notwendig, da Ubichinol zwei Elektronen transportiert, die Cytochrome aber jeweils nur ein Elektron. Pro Molekül Ubichinol (UQH₂) werden zwei Moleküle Cytochrom c reduziert und vier Protonen in den Intermembranraum gepumpt (Wiedemann J, 2012; Kim HJ et al., 2012).

Komplex IV oder Cytochrom-c-Oxidase oxidiert vier Moleküle Cytochrom c. Dabei werden vier Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, der dadurch zu Wasser (H₂O) reduziert wird. Auch Komplex IV wirkt als Protonenpumpe und pro Elektronenpaar werden 2 Protonen (insgesamt vier) in den Intermembranraum transportiert (Chaban Y et al., 2014).

Komplex V, ATP-Synthase oder F₁-F₀-ATP Synthase, ist ein Transmembranprotein, das die Energie des Protonengradienten zur Bildung von ATP nutzt (Weber J, Senior AE, 2003; Chaban Y et al., 2014). Die ATP-Synthase besteht, ohne dabei zu sehr ins Detail zu gehen, aus dem in die Membran eingebetteten hydrophoben F₀-Teil und dem in die Matrix ragenden hydrophilen F₁-Teil (Abb. 11.1 im Anhang), in dem die ATP-Synthase erfolgt. Beide Teile sind miteinander verbunden. Protonen gelangen aus dem Intermembranraum über den F₀-Teil in die Matrix (Weber J, Senior AE, 2003) und versetzen dabei den F₁-Teil in

eine Drehbewegung. Diese löst Konformationsänderungen an den Untereinheiten des F_1 -Teils aus, die zur Bildung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat P_i und zur Freisetzung von ATP führen (Wiedemann J, 2012; Ahmad Z, Cox JL, 2014). Jeweils fünf Protonen sind notwendig, um eine für die ATP-Synthese ausreichende Drehbewegung des F_1 -Teils auszulösen (Wiedemann J, 2012).

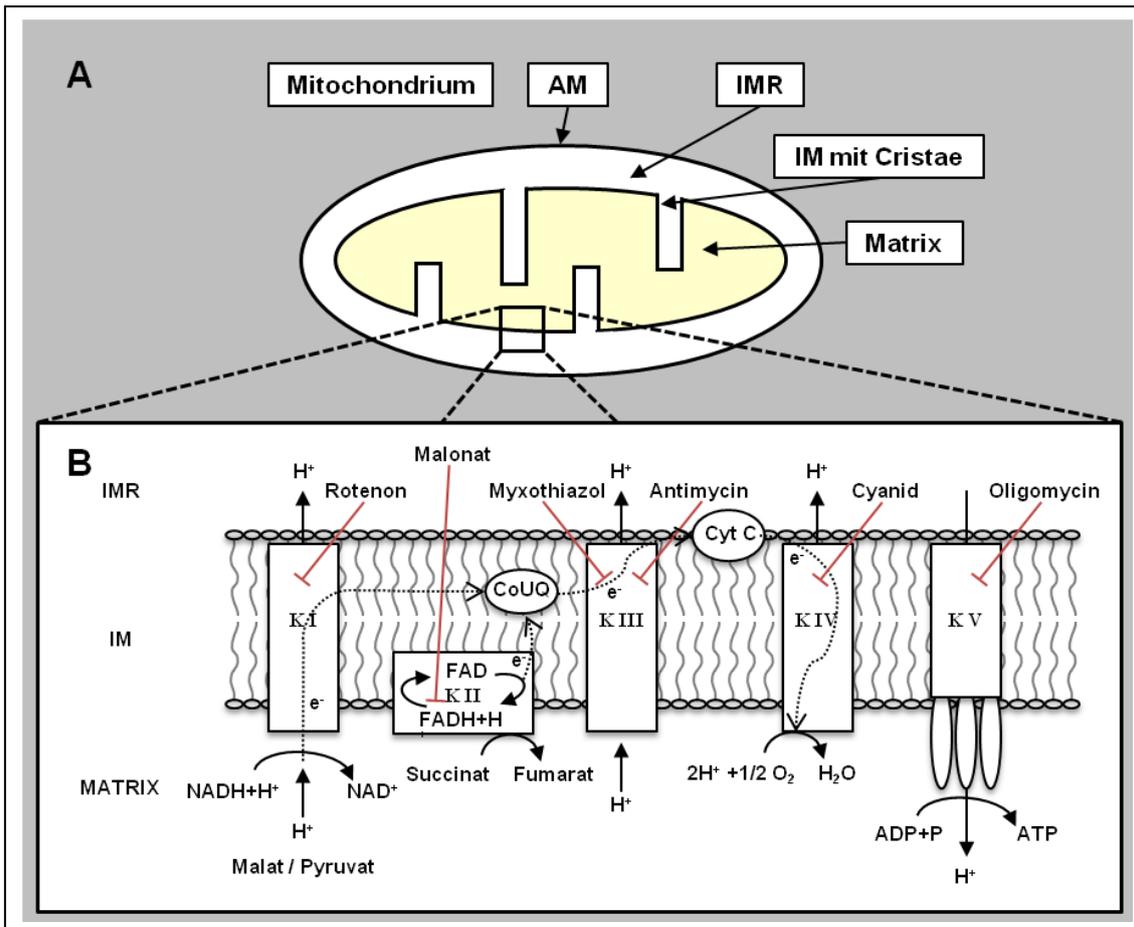


Abb. 1.1: Aufbau des Mitochondriums. A) Das Mitochondrium mit seinen vier Kompartimenten: (1) Äußere Membran (AM), (2) Innere Membran (IM) mit Cristae zur Oberflächenvergrößerung, (3) Intermembranraum (IMR) und (4) Matrix. **B)** Die Komplexe der Atmungskette und ihre Hemmstoffe (auf der oberen Seite der Doppelmembran aufgeführt). Die innerliegende gestrichelte Linie zeigt den Elektronenfluss. Für Erläuterungen siehe Text. Verändert nach Brugger H, 2006 und Wiedemann J, 2012.

Die Funktion der Atmungskette kann an bestimmten Stellen mit Hemmstoffen (Abb. 1.1) beeinflusst werden (Hofhaus G et al., 1996; Berry EA et al., 2000; Stock D et al., 2000; Kim YS, 2002; Brand MD, Nicholls DG, 2011). Einige die-

ser Hemmstoffe, wie Rotenon und Oligomycin, wurden in dieser Arbeit eingesetzt, um die Kapazität der Atmungskette zu messen.

1.4 Mechanismen zur Anpassung an Hypoxie

In den meisten Geweben herrscht eine physiologische Sauerstoffkonzentration von 2 % bis 11 % vor, während Tumoren in der Regel mit weniger als 2 % Sauerstoff versorgt sind (Bertout JA et al., 2008). Der Hauptgrund für die im Tumor vorherrschende Hypoxie ist eine ineffektive (abnorme) Vaskularisation, was die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen beeinträchtigt (Vaupel P, Mayer A, 2007; Kim JW et al., 2007). Tumorzellen, die mehr als 5-10 Zellschichten vom Tumorstroma mit seinen versorgenden Blutgefäßen entfernt liegen, befinden sich bereits in Hypoxie (Gatenby RA et al., 2007). Der in Hypoxie veränderte Stoffwechsel von Tumorzellen wird maßgeblich durch den „Hypoxie-induzierten Faktor 1“ (HIF-1) ausgelöst. HIF-1, ein aus α - und β -Untereinheit bestehendes Heterodimer, reguliert die Transkription zahlreicher Gene, wozu auch solche gehören, die für verschiedenste Enzyme der Glykolyse und für die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT2 kodieren (Höckel M, Vaupel P, 2001; Bertout JA et al., 2008; Meijer TWH et al., 2012). HIF-1 α sorgt auch dafür, dass die Verbindung zwischen Glykolyse und Mitochondrien „gekappt“ wird. Hierzu induziert HIF-1 α die Expression der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1 (PDK1), die ihrerseits die Pyruvat-Dehydrogenase hemmt und somit Pyruvat im Zytosol verbleibt (Kim JW et al., 2006; Dang CV, 2012).

Eine gesteigerte Glykolyse in Tumorzellen ist die einzige Möglichkeit, um in Hypoxie existieren zu können. Die auf die Glykolyse beschränkte geringere ATP-Produktion (Tab. 1.1) wird durch einen erhöhten Glukoseumsatz (Aufnahme und Verbrauch) kompensiert (Vander Heiden MG et al., 2009; Locasale JW, Cantley LC, 2011). Hierdurch machen sich die Zellen jedoch von einer uneingeschränkten Versorgung mit Glukose abhängig. Wird diese unterbrochen bzw. erreicht Glukose nicht mehr die Zellen oder kann von diesen nicht mehr aufgenommen werden, dann steht den in Hypoxie befindlichen Zellen kein geeigneter Energieträger mehr zur Verfügung (Vander Heiden MG et al., 2009).

Sämtliche Anpassungsmöglichkeiten der Zelle an hypoxische Bedingungen können nicht darüber hinwegtäuschen, dass Hypoxie für Zellen bedrohlich werden kann. Folgen der Hypoxie sind ATP-Verlust bei Glukosemangel, ein Kollabieren des Natrium-Kalium-Gradienten, Depolarisationsvorgänge an der Membran, die vermehrte Aufnahme von Chloridionen, das Anschwellen der Zelle, ein Anstieg der Calcium-Konzentration im Zytosol und intrazelluläre Acidose. Solche Veränderungen können zum Zelltod führen. So ist bekannt, dass Hypoxie apoptotische Vorgänge in der Zelle auslöst – und zwar über HIF-1 α und über die Expression von p53 durch die p53-abhängigen Gene Apaf-1 („apoptotic protease activating factor 1“) und Caspase-9 (Höckel M, Vaupel P, 2001).

1.5 Die Isoenzyme der Laktatdehydrogenase (LDH)

Im Kapitel 1.2 wurde bereits die Bedeutung der Laktatdehydrogenase (LDH) zur Aufrechterhaltung der Glykolyse in Hypoxie und für den Warburg-Effekt erläutert. LDH ist ein Tetramer, das aus den beiden Untereinheiten A und B (Ballas SK, 2013; Doherty JR, Cleveland JL, 2013) besteht. Für die humane LDH sind 5 Isoformen beschrieben, die sich durch verschiedene Kombinationen der beiden Untereinheiten unterscheiden: 4B, 3B1A, 2B2A, 1B3A, 4A (Doherty JR, Cleveland JL, 2013). LDH-A (4A) katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat, wobei die in der Glykolyse gebildeten Reduktionsäquivalente NADH+H⁺ zu NAD⁺ oxidiert werden und somit der Glykolyse wieder zur Verfügung stehen (Dashty M, 2013). Untersuchungen belegen, dass die Expression der Isoform LDH-A, die auch in der Muskulatur zu finden ist, mit einem hohen Glukoseumsatz der Zellen korreliert. In solchen „glykolytisch“ aktiven Zellen wird mehr Pyruvat gebildet als oxidativ verstoffwechselt werden kann. Um eine Blockierung der Glykolyse zu vermeiden, müssen die Reduktionsäquivalente NADH+H⁺ mit Hilfe der LDH-A reoxidiert werden; hierzu wird Pyruvat zu Laktat reduziert (Dashty M, 2013). Das Isoenzym LDH-B (4B), das u.a. in Herzzellen zu finden ist, katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat (Doherty JR, Cleveland JL, 2013). Dies ermöglicht den Zellen, Laktat in den oxidativen Stoffwechsel einzubringen und als Energiequelle zu nutzen (Dashty M, 2013).

Die Abhängigkeit glykolytisch aktiver Krebszellen von der Laktatdehydrogenase stellt möglicherweise einen Ansatz dar, um das Wachstum von Krebszellen sowohl in Normoxie als auch Hypoxie gezielt zu hemmen. Im Gegensatz dazu bilden benigne Zellen in Normoxie kaum Laktat und hypoxische Bedingungen stellen keine Standardbedingungen für diese Zellen dar.

1.6 Die Monocarboxylat-Transporter

Die Monocarboxylat-Transporter oder MCT bestehen aus 14 verschiedenen Mitgliedern, wovon die Funktion von 6 Transportern bekannt ist (Halestrap AP, 2012). Der Transport von Monocarboxylaten wie Laktat, Pyruvat und Ketonkörper erfolgt als Symport, d.h. gleichzeitig mit den Monocarboxylaten werden auch Protonen transportiert. Die Funktion von MCT1 und MCT4 ist bekannt und für beide Transporter stehen Inhibitoren zur Verfügung (Halestrap AP, 2009; Halestrap AP, 2012; Halestrap AP, Wilson MC, 2012).

Tab. 1.2 enthält Informationen zu MCT1 und MCT4 hinsichtlich Gewebeverteilung und Substratspezifität (Morris ME, Felmlee MA, 2008). Beide Transporter unterscheiden sich stark in ihrer Substrataffinität (Tab. 1.2). So weist MCT4 eine geringere Affinität für zahlreiche Monocarboxylate auf (Manning Fox JE et al., 2000; Morris ME, Felmlee MA, 2008). Der K_m -Wert⁸⁾ von MCT4 ist für Laktat um das 6-fache und für andere Substrate sogar um das 20- bis 100-fache erhöht im Vergleich zu MCT1 (Manning Fox JE et al., 2000). Auch die Expression der beiden Transporter wird unterschiedlich reguliert. Dabei ist interessant zu erwähnen, dass die Expression von MCT4 primär durch Hypoxie über HIF-1 α reguliert wird (Meijer TWH et al., 2012; Halestrap AP, Wilson MC, 2012). Der entscheidende Unterschied zwischen MCT1 und MCT4 ist die von ihnen vermittelte Transportrichtung. Während MCT4 überwiegend den Export von Laktat vermittelt (Morris ME, Felmlee MA, 2008; Halestrap AP, Wilson MC, 2012), kann MCT1 Laktat sowohl importieren als auch exportieren (Halestrap

⁸⁾ Die Michaeliskonstante K_m ist eine wichtige Kenngröße für enzymatische Reaktionen und gibt die Substratkonzentration an, bei der die Geschwindigkeit der Enzymreaktion (Umsatzgeschwindigkeit) halbmaximal ist ($K_m = \frac{1}{2} V_{max}$). Auch für Transportmoleküle gilt der K_m -Wert. Wichtig an dieser Stelle ist die Information, dass bei kleinen K_m -Werten das Substrat durch die Transportmoleküle fester gebunden wird und die Transportgeschwindigkeit dadurch höher ist.

AP, 2009). Mit der Transportrichtung scheint auch die Gewebeverteilung von MCT1 und MCT4 zusammenzuhängen. So wird MCT4 vermehrt von glykolytisch aktiven Geweben bzw. Zellen exprimiert, MCT1 dagegen verstärkt von oxygenierten Geweben bzw. Zellen (Halestrap AP, Wilson MC, 2012). Dies macht Sinn, da glykolytisch aktive Gewebe große Mengen an Laktat durch MCT1 und MCT4 nach außen transportieren, um eine Übersäuerung im Zellinneren zu vermeiden. Der höhere K_m -Wert für MCT4 fällt dabei vermutlich aufgrund der hohen intrazellulären Konzentration an Laktat nicht ins Gewicht. Im Gegensatz dazu nehmen gut oxygenierte Gewebe über MCT1 Laktat von außen auf, um es zu Pyruvat zu oxidieren und anschließend in den Citratzyklus einzuschleusen. Für den Muskel ist dieser Transport von Laktat durch eine angepasste Expression von MCT1 bzw. MCT4 beschrieben (Halestrap AP, Wilson MC, 2012).

Tab. 1.2: Vergleich der Monocarboxylat-Transporter MCT1 und MCT4. In der Tab. sind einige Charakteristika von MCT1 und MCT4 aufgeführt, die insbesondere für das Thema der Arbeit interessant sind. Die Daten sind aus Morris ME, Felmler MA, 2008; Halestrap AP, 2009 und Halestrap AP; Wilson MC, 2012.

	MCT-1	MCT-4
UniGen Name	SLC16A1	SLC16A3
Gen Locus	1p13.2	17q25.3
Membranlokalisation	Apikal u. basolateral	Basolateral
Transportmechanismus	H ⁺ -Cotransporter	H ⁺ -Cotransporter
Gewebeverteilung	Oxygeniertes Gewebe	glykolytisches Gewebe ¹⁾
K_m-Wert für Laktat ²⁾	3,5-6	28
Regulation der Expression	Ca ²⁺ , AMP	Hypoxie
Transportrichtung	Import u. Export	Export
Hemmstoffe ³⁾	α CHC ³⁾	α CHC

¹⁾ Weiße Muskelzellen, weiße Blutkörperchen, Chondrozyten, Retina, Plazenta, Dünndarm, Lungen, Herz, Nieren, Gehirn; ²⁾ K_m -Werte nach Morris ME, Felmler MA, 2008; ³⁾ α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (s. auch Morris ME, Felmler MA, 2008).

Die Funktion beider Transporter scheint von der Anwesenheit des Chaperonmoleküls CD147, ein Transmembranprotein, abhängig zu sein (Kirk P et al., 2000; Philp NJ et al., 2003; Schneiderhan W et al., 2009; Pinheiro C et al., 2010). Zusätzlich zu CD147 wurde kürzlich mit CD44 ein zweites Hilfsprotein identifiziert (Slomiany MG et al., 2009; Pinheiro C et al., 2010). Möglicherweise stellen CD147 und CD44 in Kombination mit MCT geeignete Targetstrukturen zur Generierung neuer Hemmstoffe dar.

1.7 Ziele

Das wesentliche Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, inwieweit die Laktatdehydrogenase und zwei Mitglieder aus der Familie der Monocarboxylat-Transporter, MCT1 und MCT4, geeignete Strukturen für eine gezielte Hemmung des Tumorstoffwechsels darstellen. Hierdurch sollen zelltoxische bzw. zytostatische Effekte in Tumorzellen ausgelöst werden. Das dahinter stehende Konzept basiert auf dem Warburg-Effekt und der Minderversorgung solider Tumoren mit Sauerstoff (Tumorhypoxie).

Sowohl der Warburg-Effekt bei Normoxie als auch die anaerobe Glykolyse bei Hypoxie führen zu einer massiven Bildung von Laktat. Wird die Tumorzelle daran gehindert, die für die Glykolyse notwendigen Reduktionsäquivalente mit Hilfe der Laktatdehydrogenase zu reoxidieren, dann sollte sich der Glukoseumsatz der Glykolyse erheblich verringern. Nach Dauer und Ausprägung kann diese Mangelsituation den apoptotischen Zelltod auslösen (Li X et al., 2013; Zhai X et al., 2013). Wird andererseits die Tumorzelle daran gehindert, Laktat über die Transporter MCT1 und MCT4 nach außen zu schleusen, so löst die intrazelluläre Ansäuerung ebenfalls Apoptose aus (Izumi H et al., 2003; Pinheiro C et al., 2010; Kumar A et al., 2013). Entscheidend hierbei ist, dass normale Zellen zwar auch Laktat in Hypoxie bilden, diese Situation jedoch nicht physiologisch ist, weil gesunde Gewebe in aller Regel gut oxygeniert sind (Bertout JA et al., 2008).

Sowohl der Warburg-Effekt als auch die anaerobe Glykolyse zwingen die Tumorzelle dazu, große Mengen an Pyruvat zu Laktat zu reduzieren, das zudem

aus der Zelle entfernt werden muss. Durch die Hemmung der Laktatdehydrogenase und der MCT sollen genau diese beiden Vorgänge, Reduktion von Pyruvat und Export von Laktat, in der Tumorzelle gestört werden. Hierfür wurden die Hemmstoffe Natriumoxamat (NaOx) für die Laktatdehydrogenase und α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (α CHC) für MCT1 und MCT4 gewählt. Die Wirkung beider Inhibitoren auf die Zellvitalität sollte an sechs humanen kolorektalen Karzinomzelllinien untersucht werden. Zusätzlich sollte der Glukoseverbrauch und die Laktatbildung als Maß für das glykolytische Potential der Zellen gemessen werden.

Der Stoffwechsel von Tumoren wird *in vitro* hauptsächlich bei einer Sauerstoffkonzentration von 21 % untersucht, obgleich die meisten Gewebe eine physiologische Sauerstoffkonzentration zwischen 2 % und 11 % aufweisen. Tumorgewebe ist in aller Regel noch stärker mit Sauerstoff unterversorgt und intratumorale Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % sind repräsentativ (Vaupel P, Mayer A, 2007; Bertout JA et al., 2008; Solaini G et al., 2010). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Wirkung beider Hemmstoffe bei diesen beiden Sauerstoffkonzentrationen untersucht. Messungen bei 21 % wurden zur Kontrolle durchgeführt bzw. bei dieser Sauerstoffkonzentration wurde die Funktion der Mitochondrien untersucht. Diese Untersuchungen und die Bestimmung der Laktatbildung ermöglichen eine Abschätzung, ob der Stoffwechsel der untersuchten Karzinomzelllinien mehr glykolytisch oder mehr oxidativ ist.

Die Wirksamkeit beider Inhibitoren sollte mit der Wirksamkeit des Chemotherapeutikums 5-Fluoruracil (5-FU) verglichen werden bzw. es sollte untersucht werden, ob die Wirksamkeit von 5-FU durch Kombination mit den beiden Inhibitoren gesteigert werden kann. 5-FU ist Bestandteil der standardisierten Behandlung des kolorektalen Karzinoms (Leitlinie Kolorektales Karzinom, Juni 2013). Ein Charakteristikum dieser Arbeit ist, dass die IC_{50} -Werte für 5-FU, Natriumoxamat und α CHC bestimmt wurden, um sicher zu gehen, dass die Substanzen in Konzentrationen eingesetzt werden, bei der sie eine spezifische Wirkung und keine unspezifischen (toxischen) Effekte aufweisen.

2 Fragen

Das Konzept der vorliegenden Arbeit beruht auf der Beobachtung, dass Tumorzellen in Normoxie durch den Warburg-Effekt und in Hypoxie durch die anaerobe Glykolyse große Mengen an Laktat bilden. Somit könnte die Hemmung der Laktatdehydrogenase (LDH), die die Bildung von Laktat katalysiert, als auch die Blockade der Monocarboxylat-Transporter (MCT) 1 und 4, die Laktat aus der Zelle transportieren, einen antiproliferativen Effekt in Krebszellen auslösen. Die Wirkung der Inhibitoren Natriumoxamat (LDH-Inhibitor) und α CHC (MCT-Inhibitor) auf den Stoffwechsel von sechs kolorektalen Karzinomzelllinien wurde bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen untersucht. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden.

1. Welche Charakteristika weisen die untersuchten sechs humanen kolorektalen Karzinomzelllinien in ihrem Stoffwechsel auf? Veränderte sich der Stoffwechsel dieser Zellen bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 %?
2. Der Warburg-Effekt ist das Phänomen einer gesteigerten Laktatbildung in Normoxie und wird als Anpassung von Tumoren an vorherrschende hypoxische Bedingungen gesehen. Diese Anpassung geht möglicherweise zu Lasten der Funktion von Mitochondrien. War die mitochondriale Atmung der sechs humanen kolorektalen Karzinomzelllinien verändert?
3. Die beiden Inhibitoren Natriumoxamat und α CHC sollten mit 5-FU kombiniert werden. Wie beeinflussten sie die Wirksamkeit von 5-FU?
4. Von den beiden Inhibitoren Natriumoxamat und α CHC wurden antiproliferative Effekte erwartet. Welche waren diese und wurden sie durch unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen beeinflusst?

3 Material und Methoden

3.1 Kulturmedien und Pufferlösungen

Die Tumorzelllinien wurden in ihrem empfohlenen Medium kultiviert (Tab. 3.1), wobei für alle Kulturmedien folgende Zusätze (in Klammern jeweils die Endkonzentrationen) verwendet wurden: Penicillin G (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL), L-Glutamin (2 mmol/L), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/L), Natriumpyruvat (1 mmol/L), 1 % MEM nicht-essentielle Aminosäuren (alle Reagenzien von Invitrogen GmbH, Karlsruhe) sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Gibco, Carlsbad, Katalog Nr.: 10270-106). Für die Versuche wurden die Tumorzelllinien ausschließlich in RPMI 1640 Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit den oben angegebenen Zusätzen kultiviert.

Für humane Endothelzellen (HUVEC; PromoCell, Heidelberg) wurde ein auf diese Zellen abgestimmtes serumreduziertes „*Endothelial Cell Growth*“-Medium 2 (PromoCell, Heidelberg) für Erhaltungs- und Experimentalkulturen verwendet. Das Medium enthielt folgende Zusätze (in Klammern jeweils die Endkonzentration): fetales Kälberserum (2 %), rekombinanter humaner epidermaler Wachstumsfaktor (5 ng/mL), rekombinanter humaner Fibroblastenwachstumsfaktor (10 ng/mL), insulinähnlicher Wachstumsfaktor (IGF-1; 20 ng/mL), rekombinanter humaner vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor 165 (0,5 ng/mL), Ascorbinsäure (1 µg/mL), Heparin (22,5 µg/mL) und Hydrocortison (0,2 µg/mL).

Humane Fibroblasten (NHDF; PromoCell, Heidelberg) wurden für die Erhaltungs- und Experimentalkulturen in „*Fibroblast Growth*“-Medium 2 (PromoCell, Heidelberg) kultiviert. Das Medium enthielt folgende Zusätze (in Klammern jeweils die Endkonzentration): fetales Kälberserum (2 %), rekombinanter humaner Fibroblastenwachstumsfaktor (1 ng/mL), insulinähnlicher Wachstumsfaktor (5 µg/mL).

Für die peritoneale Maus-Makrophagenzelllinie J774 wurde das für diese Zellen empfohlene Kultur- und Experimentalmedium „*DMEM/F-12*“ (Gibco, Carlsbad) verwendet. Dem Medium wurden 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Cell Concepts GmbH, Umkirch), Penicillin G (100 U/mL) (Invitrogen GmbH,

Karlsruhe) und Streptomycin (100 µg/mL) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zugeben.

Tab. 3.1: Die in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien mit zugehöriger Bezugsquelle.

Zelllinie	Zellmedium	Bezugsquelle
Colo741, LS174T	RPMI 1640	Gibco (Katalog Nr.: 22409-031)
HCT116, HT29	McCoy's	Gibco (Katalog Nr.: 26600-080)
SW630	L15	Gibco (Katalog Nr.: 11414-056)
WiDr	DMEM high Glucose	Cell Concepts (Katalog Nr.: 11-L2604-I)
NHDF	FGM 2	PromoCell (Katalog Nr.: C-12302)
HUVEC	ECGM 2	PromoCell (Katalog Nr.: C-12203)
J774	DMEM/F-12	Gibco (Katalog Nr.: 31331-093)

PromoCell: PromoCell GmbH, Heidelberg (<http://www.promocell.com>); Cell Concepts: Cell Concepts GmbH, Umkirch (<http://www.cellconcepts.de>); Gibco: Gibco, (<http://www.lifetechnologies.com>).

PBS („Phosphate buffered saline“)

Die verwendete phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Katalog Nr.: 70011-036) mit einem pH-Wert von 7,2 enthält Natriumchlorid (140 mmol/L), Kaliumchlorid (2,7 mmol/L), Natriumdihydrogenphosphat (7,2 mmol/L) sowie Kaliumhydrogenphosphat (1,47 mmol/L).

Herstellung der Natriumoxamat-Stammlösung (500 mmol/L)

Natriumoxamat (Sigma Aldrich, Katalog Nr.: 02751) wurde in RPMI 1640 - Medium mit 0,5 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma Aldrich, Katalog Nr.: D5879) gelöst und anschließend steril filtriert. Die Stammlösung wurde am Versuchstag frisch angesetzt. Ein möglicher Einfluss von DMSO auf die Vitalität der Zellkulturen wurde in Vorversuchen ausgeschlossen (Abb. 11.3 im Anhang).

Herstellung der α -Cyano-4-Hydroxycinnamat-Stammlösung (100 mmol/L)

α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (α CHC) Pulver (Sigma Aldrich, Katalog Nr.: 476870) wurde in RPMI 1640-Medium mit 5,8 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma Aldrich, Katalog Nr.: D5879) gelöst und anschließend steril filtriert. α CHC

muss vollständig in DMSO gelöst sein, bevor das Kulturmedium RPMI 1640 hinzugefügt werden kann. Die Stammlösung wurde am Versuchstag frisch angesetzt. Die Endkonzentration von DMSO in den Versuchsansätzen lag unter 1 %.

3.2 Zelllinien

Die verwendeten Tumorzelllinien sind in Tab. 3.2 aufgelistet. Kontrollzellen waren NHDF (PromoCell, Heidelberg), HUVEC (PromoCell Heidelberg) und J774 (Cell Concepts, Umkirch) (Tab. 3.2). Einige der ausgewählten humanen Karzinomzelllinien weisen Mutationen im WNT-Signalweg auf; dies entspricht auch der klinischen Situation. Der WNT-Signalweg der benignen Zellen weist keine Mutationen auf (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Die in dieser Arbeit verwendeten kolorektalen Karzinomzelllinien und Kontrollzellen. Bezugsquelle und WNT-Status sind angegeben. Alle Zellen wachsen adhärent.

Zelllinie	Gewebe/Zelltyp	WNT-Status	Bezugsquelle
Colo741	Kolon	Wildtyp ³⁾	SIGMA, Katalog Nr.: 93052621
HCT116	Kolon	β -catenin ^{mut 1)}	DSMZ, Katalog Nr.: ACC 581
HT29	Kolon	APC ^{mut 2)}	DSMZ, Katalog Nr.: ACC 299
LS174T	Rektum	β -catenin ^{mut 1)}	Prof. Dr. Martin Eilers
SW620	Kolon	APC ^{mut 2)}	SIGMA, Katalog Nr.: 87051203
WiDr	Rektum	APC ^{mut 2)}	Prof. Dr. Ulrike Kämmerer
NHDF	Fibroblasten ⁴⁾	Wildtyp ³⁾	PromoCell (Katalog Nr.: C-12302)
HUVEC	Endothelzellen ⁵⁾	Wildtyp ³⁾	PromoCell (Katalog Nr.: C-12203)
J774	Makrophagen ⁶⁾	Wildtyp ³⁾	ECACC (über Cell Concepts, Umkirch)

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (www.dsmz.de); SIGMA: Sigma-Aldrich, St. Louis/USA (www.sigmaaldrich.com); Prof. Dr. Martin Eilers: Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie, Biozentrum, Universität Würzburg; Prof. Dr. Ulrike Kämmerer, Forschungslabor der Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg bezogen über Cell Lines Service (Eppelheim, info@cell-lines-service.de). ¹⁾ Mutation im β -catenin Gen; ²⁾ Mutation im Adenomatous Polyposis Coli Gen; ³⁾ ohne Mutation; ⁴⁾ aus der Vorhaut isoliert; ⁵⁾ aus der Nabelschnur isoliert; ⁶⁾ murine Peritoneal-Makrophagen; ECACC: European Collection of Cell Cultures, Salisbury/UK (<http://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.jsp>).

Zellkultivierung

Alle Tumorzelllinien waren frei von Mykoplasmen. Sie wurden in einem Brutschrank von NUAIRE (NU-5500E, Plymouth, USA) bei 37°C, 5 %iger CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde das Medium gewechselt. Die maximale Anzahl an Zellpassagen betrug 15.

Für die Hypoxieversuche wurden Zellen in Kulturschalen mit 6 Vertiefungen (Greiner Cellstar, Frickenhausen, Katalog Nr.: 657160) oder 96 Vertiefungen (Greiner Cellstar, Frickenhausen, Katalog Nr.: 655180) im jeweiligen Kulturmedium ausgesät und zur Adhärenz über Nacht im Brutschrank belassen. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen RPMI 1640 Medium ausgetauscht und die Kulturschalen in eine Hypoxie-Kammer (Coy Laboratory Products, Michigan/USA, Vertrieb über Toepffer Laborsysteme Göppingen) überführt. Die Kulturen wurden bei 37°C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem Sauerstoffgehalt von 5 % oder 1 % bis zu 120 Stunden inkubiert.

Zellernte

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 5 mL Trypsin / EDTA (0,05 % / 0,22 % in PBS) (Gibco, Carlsbad, Katalog Nr.: 25300-054) vom Boden gelöst und danach einmal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 25 mL phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) bei 250 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem definierten Volumen an Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) bestimmt. Die Zellen wurden hierzu mit Trypanblau (Sigma-Aldrich, Katalog Nr.: T8154) gefärbt.

3.3 Der Kristallviolett-Assay

Prinzip

Der Kristallviolett-Assay (KVA) ist ein Vitalitäts-Assay, mit dem die Anzahl lebender adhärenter Zellen photometrisch bestimmt wird. Der KVA eignet sich besonders gut, um die zytotoxische Wirkung von Substanzen zu untersuchen (Pfetzer N, 2011). Das Prinzip der Färbung beruht darauf, dass Kristallviolett (Sigma, Katalog Nr.: C32675-25g) an die DNA fixierter Zellen bindet. Die Men-

ge des gebundenen Kristallvioletts korreliert mit der Anzahl der adhärenen Zellen. Zellen, die ihre Adhärenz verloren haben, sind avital und werden während der Färbeprozedur mit dem Überstand entfernt (Flick DA, Gifford GE, 1984). Mit Essigsäure wird der zellgebundene Farbstoff gelöst und die Färbung bei 570 nm photometrisch im ELISA Reader gemessen.

Durchführung

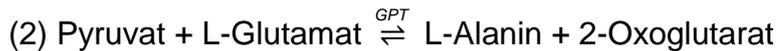
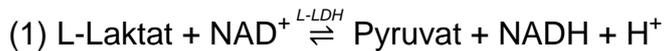
Der KVA wurde in Kulturschalen mit 96 Vertiefungen (Greiner Cellstar, Frickenhausen, Katalog Nr.: 655180) durchgeführt. Pro Vertiefung wurden 5 000 Zellen in RPMI 1640 Medium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde bei einem Teil der Kulturschalen die Ausgangszellzahl (Aussaat) bestimmt. Bei den übrigen Kulturschalen wurde das Medium vollständig gewechselt und die Kulturen anschließend für 24, 48, 72 oder 120 Stunden inkubiert. Hierzu wurde der gesamte Überstand abgesaugt und verworfen. Daraufhin wurden zur Fixierung der Zellen in jede Vertiefung 100 µL Methanol (Sigma, Katalog Nr.: 32213) pipettiert. Nach 10 Minuten wurde das Methanol entfernt und in jede Vertiefung 100 µL einer 0,5 % Kristallviolett-Lösung (bestehend aus $\frac{1}{4}$ Methanol und $\frac{3}{4}$ PBS) zugegeben. Nach 10 Minuten wurde die Kristallviolett-Lösung entfernt und die Kulturschalen wurden viermal mit destilliertem Wasser gespült. Zum Trocknen wurden die Schalen ohne Deckel für 30 Minuten unter den Abzug gelegt. Daraufhin wurden 200 µL 10 %ige Essigsäure (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Katalog Nr.: 3738.1) in jede Vertiefung pipettiert, die Schalen für 30 Minuten auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur inkubiert und die Färbeintensität photometrisch bestimmt.

3.4 Bestimmung von Laktat und Glukose

Überstände aus Kulturflaschen oder Zellkulturschalen wurden zuvor mit 250 g für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und bei -20°C bis zur Bestimmung von Laktat und Glukose gelagert. Das Zellpellet wurde verworfen.

Laktat

Laktat wurde photometrisch im Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg durch Messung von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) bestimmt. Die Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ wird durch zwei Enzymreaktionen beeinflusst.



Die Reaktion der ersten Gleichung (1) wird durch das Enzym Laktatdehydrogenase B (auch L-LDH genannt) katalysiert; dabei liegt das Gleichgewicht sich auf der Seite von L-Laktat. Durch die zweite Enzymreaktion (Gleichung 2) mit der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) wird das Gleichgewicht der ersten Reaktion auf die Seite von Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ verschoben. Die Menge an reduziertem NAD^+ ($\text{NADH} + \text{H}^+$), die photometrisch bei 340 nm gemessen wird, ist gleich der Menge an L-Laktat.

Glukose

Glukose wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg mit Hilfe der Hexokinase (HK; cobas® c 701) gemessen. Hexokinase katalysiert die Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-Phosphat (G-6-P). Für diese Reaktion wird ATP benötigt (Gleichung 3).



G-6-P wird durch die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PD) in Anwesenheit von NADP^+ zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert, dabei entsteht $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Gleichung 4).



Die durch Glucose-6-Phosphatdehydrogenase gebildete Menge an $\text{NADH} + \text{H}^+$ ist direkt proportional zur Glukosekonzentration und wird photometrisch bei 340 nm gemessen.

Auswertung

Die Menge an gebildetem Laktat bzw. verbrauchter Glukose im Zellkulturüberstand wurde durch Differenzbildung mit dem Programm „Excel 2007“ berechnet. Hierzu wurde die Konzentration an Laktat und Glukose im Medium vor Inkubation bestimmt.

3.5 Western Blot-Analysen

Prinzip

Die Western Blot-Technik ist ein Nachweisverfahren für Proteine in einem Proteingemisch. Nach elektrophoretischer Trennung des Proteingemisches werden die Proteine auf eine Trägermembran übertragen („geblottet“) und mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht (Immunoblot). Hierzu wird der proteinbindende primäre Antikörper durch einen zweiten, enzymmarkierten (Meerrettichperoxidase, HRP) Antikörper nachgewiesen. Dabei oxidiert die Meerrettichperoxidase das Chemilumineszenzreagenz Luminol und das dabei emittierte Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm belichtet (schwärzt) einen entsprechend empfindlichen Röntgenfilm.

Durchführung

Eine Million Zellen wurden in einem Reaktionsgefäß bei 250 g für 5 Minuten zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Das Zellpellet wurde mit RIPA-Puffer (Thermo Fisher, Pierce), der zusätzlich noch Protease- und Phosphatase-Inhibitoren enthielt, lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford Assay (Roti-Quant, Carl-Roth GmbH, Katalog Nr.: K015.3) bestimmt. Jeweils 30 µg Protein einer Probe wurden pro Geltasche in ein 9 %iges Agarosegel (Amresco, Katalog-Nr. J234) aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 80 Volt für 30 Minuten und bei 120 Volt für 150 Minuten. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran (2 µm Porengröße, Hartenstein, Katalog Nr.: BA 83) übertragen. Anschließend wurde der Transfer durch Färbung mit Ponceau-Rot (Sigma, Katalog Nr.: P7170-1L) überprüft. Die Antikörper zum Nachweis von LDH-A, LDH-B, MCT-1, MCT-4 und β -Aktin sowie die Sekundärantikörper sind in Tab. 3.3 aufgelistet. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde

mit dem Chemilumineszenz-Reagenz ECL (GE Healthcare, Amersham, Katalog Nr.: 2132) gestartet. Der Proteinstandard von Fermentas, Life Science (Katalog Nr.: SM0671) wurde zur Größenbestimmung verwendet.

Tab. 3.3: Primäre und sekundäre Antikörper für die Western Blot-Analysen.

Name	Firma	Katalog Nr.:	Endkonzentration	Größe (kDa)
MCT1	Sigma	HPA003324	1:500	48 kDa
MCT4	Sigma	HPA021451	1:1.000	43 kDa
LDHA	abcam	ab47010	1:20.000	36 kDa
LDHB	abcam	ab75167	1:40.000	37 kDa
β-Aktin	abcam	Ab8226	1:7.500	42 kDa
Anti-Mouse	KPL	074-1806	1:10.000	-----
Anti-Rabbit	invitrogen	A-10547	1:15.000	-----

¹⁾ Beide sekundären Antikörper wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 2 %iger Magermilchlösung inkubiert.

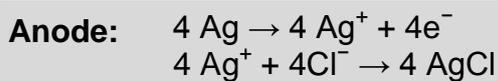
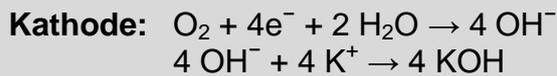
3.6 Messungen zum Sauerstoffverbrauch mit der Clark-Elektrode

Der Sauerstoffverbrauch der mitochondrialen Atmungskette wurde mit einer Clark-Elektrode (Hansatech, Norfolk/Großbritannien) gemessen. Hierzu wurden 1×10^7 Zellen in RPMI 1640-Medium oder in KHEMA-Puffer in einer Messkammer mit 1 mL Volumen bei 37°C inkubiert. KHEMA-Puffer enthält folgende Komponenten: 145 mmol/L Kaliumchlorid (KCl), 5 mmol/L Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 0,1 mmol/L Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) 30 mmol/L HEPES, 3 mmol/L Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 0,1 % Albumin bei einem pH-Wert von 7,4.

Messprinzip der Clark-Elektrode

Mit der Clark-Elektrode wird der Sauerstoffverbrauch amperometrisch bestimmt. Hierzu besteht die Clark-Elektrode von Hansatech aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode (Referenzelektrode), die über eine 0,24 mmol/L Elektrolytlösung (KCl) in Verbindung stehen. Von der Messprobe (=10 Millionen Zellen in 1 mL) sind beide Elektroden durch eine sauerstoffdurchlässige Teflon (PTFE)-Membran getrennt. An der Platin-Kathode liegt eine Polarisierungsspannung von

-0,8 V gegen die Silber-Anode an. Der Sauerstoff in der Messkammer diffundiert aufgrund unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke zwischen Membranaußen- und Innenseite durch die Membranfolie zur Kathode. Der Sauerstoff wird an der Kathode reduziert, wobei Hydroxid-Ionen (OH^-) entstehen. An der Anode wird Silber zu Silberchlorid oxidiert:



Der dabei entstehende Elektrolysestrom I ist direkt proportional zum Sauerstoffpartialdruck p in der Messkammer: $p(\text{O}_2) \sim I$ (Clark LC et al., 1953).

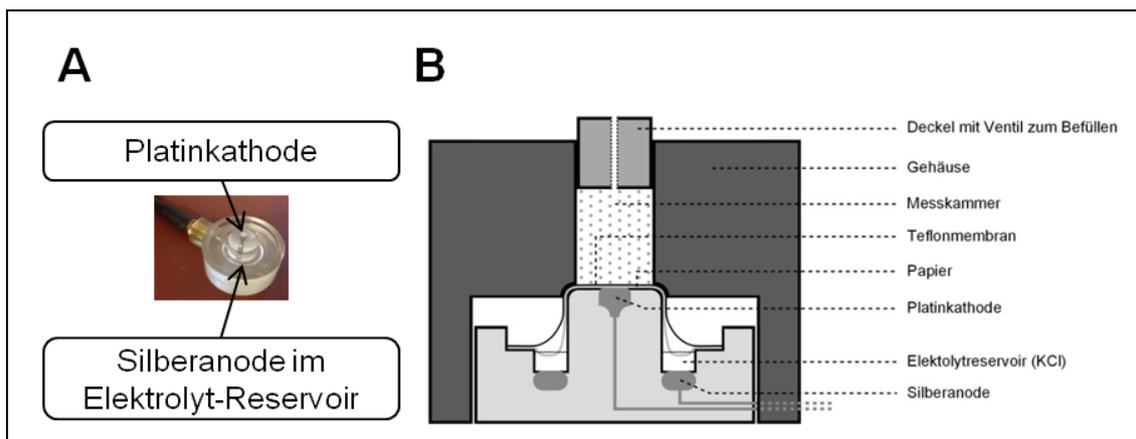


Abb. 3.1: Aufbau der Clark-Elektrode. **A)** Die Clark-Elektrode der Firma Hansatech. **B)** Schematischer Querschnitt durch die Hansatech Clark-Elektrode im messbereiten Zustand. Hierzu befindet sich die Elektrode in einem Gehäuse unterhalb der Messkammer mit einem Volumen von 1 mL. Die sauerstoffdurchlässige Teflonmembran trennt die Clark-Elektrode von der Messkammer. Das zwischen der Teflonmembran und der Platinkathode befindliche Papier ist mit Elektrolytlösung aus dem Reservoir benetzt und stellt die Verbindung zwischen Kathode und Anode her. Eigener Entwurf.

Regulation der Atmungskette

Unter physiologischen Bedingungen ist der Elektronentransport eng mit der Phosphorylierung gekoppelt. Die Kontrolle der Atmungsgeschwindigkeit erfolgt dabei über die Konzentration an ADP in der Zelle. Steigende Konzentrationen an ADP sind ein Zeichen dafür, dass der ATP-Gehalt abnimmt. Das ADP/ATP-Verhältnis beeinflusst entscheidend die Geschwindigkeit der Atmungskette

(Wiedemann J, 2012). Um nach Chance und Williams die maximale Geschwindigkeit der Atmungskette exakt bestimmen zu können, ist es notwendig, dass Sauerstoff, Reduktionsäquivalente (= Substrate) und ADP in einem optimalen Verhältnis vorliegen (Chance B, Williams GR, 1955). Hierzu haben die Autoren fünf Phasen für die amperometrische Messung zum Sauerstoffverbrauch und damit zur Atmungsgeschwindigkeit definiert (Abb. 3.2).

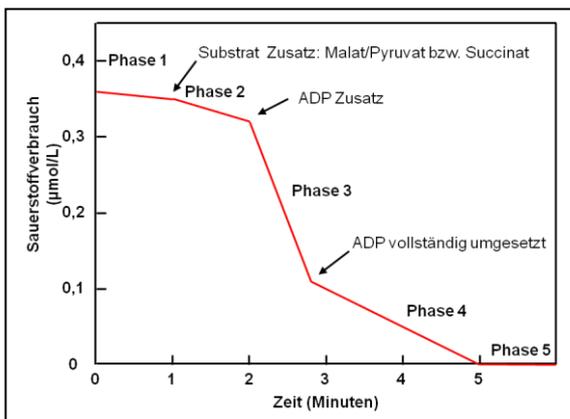


Abb. 3.2: Grafische Darstellung der 5 Phasen zum Sauerstoffverbrauch durch die Atmungskette. Grafik nach Dr John Illingworth PhD, Cambridge.⁹⁾ Siehe auch Tab. 3.4.

Phase 1 kennzeichnet den basalen Sauerstoffverbrauch einer Zelle, wofür endogene Substrate verbraucht werden (Brugger H, 2006). Dabei kommt es zu einem Mangel an Substraten und zu einer Anreicherung von ADP. Um die Limitierung an Substraten zu überwinden, werden Pyruvat, Malat und Succinat als Elektronendonatoren von außen zugegeben. Durch entsprechende Dehydrogenasen werden Elektronen (Wasserstoff) von Pyruvat und Malat auf NAD^+ und von Succinat auf FAD übertragen (Hofhaus G et al., 1996). Die Komplexe I und II der Atmungskette werden hierdurch „energetisiert“, d.h. sie erhalten in ausreichendem Maße Elektronen. Liegt nun ADP im Überschuss vor, dann ist der Sauerstoffverbrauch am größten und die Geschwindigkeit der Atmungskette maximal (Phase 3). Der Sauerstoffverbrauch verringert sich, wenn die ADP-Konzentration immer weiter abfällt (Phase 4). In der letzten Phase (Phase 5) ist der Sauerstoff vollständig verbraucht, und die Zellen gehen in die anaerobe Energiegewinnung über (Chance B, Williams GR, 1955; Brugger H, 2006; Wiedemann J, 2012).

⁹⁾ Grafik aus: <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/OxPh/oxygraph.htm>

Tab. 3.4: Die fünf Phasen zum Sauerstoffverbrauch durch die Atmungskette. Die fünf Phasen hierzu wurden 1955 durch Chance und Williams beschrieben (**Chance B, Williams GR, 1955**). Siehe hierzu auch Abb. 3.2 und Text.

	Im Überschuss vorhanden	Atmungsgeschwindigkeit begrenzt durch
Phase 1	O ₂	ADP und Substrat
Phase 2	O ₂ , ADP	Substrat
Phase 3	O ₂ , ADP, Substrat	Maximalgeschwindigkeit
Phase 4	O ₂ , Substrat	ADP
Phase 5	ADP, Substrat	O ₂

Messungen zum Sauerstoffverbrauch

Für die Messungen wurden 1×10^7 intakte Zellen in 1 mL frischer Pufferlösung (s. o.) eingesetzt. Durch entsprechende Bedingungen in der Messkammer (Abb. 3.1) ist es möglich, den Sauerstoffverbrauch durch Komplex I und Komplex II getrennt zu messen.

Messungen zum Sauerstoffverbrauch durch Komplex I:

Die Zellen wurden mit 1 mL frischer Pufferlösung in der Messkammer (Abb. 3.1) für 1 Minute inkubiert. Anschließend wurden nacheinander folgende Reagenzien zu den Zellen hinzugegeben:

- (1) 1 μ L 10 % Digitonin; hierdurch werden die Membranen (Plasma- und Mitochondrienmembran) für ADP durchlässig¹⁰⁾; Inkubationszeit: 30 Sekunden.
- (2) 5 μ L Pyruvat (1 mol/L) und 5 μ L Malat (1 mol/L); Inkubationszeit: 30 Sekunden (Phase 2).
- (3) 3,1 μ L ADP (40 mmol/L) zum Einleiten von Phase 3 (Tab. 3.4), in der die maximale Geschwindigkeit der Atmungskette bestimmt wird. Ist ADP vollständig verbraucht, normalisiert sich die Sauerstoffrate wieder (Phase 4).

Messungen zum Sauerstoffverbrauch durch Komplex II:

- (1) 1 μ L 10 % Digitonin (s. oben): Inkubationszeit: 30 Sekunden.

¹⁰⁾ Digitonin bindet an das intrazelluläre membrangebundene Cholesterol und permeabilisiert hierdurch die Zellmembran selektiv, ohne dabei Mitochondrien und andere Zellorganellen zu schädigen (Hofhaus G et al., 1996; Shrov V et al., 2007).

(2) 5 µL Rotenon (0,2 mmol/L) zur Hemmung von Komplex I und 5 µL Succinat (1 mol/L) zur Aktivierung von Komplex II; Inkubationszeit: 30 Sekunden (Phase 2).

(3) 3,1 µL ADP (40 mmol/L) zum Einleiten von Phase 3 (Tab. 3.4), in der die maximale Geschwindigkeit der Atmungskette bestimmt wird. Ist ADP vollständig verbraucht, normalisiert sich die Sauerstoffrate wieder (Phase 4).

Messungen zum Sauerstoffverbrauch der Atmungskette mit Oligomycin¹¹⁾ und FCCP¹²⁾

Für diese Messungen wurden 1×10^7 intakte Zellen mit 1 mL frischem RPMI 1640 Medium in der Messkammer (Abb. 3.1) inkubiert. Der basale Sauerstoffverbrauch (BASIS) wurde nach 1,5 Minuten bestimmt (Abb. 3.2). Anschließend wurden nacheinander folgende Reagenzien zu den Zellen hinzugegeben:

(1) 2 µL Oligomycin (1 mmol/L); Inkubationsdauer: 1,5 Minuten

(2) 1,5 µL einer 1 mmol/L FCCP-Lösung in Abständen von 30 Sekunden und zwar solange, bis der maximale mitochondriale Sauerstoffverbrauch erreicht wird.

(3) 1 µg / mL Myxothiazol (Endkonzentration) zur Blockade von Komplex III der Atmungskette. Hierdurch wird der mitochondriale Sauerstoffverbrauch gehemmt und der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch bestimmbar (Garedew A, Moncada S, 2008). Die Zugabe von Myxothiazol muss bei einer Sauerstoffkonzentration von mindestens 60 nmol/mL erfolgen, um zu verhindern, dass die Wirkung des Inhibitors durch eine zu geringe Sauerstoffkonzentration in der Messkammer verfälscht wird.

¹¹⁾ Oligomycin A hemmt die ATP-Synthase, wodurch der Einstrom von Protonen durch die ATP-Synthase verringert wird und die Bildung von ATP sich verlangsamt.

¹²⁾ Carbonylcyanid-p-trifluoroethoxyphenylhydrazon ist ein künstlicher Entkoppler (Protonophore) der Atmungskette. FCCP unterbricht die Koppelung von Oxidation und Phosphorylierung durch Abbau des mitochondrialen Membranpotentials, d.h. der Elektronenfluss läuft vollständig ab, führt jedoch nicht mehr zum Aufbau eines Protonengradienten und damit zur Bildung von ATP (Garedew A, Moncada S, 2008; Brand MD, Nicholls DG, 2011; Hill BG et al., 2012). So kann der Elektronenfluss an der Atmungskette gemessen werden, ohne dass dieser durch Störgrößen auf die ATP-Bildung gemindert wird.

Auswertung

Der Sauerstoffverbrauch wurde mit dem Computerprogramm „O2view Version 1.04“ (Hansatech Instruments, Norfolk/Großbritannien) gemessen und ausgewertet. Aus der Steigung des Kurvenverlaufs zum Sauerstoffgehalt wird der Verbrauch an Sauerstoff berechnet. Abb. 3.3 zeigt exemplarisch einen solchen Kurvenverlauf in mmol/mL.

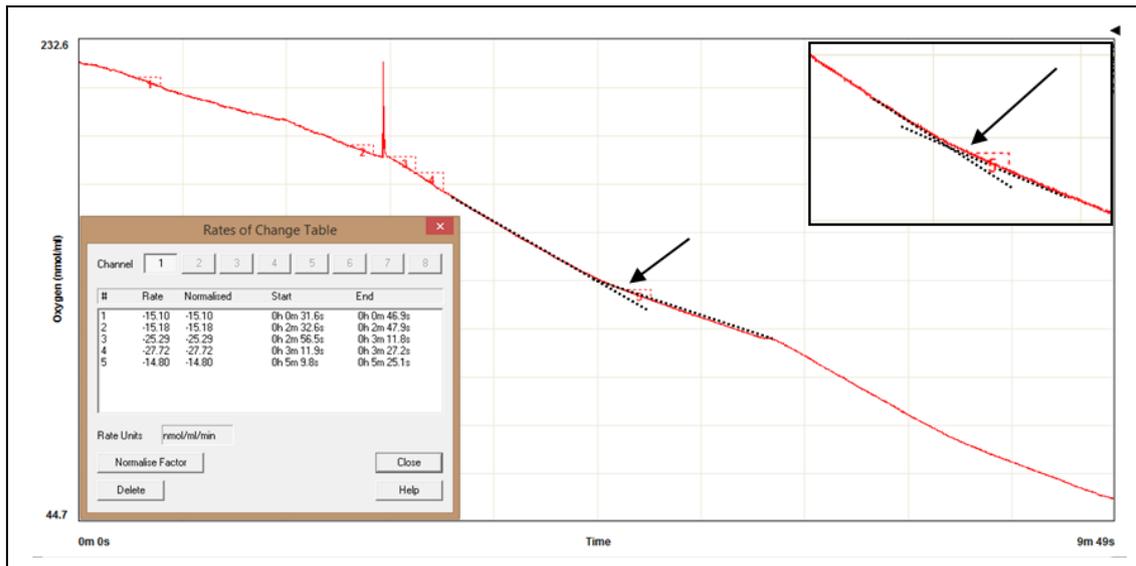


Abb. 3.3: Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs durch Komplex II bei der Zelllinie SW620. Beispiel eines Kurvenverlaufs (rote Linie) aufgezeichnet durch das Programm „O2view Version 1.04“. Der Pfeil verdeutlicht den Übergang von Phase 3 zu Phase 4 und ist definiert als der Schnittpunkt der beiden digital eingezeichneten Tangenten, dargestellt als gepunktete Linien, die die beiden Steigungen des Funktionsgraphen für diesen Bereich angeben. Die Messpunkte im Diagramm geben die im Intervall von 15 Sekunden berechneten Steigungen (engl. „Rate“) zur Bestimmung der mitochondrialen Atmung an. Messpunkt 1: Basaler Sauerstoffverbrauch (Phase 1); Messpunkt 2: Phase 2; Messpunkt 3-5: Phase 3 mit Messpunkt 4, an dem der maximale mitochondriale Sauerstoffverbrauch bestimmt wird; Messpunkt 5: Beginn Phase 4. Zu den Phasen der mitochondrialen Atmung siehe auch Tab. 3.4.

Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs durch die Atmungskette in Gegenwart von Oligomycin wurde eine durchschnittliche Inkubationszeit von 30 Sekunden bei einer Messzeit von 1,5 Minuten zugrunde gelegt (s.o.). Für Messungen zum Sauerstoffverbrauch durch Komplex I und Komplex II wurde eine Messzeit von 15 Sekunden gewählt. Nach Zugabe von ADP wurde in Phase 3 (Abb. 3.2) der maximale Sauerstoffverbrauch bestimmt. Phase 4 wurde erreicht, wenn die Phosphorylierung des zugefügten ADP abgeschlossen war. Der Übergang von Phase 3 zu Phase 4 wird in der Sauerstoffverbrauchskurve an

der plötzlichen Abnahme des Sauerstoffverbrauches ersichtlich (Abb. 3.3). Der Sauerstoffverbrauch in $\mu\text{mol/L}$ pro Sekunde für 10^6 Zellen wird nach folgender Formel errechnet (Herst PM, Berridge MV, 2007):

$$\frac{\text{Steigung} \times \text{O}_2 \text{ Ausgangskonzentration } (\mu\text{mol/L})}{30\text{s (bzw. 15s)} \times 10} = \mu\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Auf Basis des Sauerstoffverbrauchs wurden folgende Parameter berechnet:

- [Basaler Sauerstoffverbrauch, BASIS]: Der basale Sauerstoffverbrauch wird in Phase 1 berechnet (Tab. 3.4), wofür endogene Substrate verbraucht werden (Brugger H, 2006).
- [ATP-Umsatz, OxPh]: Die Differenz zwischen dem basalen Sauerstoffverbrauch (BASIS) und dem von Oligomycin unabhängigen Sauerstoffverbrauch (OLIGO) ist ein Maß für die Stärke der ATP-Synthese und damit für den Sauerstoffverbrauch durch oxidative Phosphorylierung (OxPh). Da Bildung und „Verbrauch“ von ATP miteinander eng verknüpft sind, ist dieser Messwert auch ein Maß für den ATP-Umsatz, der auch als „ATP Turnover“ bezeichnet wird (Garedew A, Salvador M, 2008; Brand MD, Nicholls DG, 2011).
- [Respiratorische Reservekapazität, RRK]: Die Differenz zwischen dem durch FCCP entkoppelten maximalen Sauerstoffverbrauch (FCCP) und dem basalen Sauerstoffverbrauch (BASIS). Die RRK ist eine Messgröße für den mitochondrialen Energiestatus der Zelle und wird durch Zelldifferenzierung, Zellteilung, aber auch durch die Reaktion auf Stress beeinflusst (Hill BG et al., 2012) und stellt ein Maß für die Anpassung des Elektronentransports an einen erhöhten Energiebedarf dar (Brand MD, Nicholls DG, 2011).
- [Nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch, NMO₂]: Der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch (= Myxothiazol¹³⁾ empfindlicher Sauerstoffverbrauch) wird verursacht durch Desaturasen und Enzyme zur Detoxifizierung (Brand MD, Nicholls DG, 2011). Dieser nicht-mitochondriale

¹³⁾ Myxothiazol hemmt Komplex III der Atmungskette wodurch ein Sauerstoffverbrauch durch die Mitochondrien verhindert wird (Garedew A, Moncada S, 2008).

Sauerstoffverbrauch benötigt ca. 10 % des gesamten Sauerstoffverbrauches (Brand MD, Nicholls DG, 2011; Hill BG et al., 2012).

- [Respiratorischer Kontrollindex, RKI]: Der Index stellt den Quotienten aus Steigung (=Sauerstoffverbrauch) Phase 3 (optimale Bedingungen durch ADP Zugabe) und Steigung Phase 4 (ADP Verbrauch) dar (Chance B, Williams GR, 1955; Shroff V et al., 2007; Hill BG et al., 2012). Der RKI gibt an, wie gut Protonenfluss und Phosphorylierung miteinander gekoppelt sind, was Auswirkungen auf ATP-Bildung hat, und ist der aussagekräftigste Wert zur Beurteilung der mitochondrialen Funktion. Dabei gilt, je kleiner Quotient, desto schlechter die Abstimmung zwischen Protonenfluss und Phosphorylierung, was auf eine ineffektive Atmung und mögliche Schädigung der Mitochondrien hindeutet (Brand MD, Nicholls DG, 2011).
- [Phosphat-Sauerstoff(Oxygen)-Quotient, P:O-Quotient]: Seine Berechnung erfolgt nach folgender Formel ¹⁴⁾:

$$P:O = \frac{125 * \mu\text{mol/L ADP}}{\frac{1}{2} (O_2 \text{ Gehalt Startphase 4 } (\mu\text{mol/L}) - O_2 \text{ Gehalt Startphase 3 } (\mu\text{mol/L}))}$$

Der P:O-Quotient ist ein Maß für die Effektivität der Atmung und gibt die maximale Anzahl an ATP Molekülen an, die gebildet werden können, wenn ein Elektronenpaar die Atmungskette durchläuft und auf ein Sauerstoffatom übertragen wird (Brand M, 2005; Brand MD, Nicholls DG, 2011). Der P:O-Quotient wird aus der zugegebenen Menge an ADP (hier 125 $\mu\text{mol/L}$) und dem Verbrauch an molekularem Sauerstoff (O_2) während der Phase 3 bezogen auf 1 Mol Sauerstoffatom berechnet. Das Volumen der Kammer geht ebenfalls in die Formel ein. Da mit einem Volumen von 1 mL gearbeitet wurde, bleibt die Formel unverändert. Die von $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 an die Atmungskette abgegebenen Elektronen unterscheiden sich in ihrer Energie (Kapitel 1.3). Damit unterscheiden sich beide Reduktionsäquivalente auch im P:O-Quotienten: Beim $\text{NADH} + \text{H}^+$ werden pro Sauerstoffatom 2,31 Mole-

¹⁴⁾ Nach Dr John Illingworth, Cambridge; <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/OxPh/oxygraph.htm>.

küle ATP gebildet (P:O-Quotient: 2,31) und beim FADH_2 werden pro Sauerstoffatom 1,38 Moleküle ATP gebildet (Brand M, 2005).

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Excel 2007 der Firma Microsoft. Bei Wiederholungen der Messungen wurden Mittelwert und Standardabweichung gebildet. Die Zellvitalität wurde zum besseren Vergleich zwischen den Zelllinien auf die Aussaat in Prozent umgerechnet. Die statistischen Tests zur Signifikanzberechnung wurden mit dem Programm GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Hierzu wurde der „ANOVA-Test“ für den Vergleich von 2 Gruppen bzw. der „Kruskal-Wallis-Test“ mit „Dunn's post-hoc Test“ für den Vergleich mehrerer Gruppen verwendet. Unterschiede von $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Die Darstellung der Graphen erfolgte mit GraphPad Prism 6.0.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung kolorektaler Karzinomzelllinien

Das Zellwachstum wurde bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff bestimmt. Aus Tab. 4.1 wird ersichtlich, dass alle Zelllinien bei der nicht physiologischen Sauerstoffkonzentration von 21 % das stärkste Zellwachstum aufwiesen. Bei einer Sauerstoffkonzentration von 5 % verlängerten sich die Verdopplungszeiten beim Großteil der Zelllinien um ca. 1/3 und bei WiDr und J774 sogar um ca. 2/3. Bei 1 % Sauerstoff verlangsamte sich erwartungsgemäß das Zellwachstum weiter und die Verdopplungszeiten verlängerten sich um das bis zu 6-fache (WiDr).

Tab. 4.1: Bestimmung der Verdopplungszeiten. Die Verdopplungszeiten in Tagen (angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung von bis zu drei unabhängigen Versuchen) wurden mit folgender Formel berechnet: $[\text{LOG}(2) \times \Delta t] / [\text{LOG}(\text{Zellzahl nach 3 Tagen in Kultur}) - \text{LOG}(\text{Zellaussaat zum Zeitpunkt } t_0)]$. Alle Zellen wurden in RPMI 1640 Medium für 72 Stunden inkubiert und die Zellzahl mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Hierzu wurden jeweils 5.000 Tumorzellen und $1,5 \times 10^6$ J774-Zellen ausgesät.

Zelllinie	Sauerstoffkonzentration		
	21 %	5 %	1 %
Colo741	1,1 \pm 0,1	1,5 \pm 0,5	3,1 \pm 0,7
HCT116	1,0 \pm 0,0	1,3 \pm 0,2	2,0 \pm 0,5
HT29	1,3 \pm 0,1	2,7 \pm 1,2	3,9 \pm 1,8
LS174T	1,1 \pm 0,1	1,6 \pm 0,3	4,6 \pm 1,6
SW620	1,1 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1	3,3 \pm 0,5
WiDr	1,4 \pm 0,1	2,4 \pm 0,9	8,7 \pm 3,8
J774	1,9 \pm 0,2	3,4 \pm 1,1	5,0 \pm 3,4

Auch wenn sich die Verdopplungszeiten bei 5 % und 1 % Sauerstoff im Vergleich zu 21 % Sauerstoff mehr als verdoppelten, belegen die Daten doch, dass die Zellen bei beiden Sauerstoffkonzentrationen wachsen. Zusätzlich zur Bestimmung der Verdopplungszeiten wurde der Anteil toter Zellen in den Kulturen ermittelt (Abb. 4.1). Dabei war festzustellen, dass insbesondere bei Kulturen der Karzinomzelllinien LS174T, Colo741 und SW620 der Anteil toter Zellen bei 1 % Sauerstoff nach drei Tagen in Kultur um bis zu 50 % ansteigen konnte. Der große Anteil an toten Zellen scheint eher Ausdruck einer stärkeren Empfindlichkeit dieser Zellen auf eine Ansäuerung mit Laktat zu sein (Tab. 4.4) als die Un-

fähigkeit, per se mit den Sauerstoffverhältnissen zurecht zu kommen. Eine Korrelation zwischen der Verdopplungszeit und dem Anteil an toten Zellen scheint es nicht zu geben. Untersuchungen bei einer Sauerstoffkonzentration von 1 % sind somit prinzipiell möglich.

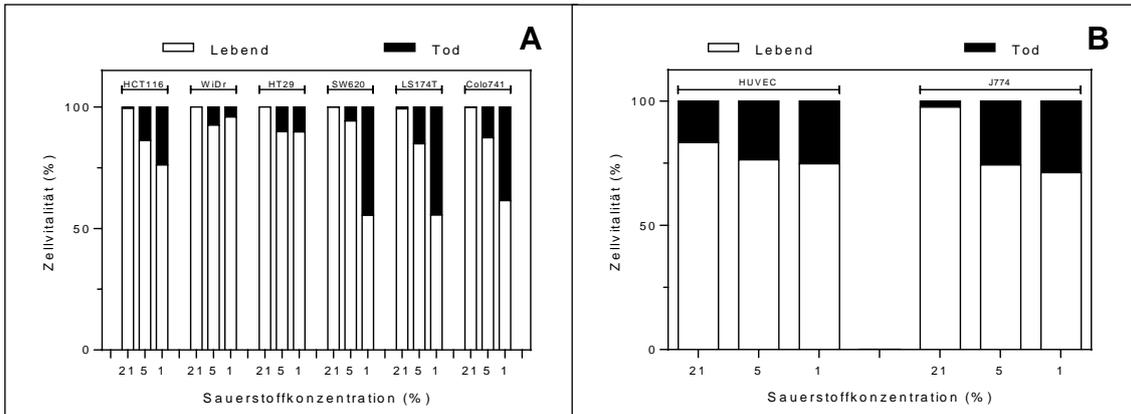


Abb. 4.1: Zellvitalität von kolorektalen Karzinomzellen (A) und Kontrollzellen (B) bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff. Anteil lebender (weiß) und toter (schwarz) Zellen im RPMI 1640 Medium bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen. Die Werte basieren auf bis zu zwei unabhängigen Versuchen. Mit abnehmender Sauerstoffkonzentration nimmt der Anteil toter Zellen unterschiedlich stark zu. Siehe auch Abb. 11.2 im Anhang.

Die Expression von LDH-A, LDH-B, MCT-1 und MCT-4 auf Proteinebene wurde für die in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen Zelllinien nachgewiesen (Abb. 4.2). Auch HUVEC und NHDF waren positiv für LDH-A, LDH-B, MCT-1 und MCT-4. Der Nachweis der LDH- und MCT-Expression bei den kolorektalen Zelllinien war Voraussetzung, um mit Untersuchungen zum antiproliferativen Effekt beider Hemmstoffe Natriumoxamat (NaOx) und α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (α CHC) beginnen zu können (Kap. 4.4-4.8).

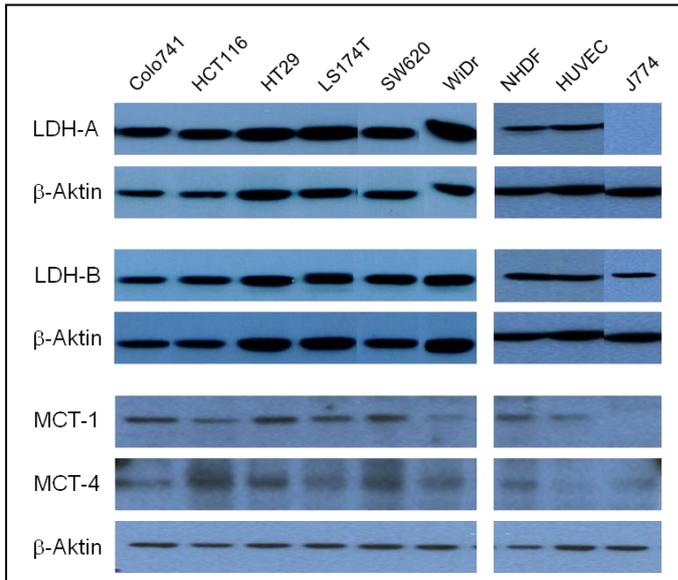


Abb. 4.2: Expression von LDH-A, LDH-B, MCT-1 und MCT-4 bei 21% Sauerstoff. Die Molekulargewichte sind 36 kDa für LDH-A, 37 kDa für LDH-B, 48 kDa für MCT-1 und 43 kDa für MCT-4. Zu den Nachweisantikörpern siehe Tab. 3.3. (Originalblots in Abb. 11.17 und Abb. 11.18 im Anhang).

4.2 Untersuchungen zur Effektivität der Atmungskette

Um die Funktion der Atmungskette kolorektaler Karzinomzelllinien und Kontrollzellen (HUVEC, J774) vergleichen zu können, wurde der P:O-Quotient und der respiratorische Kontrollindex RKI (Kapitel 3.6) bestimmt (Tab. 4.2). Mit diesen beiden wichtigen Kenngrößen zur Überprüfung der Funktion der Atmungskette wird zum einen die ATP-Bildung (P:O-Quotient) und zum anderen die Stärke der Kopplung von Protonenfluss mit der Phosphorylierung von ADP (RKI) bestimmt.

Für die Karzinomzelllinie SW620 wurde ein P:O-Quotient von 2,15 für Komplex I ermittelt, der dem theoretischen Wert von 2,31 (Kapitel 3.6) sehr nahe kommt. Für die Tumorzelllinien Colo741, HCT116, HT29, LS174T und WiDr wurde ein P:O-Quotient ermittelt, der bis zu 46 % unter dem theoretischen Wert liegt. Diese Beobachtung gilt auch für den Komplex II (Tab. 4.2). Hier lag der P:O-Quotient für die Karzinomzelllinien bis zu 50 % unter dem theoretischen Wert von 1,38. Einzige Ausnahme war die Karzinomzelllinie SW620 mit einem P:O-Quotienten von $1,18 \pm 0,07$. J774 Zellen wiesen mit $1,17 \pm 0,14$ einen P:O-Quotienten nahe am theoretischen Wert auf. HUVEC Zellen wiesen mit $2,93 \pm 1,27$ einen extrem hohen P:O-Quotienten auf, der, wie die große Standardabweichung und die begrenzte Stichprobengröße (Tab. 4.2) vermuten lassen, von begrenzter Aussagekraft ist.

Werden die für J774 Zellen gemessenen P:O-Quotienten für Komplex I und Komplex II als Grundlage zur Beurteilung der Funktion der Atmungskette der Karzinomzelllinien herangezogen, so wird deutlich, dass bei fünf der sechs Karzinomzelllinien sowohl Komplex I als auch Komplex II eine bis zu 40 % verringerte Bildung an ATP aufweisen als J774 Zellen. Werden zum Vergleich die theoretischen Werte für den P:O-Quotienten berücksichtigt, so verringerte sich der Anteil an gebildetem ATP sogar um bis zu 50 %. Einzig die Zelllinie SW620 stellt eine Ausnahme dar (Tab. 4.2).

Der respiratorische Kontrollindex RKI als weitere Kenngröße zur Beurteilung der Funktion der Atmungskette erlaubt eine Aussage darüber, wie gut der Protonenfluss mit der Phosphorylierung von ADP gekoppelt ist. Da dies die Synthese von ATP beeinflusst, kann mit dem Kontrollindex RKI die Effektivität der Atmungskette hinsichtlich des Protonengradienten beurteilt werden - zusätzlich zur Beurteilung des Elektronenflusses, der zur Berechnung des P:O-Quotienten herangezogen wird. Wird der respiratorische Kontrollindex von HUVEC und J774 Zellen, der zwischen 1,71 und 1,94 liegt (Tab. 4.2), als Referenz für die getesteten Karzinomzelllinien herangezogen, dann bestätigt sich für diese Zellen, die einen respiratorischen Kontrollindex zwischen 1,18 und 1,66 aufweisen, dass ihre Atmungskette tatsächlich ineffektiver zu sein scheint (Tab. 4.2). Einzig SW620 stellt mit Werten von 2,31 für Komplex I und 1,66 für Komplex II erneut eine Ausnahme dar.

Tab. 4.2: Kenngrößen zur Abschätzung der Funktion der Atmungskette von kolorektalen Karzinomzellen und Kontrollzellen (HUVEC, J774). Die Ergebnisse (Mittelwert \pm Standardabweichung von bis zu vier unabhängigen Versuchen) sind als P:O-Quotient und respiratorischer Kontrollindex RKI angegeben.

Zelllinie	Komplex I		Komplex II	
	P:O ¹⁾	RKI ²⁾	P:O ¹⁾	RKI ²⁾
Colo741	1,47 \pm 0,02	1,66 \pm 0,12	0,85 \pm 0,11	1,40 \pm 0,05
HCT116	1,51 \pm 0,09	1,51 \pm 0,25	0,80 \pm 0,12	1,34 \pm 0,08
HT29	1,44 \pm 0,21	1,18 \pm 0,03	0,69 \pm 0,17	1,19 \pm 0,06
LS174T	1,24 \pm 0,38	1,57 \pm 0,12	0,71 \pm 0,15	1,36 \pm 0,08
SW620	2,15 \pm 0,33	2,31 \pm 0,27	1,18 \pm 0,07	1,66 \pm 0,17
WiDr	1,60 \pm 0,14	1,47 \pm 0,11	0,84 \pm 0,05	1,31 \pm 0,06
HUVEC	-----	-----	2,93 \pm 1,27 ³⁾	1,92 \pm 0,30 ³⁾
J774	2,84 \pm 0,53	1,94 \pm 0,66	1,17 \pm 0,14	1,71 \pm 0,35

¹⁾ Der P:O-Quotient gibt den Anteil an ATP Molekülen an, die gebildet werden, wenn ein Elektronenpaar die Atmungskette durchläuft und auf ein Sauerstoffatom (Formel siehe Kapitel 3.6) übertragen wird. Die maximale Ausbeute an ATP beträgt dabei über Komplex I pro Molekül NADH+H⁺ ca. 2,31 Moleküle ATP bzw. über Komplex II pro Molekül FADH₂ ca. 1,38 Moleküle ATP (Brand M, 2005; Brand MD, Nicholls DG, 2011); ²⁾ Der respiratorische Kontrollindex RKI ist ein Maß für die Mitochondrienfunktion (ein niedriger Wert weist auf eine mögliche Schädigung der Mitochondrien hin); ³⁾ N=2.

Die gemessenen Auffälligkeiten im P:O-Quotienten und beim respiratorischen Kontrollindex RKI bei fünf der sechs Karzinomzelllinien (Colo741, HCT116, HT29, LS174T, WiDr) sind ein Indiz dafür, dass bei diesen Zellen die mitochondriale ATP-Synthese zwar beeinträchtigt ist, aber nicht vollständig funktionslos. Von diesen fünf kolorektalen Zelllinien zu unterscheiden sind eindeutig SW620 Zellen, die für Komplex I und Komplex II jeweils die höchsten Werte beim P:O-Quotienten und respiratorischen Kontrollindex RKI aufweisen. Dies kann als Indiz gewertet werden, dass diese Zellen einen Stoffwechsel aufweisen, der mehr dem Stoffwechsel nicht-maligner Kontrollzellen als dem von Karzinomzellen ähnelt. Die Untersuchungen zum Verbrauch an Glukose und zur Bildung von Laktat stützen diese Annahme (Kap. 4.3).

Die Ursachen für die nachweisbar verminderte Funktion der Mitochondrien von Colo741, HCT116, HT29, LS174T und WiDr können vielfältig sein. So kann ein

von der Atmungskette unabhängiger Sauerstoffverbrauch den ATP-Umsatz mindern, da Sauerstoff als Akzeptor für Elektronen aus der Atmungskette nicht mehr uneingeschränkt zur Verfügung steht. Dies verringert den Sauerstoffverbrauch durch die Atmungskette und damit den ATP-Umsatz (gemessen als OxPh). Ergänzend zum mitochondrialen Sauerstoffverbrauch wurde der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch, verursacht durch Desaturasen und Enzyme zur Detoxifizierung, mit der NMO_2 -Messung bestimmt. Um diese Messungen durchführen zu können, ist als erstes zu überprüfen, ob sich kolorektale Karzinomzellen und Kontrollzellen in ihrem basalen Sauerstoffverbrauch (BASIS) unterscheiden. Ist dies der Fall, dann sind die Voraussetzungen gegeben (Brand MD, Nicholls DG, 2011; Hill BG et al., 2012), um die Parameter OxPh und NMO_2 zu bestimmen. Die Angaben hierzu in der Tabelle beziehen sich immer auf 10^6 Zellen (Tab. 4.3).

Der für die Karzinomzellen ermittelte basale Sauerstoffverbrauch (Tab. 3.4) lag zwischen $13,8$ und $19,2 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \times \text{s}^{-1}$ (im Mittel $15,77 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \times \text{s}^{-1}$). Die Kontrollzellen HUVEC und J774 wiesen mit Werten von $6,4$ und $14,2 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \times \text{s}^{-1}$ tendenziell niedrigere Werte auf als die Karzinomzellen. Der für HUVEC ermittelte basale Sauerstoffverbrauch unterschied sich um 59 % vom mittleren Sauerstoffverbrauch für die Karzinomzellen. Dieser Unterschied betrug bei J774 Zellen lediglich 10 %. Somit waren HUVEC als Kontrollen zur Bestimmung der Parameter OxPh und NMO_2 ungeeignet. Auffällig war, dass LS174T und SW620 Zellen einen um 22 % bzw. 35 % erhöhten basalen Sauerstoffverbrauch aufwiesen als J774 Zellen. Dieser auf einen erhöhten Umsatz endogener Substrate beruhender Unterschied deutet möglicherweise auf einen gesteigerten Stoffwechsel in diesen Zellen hin (Abb. 3.2).

Kolorektale Karzinomzellen und benigne J774 Zellen wiesen einen vergleichbaren, durch die Atmungskette verursachten Sauerstoffverbrauch als Marker für den ATP-Umsatz auf („OxPh“, Tab. 4.3). Dieser betrug für J774 Zellen $10,9 \pm 3,0 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \times \text{s}^{-1}$ und für die Karzinomzelllinien im Durchschnitt $11,1 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \times \text{s}^{-1}$. Colo741 Zellen wiesen mit $9,6 \pm 2,5 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \times \text{s}^{-1}$ den geringsten Umsatz an ATP und LS174T mit $13,7 \pm 3,8 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \times \text{s}^{-1}$ den

höchsten Umsatz an ATP auf. Der gesteigerte Grundumsatz von LS174T und SW620 Zellen (s. oben) korreliert ebenfalls mit einem gesteigerten ATP-Umsatz. Der gesteigerte ATP-Umsatz an der Atmungskette von LS174T und SW620 Zellen korreliert mit dem gesteigerten Grundumsatz (BASIS) dieser Zellen (Tab. 4.3).

J774 Zellen wiesen einen nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (NMO_2) von $0,2 \pm 0,2 \times 10^{-6} \text{ mol/L x s}^{-1}$ auf. In diesem Bereich lag auch der für SW620 bestimmte Sauerstoffverbrauch von $0,1 \pm 0,1 \times 10^{-6} \text{ mol/L x s}^{-1}$. Für alle anderen Karzinomzelllinien lag der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch höher und reichte von $0,5 \pm 0,1 \times 10^{-6} \text{ mol/L x s}^{-1}$ für HT29 Zellen bis $1,3 \pm 0,5 \times 10^{-6} \text{ mol/L x s}^{-1}$ für HCT116 Zellen. Die Schwankungen der Messwerte lassen aber keine statistisch signifikanten Unterschiede zu (Tab. 4.3).

Als Ursache für den verringerten P:O-Quotienten und respiratorischen Kontrollindex RKI bei fünf von sechs Karzinomzelllinien (Colo741, HCT116, HT29, LS174T WiDr) konnten stoffwechselspezifische Besonderheiten ausgeschlossen werden. So unterschieden sich diese Zellen untereinander nicht in ihrem basalen Sauerstoffverbrauch (BASIS), mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (OxP) und nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (NMO_2). Sie wiesen auch keine Unterschiede zu SW620 Zellen bzw. Kontrollzellen auf (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Basaler Sauerstoffverbrauch (BASIS), Sauerstoffverbrauch durch oxidative Phosphorylierung (OxPh, ATP-Umsatz), nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch (NMO₂) und respiratorische Reservekapazität (RRK) von kolorektalen Karzinomzellen und Kontrollzellen (HUVEC, J774). Die Werte sind angegeben in 10⁻⁶ mol/L x s⁻¹ für 10⁶ Zellen und basieren auf bis zu drei unabhängigen Versuchen. Für die Versuche wurden die Zellen in RPMI 1640 Medium bei 37°C inkubiert.

Zelllinie	BASIS ¹⁾	OxPh ²⁾	NMO ₂ ³⁾	RRK ⁴⁾
Colo741	13,8 ± 3,1	9,6 ± 2,5	0,5 ± 0,1	13,1 ± 1,0
HCT116	15,0 ± 1,4	10,6 ± 0,6	1,3 ± 0,5	15,3 ± 2,8
HT29	14,9 ± 2,9	10,7 ± 2,6	0,5 ± 0,5	22,5 ± 3,1
LS174T	19,2 ± 4,8	13,7 ± 3,8	0,7 ± 0,6	20,0 ± 4,7
SW620	17,4 ± 0,9	11,5 ± 0,8	0,1 ± 0,1	20,8 ± 1,3
WiDr	14,3 ± 3,9	10,5 ± 3,1	0,8 ± 0,6	25,3 ± 5,4
HUVEC ⁶⁾	6,4 ± 1,2	k.d. ⁵⁾	k.d. ⁵⁾	k.d. ⁵⁾
J774	14,2 ± 3,6	10,9 ± 3,0	0,2 ± 0,2	4,1 ± 4,2

¹⁾ Der Sauerstoffverbrauch der Zellen zum Aufrechterhalten der basalen Zellfunktionen. ²⁾ OxPh: berechneter Sauerstoffverbrauch durch oxidative Phosphorylierung, der Rückschlüsse auf den ATP-Umsatz (oder „ATP Turnover“) zulässt. ³⁾ Nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch Siehe auch Tab. 11.1. ⁴⁾ Die respiratorische Reservekapazität ist eine Messgröße für den mitochondrialen Energiestatus der Zelle und stellt ein Maß für die Anpassung des Elektronentransports an einen erhöhten Energiebedarf dar. ⁵⁾ keine Daten vorhanden. ⁶⁾ N=2.

4.3 Biochemische Untersuchungen zum Glukosestoffwechsel

Zur Analyse des Glukosestoffwechsels wurden bis zu 1,5x10⁶ Zellen in eine Kulturschale mit sechs Vertiefungen ausgesät. Bei einer Konfluenz von 90-100 % wurde das Medium gewechselt und nach Zugabe von frischem RPMI 1640 Medium die Zellen für 48 Stunden bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die Zellen geerntet und der Anteil lebender und toter (Trypanblau-positiver) Zellen bestimmt. Die Werte für Glukose- und Laktat (in mol/L) wurden auf 1x10⁶ Zellen umgerechnet (Tab. 4.4). Zellen sämtlicher Zelllinien, auch die Kontrollzellen, zeigten mit abnehmender Sauerstoffkonzentration einen erhöhten Glukoseverbrauch um bis zu 75 %, den sog. „Pasteur-Effekt“ (Tab. 4.4 und Abb. 11.4).

Tab. 4.4: Glukoseverbrauch und Laktatbildung bei 5 % und 1 % Sauerstoff. Die Werte sind in 10^{-9} mol/L x min^{-1} für 10^6 Zellen angegeben. Die Messwerte (Mittelwert \pm Standardabweichung) basieren auf bis zu drei unabhängigen Versuchen. Das Medium war stets RPMI 1640. Die Werte bei 21 % Sauerstoff sind in Tab. 11.2 für die Karzinomzelllinien bzw. in Tab. 11.3 für die Kontrollzellen aufgeführt. Hinweis: Da thermodynamisch relevante Größen wie Temperatur und Druck bei den Experimenten nicht konstant gehalten wurden, sind die Messdaten und die hierauf beruhenden Berechnungen als Tendenzen zu werten.

Zelllinie	Glukoseverbrauch		Laktatbildung	
	5 %	1 %	5 %	1 %
Colo741	1.196,0 \pm 257,8	1.636,5 \pm 212,8	2.757,8 \pm 546,8	3.738,8 \pm 215,9
HCT116	772,5 \pm 111,2	1.797,6 \pm 455,0	1.660,1 \pm 309,0	4.060,3 \pm 1003,2
HT29	601 \pm 140,9	1.041,7 \pm 123,4	1.152 \pm 282,9	1.979,3 \pm 393,5
LS174T	1.052,7 \pm 174,1	2783,6 \pm 619,6	2.359,7 \pm 247,2	6.326,4 \pm 981,7
SW620	463,2 \pm 48,3	735,8 \pm 157,9	1.039,2 \pm 32,3	1.703,3 \pm 489,1
WiDr	632 \pm 100,1	1.106,2 \pm 433,6	1.232,2 \pm 241,4	2.267,3 \pm 834,1
J774	635,5 \pm 163,5	961,0 \pm 445,3	1.312,4 \pm 360,0	2.243,3 \pm 1049,4
HUVEC	495,1 \pm 182,3	828,6 \pm 272,5	1.094,6 \pm 369,5	1.822,9 \pm 564,7

Die unterschiedlich starke Laktatbildung bei 5 % Sauerstoff (Warburg-Effekt) wurde genutzt, um die kolorektalen Karzinomzellen in drei Kategorien einzuteilen: Colo741 und LS174T als starke Laktatbildner mit einer Rate von über 2.000×10^{-9} mol/L x min^{-1} ; HCT116, HT29 und WiDr als mittelstarke Laktatbildner mit einer Rate zwischen 1.100 und 1.700×10^{-9} mol/L x min^{-1} (in diese Gruppe gehören auch J774 Zellen) und SW620 (zusammen mit HUVEC) als schwacher Laktatbildner mit einer Rate von ca. 1000×10^{-9} mol/L x min^{-1} . Diese Einteilung gilt auch für die Laktatbildung bei 21 % Sauerstoff (Tab. 11.2).

Am Beispiel von Colo741 und SW620 Zellen ist gut zu erkennen, dass in Krebszellen der glykolytische und oxidative Glukoseabbau in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander steht. Beide Zelllinien weisen einen sehr guten P:O-Quotienten für Komplex I und Komplex II als Hinweis auf eine gute Mitochondrienfunktion auf (Tab. 4.2), gehören aber zu unterschiedlichen Kategorien der Laktatbildner.

Der Pasteur- und Warburg-Effekt sind für die beiden Kolonkarzinomzelllinien Colo741 und WiDr exemplarisch dargestellt (Abb. 4.3). Die Zellen unterscheiden sich deutlich in ihrem Glukoseverbrauch bei 5 %, aber auch bei 1 % (Hypoxie) Sauerstoff (Abb. 4.3).

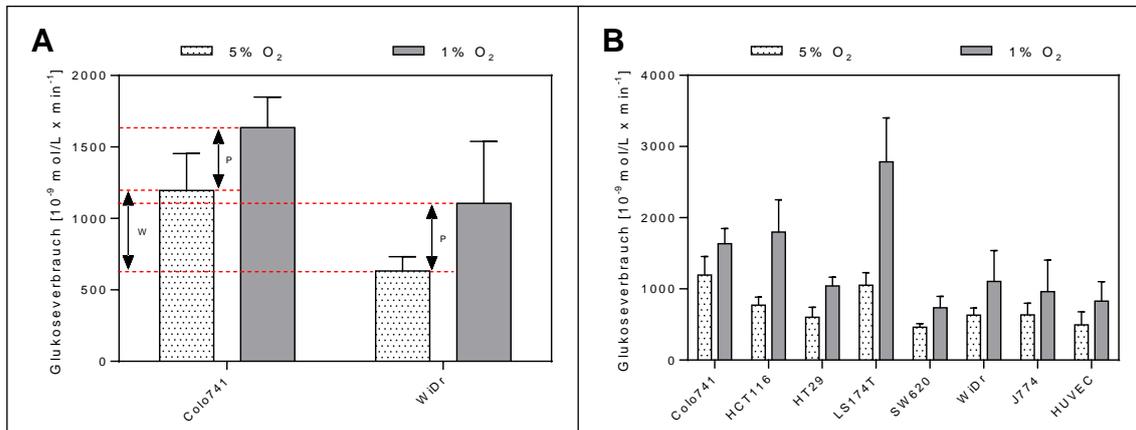


Abb. 4.3: Glukoseverbrauch bei 5 % und 1 % Sauerstoff. Der Glukoseverbrauch von Colo741 und WiDr (A) und sämtlicher Zelllinien (B). Die Versuche wurden im RPMI 1640 Medium durchgeführt und basieren auf drei unabhängigen Versuchen („biologische Replikate“). Die Messwerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung für 1 Million Zellen angegeben. Für die beiden kolorektalen Zelllinien Colo741 und WiDr ist exemplarisch gezeigt, dass der Glukoseverbrauch durch Sauerstoff reguliert wird (Pasteur-Effekt, „P“) und bei Anwesenheit von Sauerstoff (5 %) geringer ist als in Hypoxie (1 % Sauerstoff). Der Warburg-Effekt („W“), also der Anteil an Glukose, der in Gegenwart von Sauerstoff in Laktat übergeht, ist am Beispiel der Colo741 und WiDr Zellen als Differenz im Glukoseverbrauch bei 5 % Sauerstoff angegeben.

Der Glukoseverbrauch zwischen 1 % Sauerstoff und der unphysiologischen Kontrolle von 21 % Sauerstoff unterscheidet sich wie erwartet ebenfalls deutlich (Anhang Abb. 11.5, Abb. 11.6).

Die in Tab. 4.4 aufgeführten Messdaten und die Stöchiometrie zwischen Glukoseverbrauch und Laktatbildung (1 mol Glukose \rightarrow 2 mol Laktat) erlauben eine Abschätzung, wie viel von der verbrauchten Glukose durch oxidative Phosphorylierung und zur Bildung für Laktat verstoffwechselt wurde.

Aus Abb. 4.4 ist zu erkennen, dass sämtliche Tumorzelllinien bei 21 % Sauerstoff gleichzeitig atmen und gären. Mit abnehmender Sauerstoffkonzentration wurde immer mehr Glukose zu Laktat reduziert. Bei 1 % Sauerstoff wiesen sämtliche Zelllinien einen Gärstoffwechsel auf.

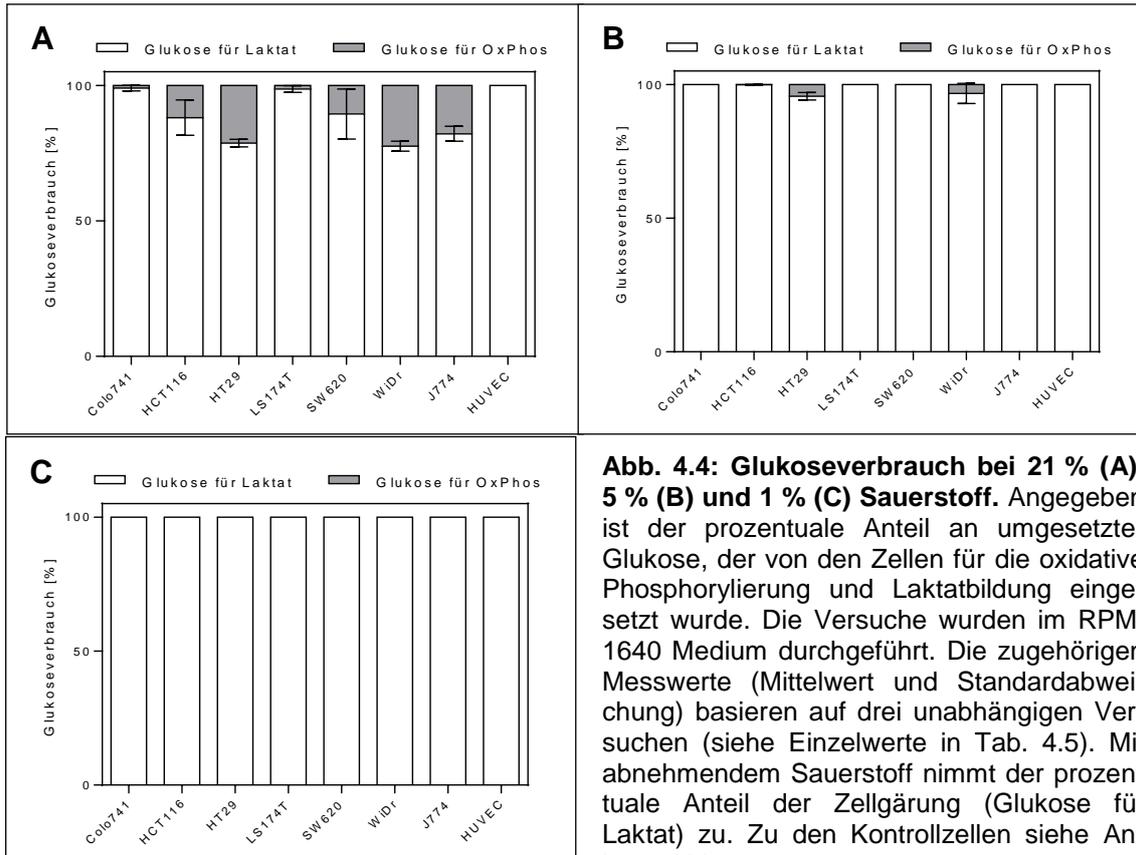


Abb. 4.4: Glukoseverbrauch bei 21 % (A), 5 % (B) und 1 % (C) Sauerstoff. Angegeben ist der prozentuale Anteil an umgesetzter Glukose, der von den Zellen für die oxidative Phosphorylierung und Laktatbildung eingesetzt wurde. Die Versuche wurden im RPMI 1640 Medium durchgeführt. Die zugehörigen Messwerte (Mittelwert und Standardabweichung) basieren auf drei unabhängigen Versuchen (siehe Einzelwerte in Tab. 4.5). Mit abnehmendem Sauerstoff nimmt der prozentuale Anteil der Zellgärung (Glukose für Laktat) zu. Zu den Kontrollzellen siehe Anhang Abb. 11.7.

Abb. 4.4 verdeutlicht, dass die verstärkte Bildung von Laktat in Gegenwart von Sauerstoff zwar eine Eigenschaft von Krebszellen darstellt, dass aber auch Kontrollzellen diese Fähigkeit aufweisen können. Interessanterweise wird diese bereits von Warburg beschriebene Beobachtung, dass der glykolytische Phänotyp oder Warburg-Effekt zwar eine charakteristische, aber keine absolute Eigenschaft maligner Zellen darstellt, vom Großteil der Publikationen zum Thema Tumorstoffwechsel in aller Regel nicht thematisiert.

Die Beobachtung, dass auch humane Endothelzellen (HUVEC) und murine Makrophagen (J774) Laktat in Gegenwart von Sauerstoff bilden, ist sicherlich dem Umstand geschuldet, dass Zellen während ihrer Teilungsphase auf aerobe Glykolyse „umschalten“ (Wang T et al., 1976).

Tab. 4.5: Glukoseverbrauch bei 5 % und 1 % Sauerstoff. Angegeben ist der prozentuale Anteil an umgesetzter Glukose, der von den Zellen für die oxidative Phosphorylierung und Laktatbildung eingesetzt wurde. Alle Messwerte (Mittelwert \pm zugehöriger Standardabweichung) sind in Prozent angegeben und basieren auf den Daten aus Abb. 4.4. Die Versuche wurden in RPMI 1640 Medium durchgeführt. Werte für 21% Sauerstoff in Tab. 11.5. Hinweis: Da thermodynamisch relevante Größen wie Temperatur und Druck bei den Experimenten nicht konstant gehalten wurden, sind die Messdaten und die hierauf beruhenden Berechnungen als Tendenzen zu werten.

	5% Sauerstoff		1 % Sauerstoff	
	OxPh ¹⁾	Laktat ²⁾	OxPh ¹⁾	Laktat ²⁾
Colo 741	-	100	-	100
HCT116	0,1 \pm 0,1	99,9 \pm 0,1	-	100
HT29	4,4 \pm 1,4	96,6 \pm 1,4	-	100
LS174T	-	100	-	100
SW620	-	100	-	100
WiDr	3,1 \pm 4,1	96,9 \pm 4,1	-	100
J774	-	100	-	100
HUVEC	-	100	-	100

¹⁾ OxPh: Prozentualer Anteil der für die oxidative Phosphorylierung eingesetzten Glukose ²⁾ Laktat: Prozentualer Anteil der für die Laktatbildung eingesetzten Glukose. Glukose. (-) kein Messwert, somit kein Nachweis für OxPh.

Die biochemischen Untersuchungen zum Glukosestoffwechsel kolorektaler Karzinomzellen haben somit ergeben, dass fünf der sechs Zelllinien eine deutlich erhöhte Bildung von Laktat aufweisen. Zudem weisen Zellen dieses „glykolytischen“ Phänotyps eine geringere Kapazität der mitochondrialen ATP-Synthese auf (Tab. 4.2). Insbesondere bei diesen fünf Zelllinien sollten deshalb die beiden Stoffwechsellinhibitoren NaOx und α CHC einen deutlichen antiproliferativen Effekt aufweisen.

4.4 IC₅₀-Werte für 5-FU, NaOx und α CHC

Zur Bestimmung der antiproliferativen Effekte von 5-FU, NaOx und α CHC wurde zuerst der jeweilige IC₅₀-Wert bei 21 % Sauerstoff bestimmt. Dieser Wert

gibt die Wirkstoffkonzentration an, bei der ein biologischer Effekt (Zytotoxizität, Zytostase) bei 50 % der Zellen eintritt. Die Berechnung der IC₅₀-Werte stellt nicht nur die einzige mathematische Möglichkeit dar, bei einem sigmoiden Kurvenverlauf eine mathematische Kenngröße exakt zu berechnen und damit das Ansprechen von Zelllinien auf einen Inhibitor miteinander vergleichen zu können, sondern sie erlaubt auch, Konzentrationsbereiche abzuschätzen, in denen der Inhibitor weitestgehend eine spezifische Wirkung aufweist.

Der IC₅₀-Wert für 5-FU wurde für den Konzentrationsbereich von 10⁻⁹ mol/L bis 10⁻¹ mol/L bestimmt (Abb. 4.5). Dabei unterschieden sich die IC₅₀-Werte für die Zelllinien Colo741, HCT116, HT29 und WiDr nicht wesentlich voneinander und lagen in einem Bereich zwischen 3,4x10⁻⁶ mol/L und 5,7x10⁻⁶ mol/L. Für LS174T und SW620 war der IC₅₀-Wert deutlich erhöht und lag bei 8,5x10⁻⁶ und 12,1x10⁻⁶ mol/L (Tab. 4.6). Der IC₅₀-Wert für NaOx wurde für den Konzentrationsbereich von 10⁻⁴ mol/L bis 10⁻¹ mol/L bestimmt. Die IC₅₀-Werte von NaOx für die kolorektalen Zelllinien lagen zwischen 27,2x10⁻³ und 38,6x10⁻³ mol/L (Tab. 4.6). Der IC₅₀-Wert für αCHC wurde für den Konzentrationsbereich von 10⁻⁵ mol/L bis 10⁻² mol/L bestimmt. Die IC₅₀-Werte von αCHC für die kolorektalen Zelllinien lagen zwischen 1,2x10⁻³ mol/L und 3,2x10⁻³ mol/L (Tab. 4.6).

Tab. 4.6: IC₅₀-Werte von 5-Fluoruracil (5-FU), Natriumoxamat (NaOx) und α-Cyano-4-Hydroxycinnamat (αCHC). Die Messwerte (Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall, 95 % KI) repräsentieren 5-8 unabhängige Versuche („biologische Replikate“) für 5-FU und bis zu drei unabhängigen Versuchen für NaOx und αCHC.

Zelllinie	5-FU		NaOx		αCHC	
	Mittelwert [10 ⁻⁶ mol/L]	95 % KI [10 ⁻⁶ mol/L]	Mittelwert [10 ⁻³ mol/L]	95 % KI [10 ⁻³ mol/L]	Mittelwert [10 ⁻³ mol/L]	95 % KI [10 ⁻³ mol/L]
Colo741	3,4	2,7-4,6	30,9	22,2-43,2	2,3	1,5-3,4
HCT116	4,0	3,1-5,1	27,2	19,0-39,0	1,7	1,2-2,3
HT29	5,1	5,2-13,0	31,3	25,4-38,6	1,2	0,9-1,6
LS174T	8,5	6,2-11,6	35,7	26,4-48,3	1,3	1,1-1,5
SW620	12,1	7,6-19,3	38,6	30,8-48,4	3,2	1,9-5,5
WiDr	5,7	3,1-10,1	37,3	28,4-49,1	2,0	1,4-2,9

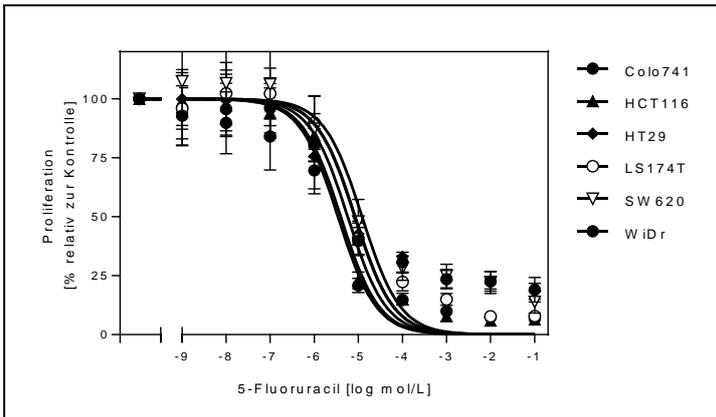


Abb. 4.5: Bestimmung der IC₅₀-Werte von 5-FU für die kolorektalen Karzinomzelllinien. Die Wirksamkeit von 5-FU wurde für einen Konzentrationsbereich von 10⁻⁹ mol/L bis 10⁻¹ mol/L überprüft. Mit dem Computerprogramm „GraphPad Prism 6.04“ wurde der Kurvenverlauf erstellt und die IC₅₀-Werte (Tab. 4.6) wurden berechnet.

4.5 IC₅₀-Werte für die Kombination aus 5-FU und NaOx

Der antiproliferative Effekt für die Kombination aus NaOx und 5-FU wurde als nächstes untersucht. Hierzu wurden für den Konzentrationsbereich von 5-FU (10⁻⁹ mol/L bis 10⁻¹ mol/L) vier Konzentrationen an NaOx überprüft: 20x10⁻³ mol/L, 40x10⁻³ mol/L, 80x10⁻³ mol/L, 100x10⁻³ mol/L. Die Änderung der IC₅₀-Werte für 5-FU durch Zugabe von NaOx ist exemplarisch für die Zelllinie HCT116 in Tab. 4.7 angegeben. Der Vergleich mit den IC₅₀-Werten für 5-FU und NaOx (Tab. 4.6) zeigt eine Zunahme des antiproliferativen Effekts (=Wirksamkeit) durch die Kombination beider Substanzen; erkennbar an der Abnahme der IC₅₀-Werte.

Tab. 4.7: IC₅₀-Werte für die Kombination aus 5-FU (für den Konzentrationsbereich 10⁻⁹ bis 10⁻¹ mol/l) und NaOx (Konzentrationen wie angegeben) am Beispiel der Karzinomzelllinie HCT116. Die Messwerte (Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall, 95 % KI) basieren auf bis zu drei unabhängigen Versuchen („biologische Replikate“). Die IC₅₀-Werte für 5-FU und NaOx sind in Tab. 4.6 aufgeführt. Die IC₅₀-Werte von 5-FU und 5-FU mit 20x10⁻³ mol/L NaOx unterscheiden sich kaum. Durch Zugabe von 40x10⁻³ mol/L NaOx verringert sich der IC₅₀-Wert um den Faktor 1000 auf 7,6x10⁻⁹ mol/L. Für 60x10⁻³ mol/l und 80x10⁻³ mol/l NaOx liegt der Anteil vitaler Zellen bereits für 10⁻⁹ mol/L 5-FU unter 50 %.

NaOx [mol/L]	IC ₅₀ für 5-FU und NaOx	
	Mittelwert [mol/L]	95 % KI [mol/L]
0	3,6 x 10 ⁻⁶	2,5 - 5,2 x 10 ⁻⁶
20 x 10 ⁻³	2,0 x 10 ⁻⁶	0,9 - 4,4 x 10 ⁻⁶
40 x 10 ⁻³	7,6 x 10 ⁻⁹	2,1 - 28 x 10 ⁻⁹
60 x 10 ⁻³	8,2 x 10 ⁻¹⁰	1,1 - 62 x 10 ⁻¹⁰
80 x 10 ⁻³	2,7 x 10 ⁻¹⁰	0,4 - 16 x 10 ⁻¹⁰

In Abb. 4.6 sind die Ergebnisse der Kombinationsversuche aus 5-FU und NaOx graphisch dargestellt. Jede der vier Konzentrationen an NaOx wurde für den Konzentrationsbereich von 5-FU von 10^{-9} mol/L bis 10^{-1} mol/L getestet. Die Wirksamkeit von 5-FU wurde durch Zugabe von NaOx gesteigert. Hierdurch verschiebt sich der Wendepunkt der sigmoiden Kurven ($=IC_{50}$) nach links in Richtung niedriger Konzentrationen an 5-FU.

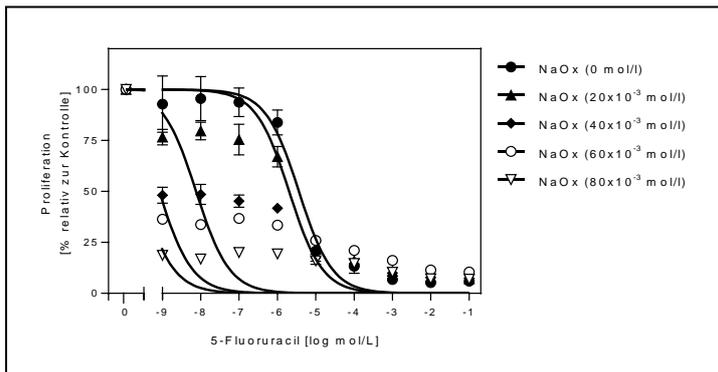


Abb. 4.6: Steigerung der Effektivität von 5-FU durch Zugabe von 20, 40, 80, und 100×10^{-3} mol/L Natriumoxamat (NaOx) am Beispiel der Zelllinie HCT116. Die zugehörigen Messwerte (Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall) sind in Tab. 4.7 angegeben.

In Tab. 4.8 sind die IC_{50} -Werte für die Kombination von 5-FU und NaOx für die Karzinomzelllinien angegeben. Für die Zelllinien HCT116, HT29, Colo741, LS174T und WiDr wurde durch Zugabe von 40×10^{-3} mol/L NaOx zu 5-FU im Konzentrationsbereich von 10^{-9} mol/L bis 10^{-1} mol/L der antiproliferative Effekt von 5-FU um einen Faktor von bis zu 7.000 und für SW620 um mehr als den Faktor 10.000 verstärkt.

Für die nachfolgenden Versuche wurde sich für die Konzentration von 40×10^{-3} mol/L NaOx entschieden, da bei dieser Konzentration noch ein vollständiger Kurvenverlauf über den gesamten Konzentrationsbereich von 5-FU möglich war. Höhere Konzentrationen an NaOx führten bereits bei der niedrigsten Konzentration an 5-FU (10^{-9} mol/L) zu zelltoxischen Effekten; d. h. der Anteil vitaler Zellen verringerte sich um mehr als 50 %.

Tab. 4.8: IC₅₀-Werte für 5-FU und der Kombination aus 5-FU mit 40x10⁻³ mol/L NaOx. Die Messwerte (Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall, 95 % KI) basieren auf bis zu acht unabhängigen Versuchen („biologische Replikate“). Die Zugabe von 40x10⁻³ mol/L NaOx steigerte die Wirksamkeit von 5-FU bei allen Zelllinien.

Zelllinie	5-FU		5-FU + NaOx [40 x10 ⁻³ mol/L]	
	Mittelwert [10 ⁻⁹ mol/L]	95 % KI [10 ⁻⁹ mol/L]	Mittelwert [10 ⁻⁹ mol/L]	95 % KI [10 ⁻⁹ mol/L]
Colo741	3.400	2.700-4.600	1,9	0,6 - 6,6
HCT116	4.000	3.100-5.100	7,6	2,1 - 28
HT29	5.100	5.200-13.000	1,3	0,3 - 5,9
LS174T	8.500	6.200-11.600	9,3	2,2 - 39
SW620	12.100	7.600-19.300	0,029	0,006 – 0,013
WiDr	5.700	3.100-10.100	0,86	0,18 – 0,41

4.6 IC₅₀-Werte für die Kombination aus 5-FU und αCHC

Die Kombination aus 5-FU und αCHC wurde als nächstes untersucht. Hierzu wurden für den Konzentrationsbereich von 5-FU (10⁻⁹ mol/L bis 10⁻¹ mol/L) vier Konzentrationen an αCHC eingesetzt: 1, 2, 4 und 10 mmol/L. Auch für diese Kombination wurden die IC₅₀-Werte bestimmt (Tab. 4.9) Die Zugabe von 2x10⁻³ mol/L αCHC zu 5-FU steigerte den antiproliferativen Effekt von 5-FU um den Faktor 10.000 bei LS174T, um den Faktor 1.000 bei Colo741 und HT29, um den Faktor 100 bei HCT116, um den Faktor 10 bei WiDr und SW620. Die Zugabe von 4x10⁻³ mol/L αCHC zu 5-FU steigerte den antiproliferativen Effekt von 5-FU um den Faktor 10.000 bei allen Karzinomzelllinien.

Für die nachfolgenden Versuche wurde sich für die Konzentration von 2x10⁻³ mol/L entschieden, da bei dieser Konzentration bei allen Tumorzelllinien eine Verstärkung des antiproliferative Effekt von 5-FU durch Zugabe von αCHC gezeigt wurde. Weiterhin entspricht die für αCHC gewählte Konzentration von 2x10⁻³ mol/L in etwa dem Mittelwert der IC₅₀-Werte der sechs Karzinomzelllinien (siehe Tab. 4.6).

Tab. 4.9: IC₅₀-Werte für 5-FU und der Kombination aus 5-FU mit 2x10⁻³ mol/L bzw. 4x10⁻³ mol/L αCHC. Die Messwerte (Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall, 95 % KI) repräsentieren bis zu acht unabhängige Versuche („biologische Replikate“). Die Zugabe von 2 bzw. 4x10⁻³ mol/L αCHC steigert die Wirksamkeit von 5-FU abhängig von der Zelllinie.

Zelllinie	5-FU		5-FU + αCHC [2 x10 ⁻³ mol/L]		5-FU + αCHC [4 x10 ⁻³ mol/L]	
	Mittelwert [10 ⁻⁹ mol/L]	95 % KI ² [10 ⁻⁹ mol/L]	Mittelwert [10 ⁻⁹ mol/L]	95 % KI [10 ⁻⁹ mol/L]	Mittelwert [10 ⁻⁹ mol/L]	95 % KI [10 ⁻⁹ mol/L]
Colo741	3.400	2.700-4.600	1,2	0,3 - 4,8	0,2	0,06 - 0,65
HCT116	4.000	3.100-5.100	84	22 - 320	0,39	0,13 - 0,11
HT29	5.100	5.200-13.000	4,7	0,9 - 25	0,62	0,14 - 0,27
LS174T	8.500	6.200-11.600	0,61	0,18 – 0,2	0,22	0,07 - 0,77
SW620	12.100	7.600-19.300	1.300	300 - 5.300	0,25	0,07 - 0,92
WiDr	5.700	3.100-10.100	140	30 - 680	0,79	0,20 - 3,1

4.7 Antiproliferative Effekte der Kombination 5-FU, NaOx und αCHC

Zur Untersuchung der antiproliferativen Effekte wurden folgende Konzentrationen an 5-FU und den beiden Hemmstoffe basierend auf der Bestimmung der IC₅₀-Werte (Tab. 4.6-4.9) festgelegt: 5-FU: 5x10⁻⁶ mol/L; NaOx: 40x10⁻³ mol/L und αCHC 2x10⁻³ mol/L. Beide Hemmstoffe wurden bei Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % getestet. Die Laktatbildung bei beiden Sauerstoffkonzentrationen durch kolorektale Karzinomzellen wurde gezeigt (Tab. 4.4). Die Zellen wurden für 72 und 120 Stunden inkubiert (Daten für die Inkubationsdauer von 72 Stunden im Anhang).

Die Konzentration an 5-FU von 5x10⁻⁶ mol/L entspricht dem Mittelwert der IC₅₀-Werte für die fünf Karzinomzelllinien Colo741, HCT116, HT29, LS174T und WiDr (Tab. 4.6). Die Wahl für diese Konzentration an 5-FU wurde aus praktischen Erwägungen getroffen, um die Komplexität der zahlreichen Kombinationsansätze nicht zusätzlich durch verschiedene 5-FU-Konzentrationen zu erhöhen. Ein Nachteil dieser Vorgehensweise ist, dass die gewählte Konzentration sich unterschiedlich stark von den IC₅₀-Werten für die einzelnen Zelllinien unterscheidet; am stärksten für SW620. Da Untersuchungen zum antiproliferativen Effekt beider Hemmstoffe (Stoffwechsellinhibitoren) im Vordergrund standen, wurde dieser Nachteil als akzeptabel erachtet.

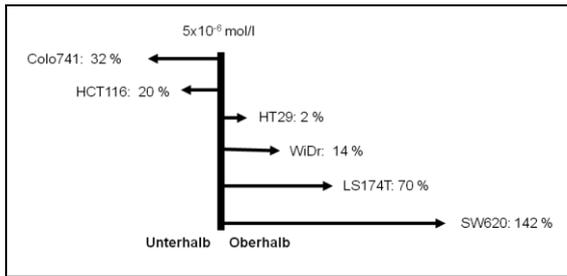


Abbildung 4.7: Darstellung der prozentualen Abweichung der IC_{50} -Werte für die sechs kolorektalen Karzinomzelllinien von der gewählten Konzentration an 5-FU von 5×10^{-6} mol/L.

Zum besseren Überblick der umfangreichen Daten, werden folgende Abb. nachfolgend behandelt:

Abb. 4.8: Der antiproliferative Effekt von NaOx, α CHC und 5-FU.

Abb. 4.9: Der antiproliferative Effekt der Kombination aus NaOx und α CHC im Vergleich zu 5-FU.

Abb. 4.10: Der antiproliferative Effekt der Dreifachkombination aus 5-FU, NaOx und α CHC.

In den Abb. 4.8-4.10 wurde der Anteil vitaler Zellen bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) nach 120 Stunden bestimmt. Abb. 4.8 und Abb. 4.9 unterscheiden sich lediglich darin, dass in Abb. 4.9 der Übersicht wegen die Ergebnisse zu den Einzelsubstanzen weggelassen wurden.

Abb. 4.11: Der antiproliferative Effekt der Zweifach- und Dreifachkombinationen. Der Anteil vitaler Zellen wurde bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) nach neun Tagen bestimmt.

Allgemeine Betrachtungen zu Abb. 4.8:

Wie aufgrund der Daten aus Tab. 4.1 zu erwarten ist, reagierten die unbehandelten Tumorzellen Colo741, HCT116, LS174T und SW620 unterschiedlich auf die veränderten Sauerstoffkonzentrationen. So verringerte sich der Anteil vitaler Zellen bei 5 % Sauerstoff im Vergleich zu 21 % Sauerstoff um ca. 20 %, bei HT29 und WiDr sogar um ca. 50 %. Dem Unterschied in der Zellvitalität bei 21 % und 5 %, der zwar dramatisch sein kann (Abb. 4.8), wird aufgrund der unphysiologischen Sauerstoffkonzentration von 21 % aber keine große Be-

deutung beigemessen. Zudem fällt der Unterschied in der Zellvitalität zwischen 5 % und 1 % Sauerstoff sehr viel geringer aus (Abb. 4.8 und im Anhang Abb. 11.9).

Der antiproliferative Effekt von 5×10^{-6} mol/L 5-FU war bei jeder der sechs Zelllinie unabhängig von der Sauerstoffkonzentration vergleichbar. Der Anteil an vitalen Zellen verdoppelte sich maximal im Beobachtungszeitraum (Abb. 4.8 und im Anhang Abb. 11.9).

Die wachstumsverzögernde Wirkung der Einzelsubstanzen NaOx und α CHC führte mit Ausnahme von SW620 zu einer Abnahme vitaler Zellen um bis zu 47 % nach 72 Stunden bzw. 120 Stunden (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle). Dies gilt für 5 % und 1 % Sauerstoff (Abb. 4.8 und im Anhang Abb. 11.9).

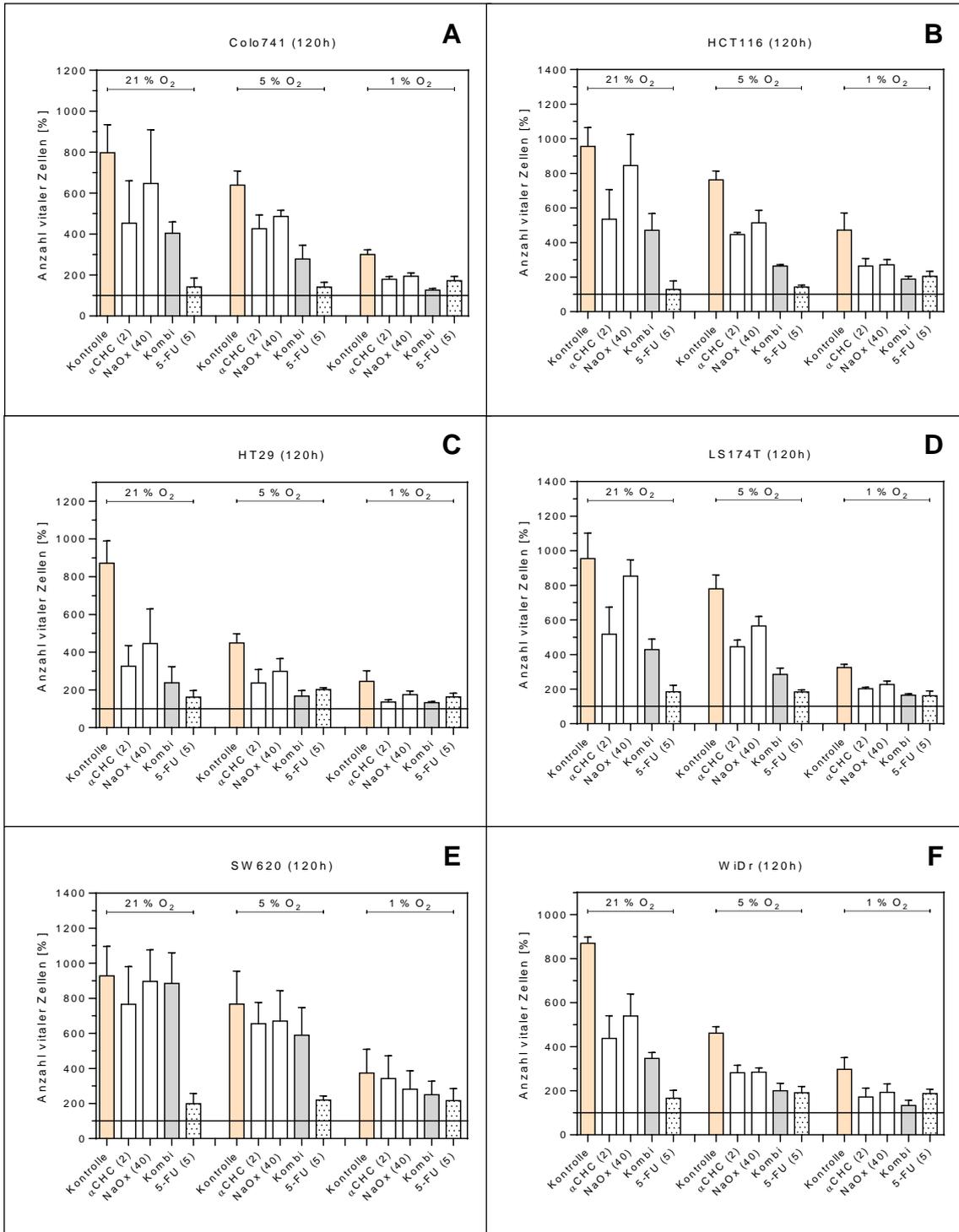


Abb. 4.8: Der antiproliferative Effekt von NaOx, αCHC und 5-FU. Der Anteil vitaler Zellen wurde bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) nach 120 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse (Mittelwert ± Standardabweichung) beruhen auf vier unabhängigen Versuchen und sind bezogen auf die Aussaat (5.000 Zellen pro Vertiefung). Unbehandelte Kontrolle (orange); 2×10^{-3} mol/L αCHC (weiß); 40×10^{-3} NaOx mol/L (weiß); die Kombination aus 2×10^{-3} mol/L αCHC und 40×10^{-3} mol/L NaOx (grau; "Kombi"); 5×10^{-6} mol/L 5-FU (gepunktet).

Antiproliferative Effekte der Zweifachkombination aus NaOx und α CHC (Abb. 4.9)

Der antiproliferative Effekt der beiden einzelnen Hemmstoffe war auch bei den physiologisch relevanten Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % zu beobachten und führte zu einer Abnahme der Zellvitalität von bis zu 47 %. Beide Hemmstoffe in Kombination verringerten den Anteil vitaler Zellen bei fünf von sechs getesteten Karzinomzelllinien (Colo741, HCT116, HT29, LS174T, WiDr) um bis zu 65 % nach 120 Stunden; ein ähnliches Ergebnis wurde nach 72 Stunden gemessen. Dabei war die Kombination aus NaOx und α CHC in den meisten Fällen so wirksam wie 5×10^{-6} 5-FU. Dies gilt für 5 % Sauerstoff und 1 % Sauerstoff (Abb. 4.9 und im Anhang Abb. 11.10). Diese zusätzliche, aber doch begrenzte Abnahme vitaler Zellen lässt keinen Hinweis auf eine additive bzw. synergistische Wirkung zwischen NaOx und α CHC zu.

Von den sechs Karzinomzelllinien reagierten SW620 Zellen wesentlich unempfindlicher auf NaOx und α CHC und zwar nicht nur gegenüber den Einzelsubstanzen, sondern auch in der Kombination. So blieb der Anteil vitaler Zellen bei den behandelten SW620 Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen bei 21 % und 5 % Sauerstoff nach 120 und 72 Stunden nahezu gleich. Bei 1 % Sauerstoff war schließlich ein wachstumsverzögernder Effekt von mehr als 30 % zu messen, vergleichbar einer Monobehandlung mit 5-FU in der Konzentration von 5×10^{-6} (Abb. 4.8 und Abb. 4.9 und im Anhang Abb. 11.9 und Abb. 11.10).

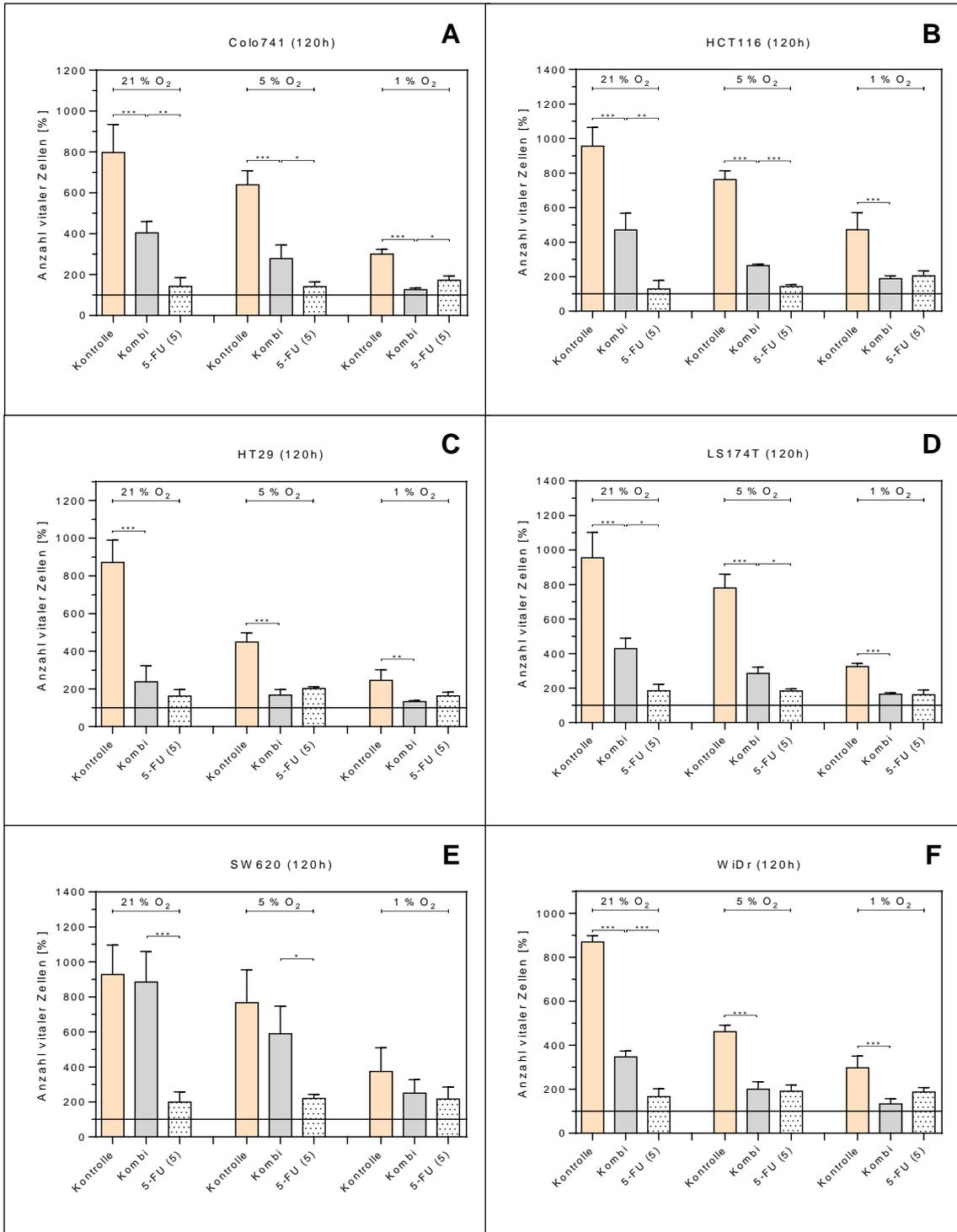


Abb. 4.9: Der antiproliferative Effekt von NaOx, α CHC und 5-FU. Daten wie in Abb. 4.8, aber ohne die Ergebnisse für die Einzelsubstanzen zur besseren Übersicht. Der Anteil vitaler Zellen wurde bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) nach 120 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen berechnet und sind bezogen auf die Aussaat (5.000 Zellen pro Vertiefung). Unbehandelte Kontrolle (orange); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC und 40×10^{-3} mol/L NaOx (grau; "Kombi"); 5-FU 5×10^{-6} mol/L (gepunktet).

Dreifachkombination aus 5FU, NaOx und α CHC (Abb. 4.10)

Während der Einfluss der drei Konzentrationen an 5-FU auf den antiproliferativen Effekt der Dreifachkombination bei 21 % Sauerstoff und der physiologischen Sauerstoffkonzentration von 5 % nachzuweisen war, war dies in Hypoxie, als bei 1 % Sauerstoff, nicht mehr der Fall. Die Kombination von NaOx und α CHC mit 5-FU führte nicht zu einer Zunahme des antiproliferativen Effekts von 5-FU. Additive bzw. synergistische Effekte zwischen 5-FU und den beiden Inhibitoren ließen sich in der Dreifachkombination somit nicht nachweisen.

Die Verringerung der Konzentration an 5-FU auf $0,5 \times 10^{-6}$ mol/L bzw. $0,05 \times 10^{-6}$ mol/L 5-FU in der Dreifachkombination war somit auch ohne eine weitere Steigerung der Wirksamkeit. Dies gilt für einen Inkubationszeitraum von 72 und 120 Stunden. Ein additiver bzw. synergetischer Effekt der Dreifachkombination konnte somit nicht gezeigt werden (Abb. 4.10 und Anhang Abb. 11.11).

In Hypoxie war der antiproliferative Effekt der beiden Inhibitoren offensichtlich und so effektiv wie der von 5-FU. Während sich der Anteil vitaler Zellen bei fünf der sechs kolorektalen Karzinomzelllinien in der Kombination um mehr als die Hälfte verringerte (im Vergleich zu unbehandelten Zellen), nahm der Anteil vitaler Zellen bei SW620 Zellen max. um 30 % ab.

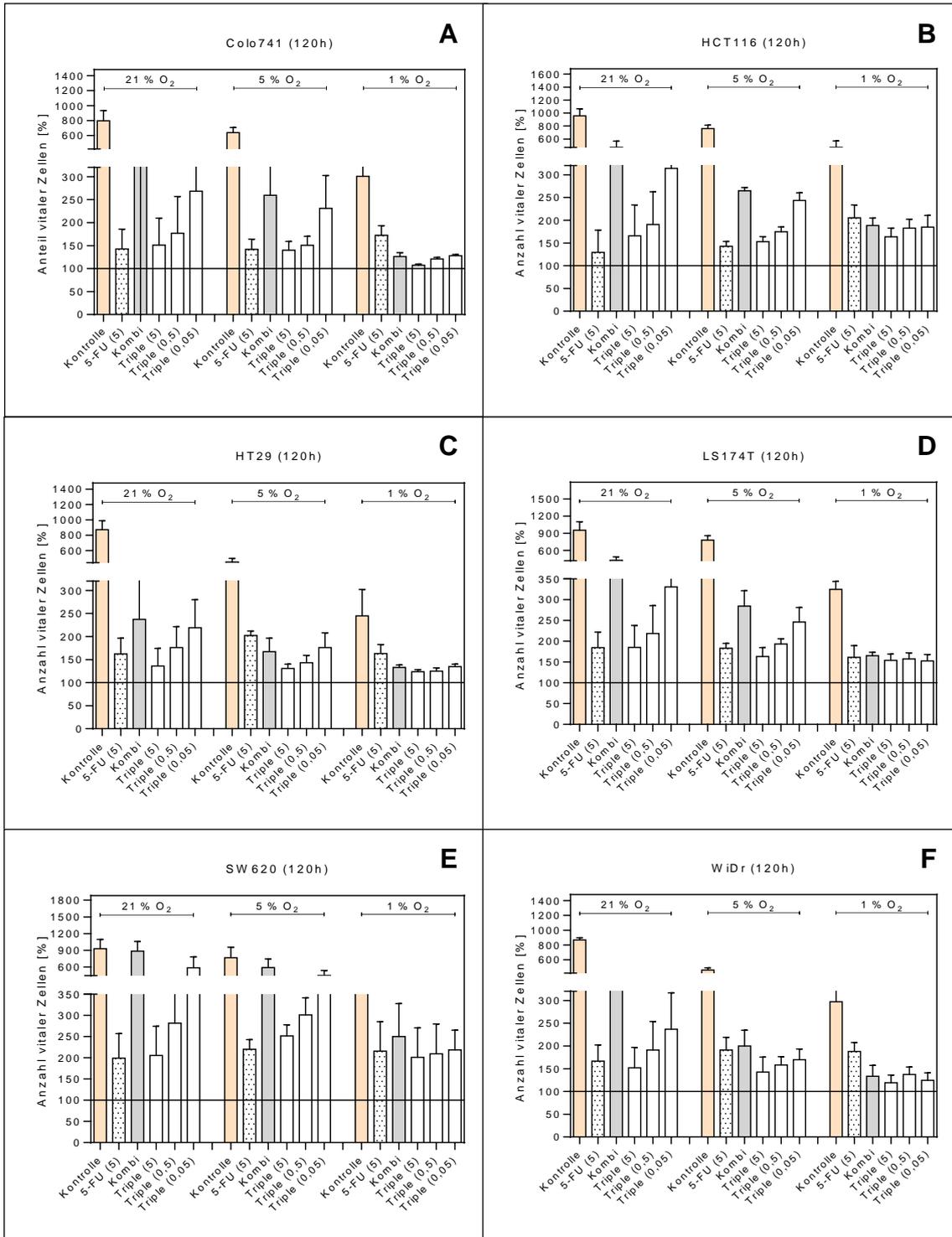


Abb. 4.10: Der antiproliferative Effekt der Dreifachkombination aus 5-FU, NaOx und α CHC. Der Anteil vitaler Zellen bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) wurde nach 120 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen berechnet und sind bezogen auf die Aussaat (5.000 Zellen pro Vertiefung). Unbehandelte Kontrolle (orange); 5-FU 5×10^{-6} mol/L (gepunktet); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC und 40×10^{-3} mol/L NaOx (grau; "Kombi"); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und 5×10^{-6} mol/L 5-FU (weiß; „Triple 5“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und $0,5 \times 10^{-6}$ mol/L 5-FU (weiß; „Triple 0,5“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und $0,05 \times 10^{-6}$ mol/L 5-FU (weiß; „Triple 0,05“)

4.8 Antiproliferative Effekte von 5-FU, NaOx und α CHC in der Langzeitkultur

Der antiproliferative Effekt der beiden metabolischen Hemmstoffe wurde in Langzeitkulturen von sechs (Abb. 11.12 im Anhang) und neun Tagen (Abb. 4.11) überprüft (die Ergebnisse für drei Tage sind in Abb. 11.13 im Anhang zu finden). Das Medium wurde alle drei Tage erneuert und dabei die Hemmstoffe frisch zugegeben.

Der antiproliferative Effekt der Kombinationen führt im Langzeitversuch zu zelltoxischen bzw. zytostatischen Erscheinungen. Hierfür werden folgende Definitionen angewandt: Mit Zelltoxizität wird die Abnahme vitaler Zellen unter die Ausgangszellzahl (<100 %) bezeichnet. Mit Zytostase wird der Stillstand des Zellwachstums bezeichnet. Dabei liegt der Anteil vitaler Zellen zwischen >100% und <200 % über der Ausgangszellzahl (was maximal einer Verdoppelung der Zellen entspricht). Mit Verzögerung des Wachstums wird ein Anteil vitaler Zellen von >200 % und <350 % über der Ausgangszellzahl bezeichnet.

Bei 5 % Sauerstoff löste die Kombination aus NaOx und α CHC nach neun Tagen bei drei der sechs Zelllinien (Colo741, LS741, WiDr) eine Zytostase und bei drei Zelllinien (HCT116, HT29, SW620) eine Verzögerung des Zellwachstums aus. Bei 1 % Sauerstoff wurde nach neun Tagen bei zwei der sechs Zelllinien (Colo741, LS174T) Zytostase, bei drei Zelllinien (HCT116, HT29, WiDr) Zelltoxizität und bei SW620 eine Verzögerung des Zellwachstums nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Langzeitversuche belegen, dass die beiden Inhibitoren NaOx und α CHC unter physiologischen Bedingungen zytotoxische Effekte in kolorektalen Karzinomzellen auslösen. Somit erscheint das Konzept, die bei Tumorzellen durch den Warburg-Effekt und die anaerobe Glykolyse verursachte Laktatbildung gezielt zu stören (durch Hemmung der Laktatdehydrogenase) bzw. den notwendigen Export von Laktat zu behindern (durch Hemmung der Monocarboxylat-Transporter), als tragbar und sollte deshalb weiter untersucht werden.

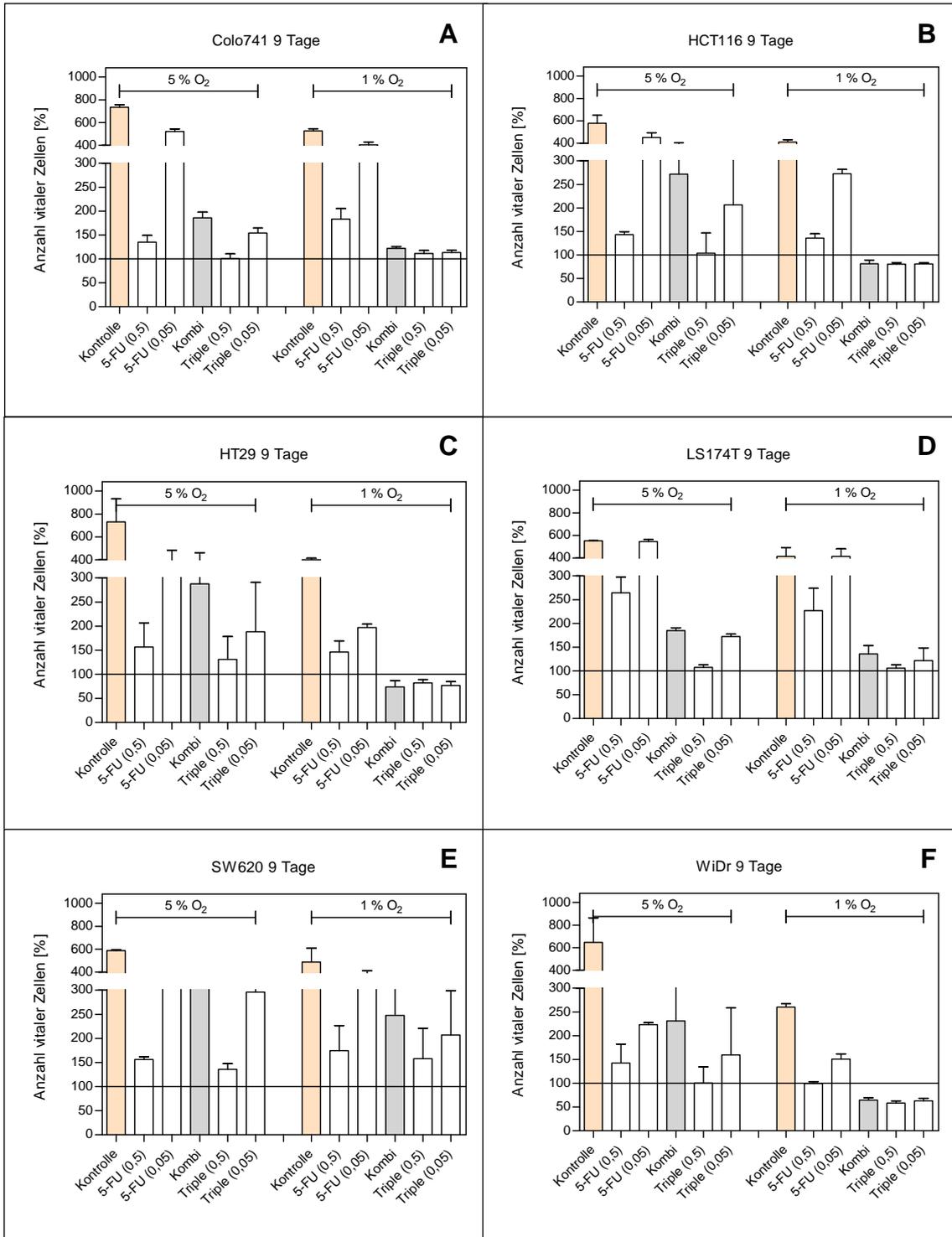


Abb. 4.11: Der antiproliferative Effekt der Zweifach- und Dreifachkombinationen. Der Anteil vitaler Zellen wurde bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) nach 9 Tagen bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung von bis zu zwei unabhängigen Versuchen berechnet und sind bezogen auf die Aussaat (5.000 Zellen pro Vertiefung). Unbehandelte Kontrolle (orange); 5-FU $0,5 \times 10^{-6}$ mol/L (weiß; „5-FU 0,5“); 5-FU $0,05 \times 10^{-6}$ mol/L (weiß; „5-FU 0,05“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC und 40×10^{-3} mol/L NaOx (grau; „Kombi“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und $0,5 \times 10^{-6}$ mol/L 5-FU (weiß; „Triple 0,5“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und $0,05 \times 10^{-6}$ mol/L 5-FU (weiß; „Triple 0,05“).

Kurzzusammenfassung:

(1) Für die sechs kolorektalen Karzinomzelllinien wurde eine Expression von LDH-A, LDH-B sowie MCT-1 und MCT-4 auf Proteinebene nachgewiesen (Abb. 4.2).

(2) Die mitochondriale Atmungskette der sechs untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien weist eindeutig eine Funktion auf, auch wenn die Effektivität der ATP-Bildung bei fünf der sechs Zelllinien um bis zu 50 % verringert war (Tab. 4.2). Die Ursache hierfür kann nicht mit einem veränderten basalen Sauerstoffverbrauch (BASIS), mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (OxP) und nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (NMO₂) erklärt werden.

(3) Die sechs kolorektalen Zelllinien unterscheiden sich in der Stärke der Laktatbildung. Die Laktatbildung bei 5 % Sauerstoff führt zur Einteilung in drei Kategorien (Tab. 4.4): Colo741 und LS174T als starke Laktatbildner mit einer Rate von über $2.000 \times 10^{-9} \text{ mol/L} \times \text{min}^{-1}$; HCT116, HT29 und WiDr als mittelstarke Laktatbildner mit einer Rate zwischen 1.100 und $1.700 \times 10^{-9} \text{ mol/L} \times \text{min}^{-1}$ und SW620 (zusammen mit HUVEC) als schwacher Laktatbildner mit einer Rate um $1000 \times 10^{-9} \text{ mol/L} \times \text{min}^{-1}$.

(4) Das mehr „oxidative“ Profil von SW620 Zellen (bester P:O-Quotient, geringste Laktatbildung bei 5 % und 1 % Sauerstoff; zudem die höchsten IC₅₀-Werte für NaOx und αCHC) könnte erklären, warum die beiden Stoffwechsellinhibitoren, die einen glykolytischen Phänotyp (starke Bildung von Laktat) erfordern, für SW620 Zellen von geringerer Wirksamkeit waren.

5 Beantwortung der Fragen

1. Welche Charakteristika weisen die untersuchten sechs humanen kolorektalen Karzinomzelllinien in ihrem Stoffwechsel auf? Veränderte sich der Stoffwechsel dieser Zellen bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 %?

Bei sämtlichen Zelllinien erhöhte sich der Glukoseverbrauch mit abnehmender Sauerstoffkonzentration, was als sog. „Pasteur-Effekt“ bezeichnet wird. Zudem wiesen die Zellen einen deutlichen Warburg-Effekt auf, d.h. sie bildeten unterschiedliche Mengen an Laktat in Gegenwart von Sauerstoff (Tab. 4.4, Abb. 4.3). Mit abnehmender Sauerstoffkonzentration wurde wie erwartet immer weniger Glukose für die oxidative Phosphorylierung eingesetzt. Bei 1 % Sauerstoff war der Stoffwechsel der Zellen ein vollständiger Gärstoffwechsel (Abb. 4.4).

2. Der Warburg-Effekt ist das Phänomen einer gesteigerten Laktatbildung in Normoxie und wird als Anpassung von Tumoren an vorherrschende hypoxische Bedingungen gesehen. Diese Anpassung geht möglicherweise zu Lasten der Funktion von Mitochondrien. War die mitochondriale Atmung der sechs humanen kolorektalen Karzinomzelllinien verändert?

Die Funktion der Atmungskette wurde mit dem P:O-Quotienten (Maß für die ATP-Bildung) und mit dem respiratorischen Kontrollindex (RKI; Maß für die Stärke der Kopplung von Protonenfluss und ATP-Bildung) überprüft. Dabei zeigten die kolorektalen Karzinomzellen Colo741, HCT116, HT29, LS174T und WiDr einen um bis zu 47% niedrigeren P:O Quotienten im Vergleich zur Kontrollzelllinie J774. Die verringerte Funktion der Atmungskette wird auch am RKI deutlich, der bei den Karzinomzellen um bis zu 35 % verringert war (Tab. 4.2). Einzig SW620 stellen eine Ausnahme dar. Die Ergebnisse zeigen, dass die Mitochondrien der Zelllinien Colo741, HCT116, HT29, LS174T und WiDr zwar eine verringerte Bildung an ATP aufweisen, diese aber nicht funktionslos sind.

3. Die beiden Inhibitoren Natriumoxamat und α CHC sollten mit 5-FU kombiniert werden. Wie beeinflussten sie die Wirksamkeit von 5-FU?

Eine Konzentration von 5×10^{-6} mol/L 5-FU war für alle kolorektalen Karzinomzellen zytostatisch und zwar unabhängig von der Sauerstoffkonzentration (Abb.

4.8 und im Anhang Abb. 11.9). Die Zugabe von Natriumoxamat (NaOx) oder α CHC verstärkte den antiproliferativen Effekt von 5-FU (Tab. 4.8 und Tab. 4.9), der erstaunlicherweise nicht bei der Dreifachkombination aus NaOx, α CHC und 5-FU nachzuweisen ist, auch nicht bei den tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % (Abb. 4.10 und Anhang Abb. 11.11).

4. Von den beiden Inhibitoren Natriumoxamat und α CHC werden antiproliferative Effekte erwartet. Welche waren diese und wurden sie durch unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen beeinflusst?

Beide Inhibitoren zusammen lösten bei drei Zelllinien (Colo741, LS741, WiDr) eine Zytostase und bei drei Zelllinien (HCT116, HT29, SW620) eine Verzögerung des Zellwachstums nach 9 Tagen in Kultur bei 5 % Sauerstoff aus. Bei 1 % Sauerstoff wurden bei zwei Zelllinien (Colo741, LS174T) Zytostase, bei drei Zelllinien (HCT116, HT29, WiDr) Zelltoxizität und bei einer Zelllinie (SW620) eine Verzögerung des Zellwachstums nachgewiesen (Abb. 4.11).

Die Langzeitversuche bei tumorphysiologischen Sauerstoffbedingungen belegen somit, dass beide Inhibitoren zytotoxische Effekte in kolorektalen Karzinomzellen auslösen können. Die gute Kultivierbarkeit von SW620 Zellen bei 1 % Sauerstoff erscheint überraschend. Das Ergebnis macht deutlich, dass die Unterscheidung des Stoffwechsels in einen glykolytischen oder oxidativen Phänotyp keine Rückschlüsse auf die Fähigkeit der Zellen zulässt, wie sie mit einer verringerten Versorgung mit Sauerstoff zurecht kommen - zumal wenn sie, wie bei den Versuchen, mit Nährstoffen versorgt werden (Stichwort: Mediumwechsel).

Die Erwartung an beide Inhibitoren, dass sie antiproliferative Effekte in kolorektalen Karzinomzelllinien auslösen, wurde erfüllt. Die experimentelle Bestätigung, dass der antiproliferative Effekt beider Inhibitoren auf einer Hemmung der Laktatbildung (durch Hemmung der Laktatdehydrogenase mit NaOx) bzw. auf der Behinderung des notwendigen Exports von Laktat (durch Hemmung der Monocarboxylat-Transporter mit α CHC) beruht, ist weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

6 Diskussion

Ziel der Arbeit war zu untersuchen, ob der Stoffwechsel kolorektaler Karzinomzelllinien potentielle Targetstrukturen für eine neue medikamentöse Strategie aufweist. Mit den als „proof of concept“ *in vitro* eingesetzten Hemmstoffen α CHC und NaOx soll der für Tumorzellen wichtige glykolytische Stoffwechsel beeinträchtigt bzw. gehemmt werden. Beide Hemmstoffe induzierten zytostatische bzw. zytotoxische Effekte in kolorektalen Karzinomzellen auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen. Zusätzlich wurde die Atmungskette der sechs kolorektalen Karzinomzelllinien untersucht und nachgewiesen, dass sie grundsätzlich eine Funktion aufweist, auch wenn diese vermindert sein konnte.

6.1 Die Bedeutung der Glykolyse für malignes Wachstum

Auch heute ist noch nicht im Detail geklärt, welcher Anteil dem Stoffwechsel an der malignen Transformation, also dem Übergang von kontrolliertem zu unkontrolliertem Zellwachstum, zukommt (Grander D, 1998; Bertram JS, 2000). Hierbei führen genetische Veränderungen zu einer Überexpression von Krebsgenen, den sogenannten Onkogenen, und zur Inaktivierung von Suppressorgenen. Hierdurch verliert die Zelle verschiedenste Schutz- und physiologische Funktionen wie u.a. DNA-Reparation und Apoptose-Induktion. Die Zelle beginnt daraufhin, unkontrolliert zu proliferieren (Grander D, 1998; Bertram JS, 2000). Ein wesentlicher Auslöser unkontrollierter Proliferation sind Mutationen oder Schäden in der DNA als Ursache von Replikationsfehlern, UV-Strahlung oder chemischen Karzinogenen (Bertram JS, 2000).

Der Physiologe Otto Warburg, dem die genetische Komponente bei der Auslösung malignen Wachstums noch unbekannt war, war der Auffassung, dass ein Mangel an Sauerstoff für die maligne Transformation verantwortlich ist: die sogenannte Warburg-Hypothese (Warburg O, 1924). Otto Warburg entdeckte 1923, dass solide Tumoren bei aeroben Bedingungen sowohl Glukose oxidieren als auch zu Milchsäure vergären (siehe Kapitel 1.1). Hierzu ein Zitat aus einer Publikation Warburgs: „Der Stoffwechsel des Karzinomgewebes in Sauer-

stoff ist also kein reiner Oxydationsstoffwechsel, sondern eine Mischung von Oxydations- und Spaltungsstoffwechsel“ (Warburg O, 1924, S. 1134). In der gleichen Publikation schlussfolgerte er, dass „der Reiz der Entstehung der Karzinome nichts anderes ist als Sauerstoffmangel, [der dazu führt, dass] „Zellen, die die Fähigkeit der Glykolyse entbehren, zugrunde gehen müssen“ [und] „die Zellen, die glykolytisch wirksam sind, weiterleben können“ (Warburg O, 1924, S. 1137). Nach Warburg führt der Sauerstoffmangel dazu, [dass] „der durch irreversible Schädigungen der Atmung entstehende Energiemangel aus Atmungsenergie durch eine morphologisch minderwertige Gärungsenergie ersetzt wird, die ihrerseits hochdifferenzierte Körperzellen umwandelt in undifferenzierte, ungeordnete wachsende Zellen – die Krebszellen“ (Warburg O, 1955, S. 404). Mit der Entdeckung des zellulären Energieträgers Adenosintriphosphat durch Karl Lohmann im Jahr 1929 konkretisierte Otto Warburg die schädigende Wirkung von Hypoxie mit der Annahme, dass das „durch Atmung aufgebaute Adenosintriphosphat mehr Struktur hat, als das durch Gärung aufgebaute Adenosintriphosphat“ (Warburg O, 1955, S. 403). Diese Auffassung hat sich als falsch erwiesen. Es gibt keinen energetischen Unterschied zwischen Adenosintriphosphat (ATP), das in der Glykolyse durch Substratkettenphosphorylierung gebildet wird und das durch oxidative Phosphorylierung an der Atmungskette gebildete ATP. Zur Herstellung von ATP aus ADP werden 30 kJ/mol benötigt. Während bei der oxidativen Phosphorylierung das übertragende Phosphat direkt aus anorganischem Phosphat stammt, wird bei der Substratkettenphosphorylierung Phosphat von Substraten auf ADP übertragen.

Fortschritte auf dem Gebiet der Genetik haben dazu beigetragen, dass in den 1970er Jahren die Theorie der monoklonalen Krebsentstehung als Gegenkonzept zur Warburg-Hypothese entwickelt wurde. Sie besagt, dass sich ein Tumor als Klon aus einer einzigen Zelle bildet, wobei durch genetische Variabilität während der Tumorprogression sich die Tumorzellen von der Ursprungszelle unterscheiden. Die sich klonal bildenden Tumorzellen weisen ein individuelles Proliferationspotential auf, sodass sich ein entwickelnder Tumor aus scheinbar verschiedenen Zellpopulationen zusammensetzt (Nowell PC, 1976; Wolman SR, 1986; Nicolson GL, Rosenberg NL, 1987; Rahman M et al., 2011; Pacini N,

Borziani F, 2014). Im Jahr 1994 entwickelte sich aus Untersuchungen der Gruppe um Lapidot die Krebsstammzell-Theorie (Lapidot T et al., 1994). Sie besagt, dass der Großteil der Zellen eines Tumors aus nicht-malignen Zellen besteht (Lapidot T et al., 1994; Rahman M et al., 2011; Pacini N, Borziani F, 2014). Nur einzelne Krebszellen, die sogenannten Krebsstammzellen, verfügen über malignes Potential, um einen neuen Tumor zu generieren, d. h. zu rezidivieren. Sie sind es auch, die an der Ausbildung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika beteiligt sind (Rahman M et al., 2011; Sebastian C, 2014; Allegra A et al., 2014; Pacini N, Borziani F, 2014). Die durch beide Theorien beeinflusste Forschung lieferte eindrucksvolle experimentelle Daten, die dazu beitragen, den Stoffwechsel von Krebszellen in den Hintergrund treten zu lassen. Dies änderte sich erst im Jahr 2004 mit der vielbeachteten Übersichtsarbeit von Gatenby und Gillies (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004). Die Autoren diskutieren umfassend die Ursachen für den hohen Glukoseumsatz von Krebszellen. Ihre Auffassung, dass die Abhängigkeit des Tumorstoffwechsels von Glukose als Energieträger eine (genetische) Anpassung an (vorübergehende) Phasen von Sauerstoffmangel darstellt, wird von zahlreichen Wissenschaftlern geteilt (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004; Kim J-W, Dang CV, 2006; Pacini N, Borziani F, 2014). Die Anpassung des Stoffwechsels von Krebszellen an hypoxische Bedingungen, die bereits in Tumorstufen stattfindet, hat auch klinische Auswirkungen: So weisen stark hypoxische Krebsformen wie Sarkome und Karzinome ein höheres metastasierendes Potential bei einer schlechteren Prognose auf (Pacini N, Borziani F, 2014).

Große Bedeutung für einen von Glukose abhängigen Stoffwechsel („glykolytischer Phänotyp“, „Warburg-Effekt“) kommt dem Hypoxie-induzierten Faktor 1α (HIF- 1α) zu. HIF- 1α erhöht die Expression verschiedener Enzyme der Glykolyse und von Glukosetransportern. Zudem beeinflusst HIF- 1α die Expression der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1 (PDK1), die die wichtige Funktion der Pyruvat-Dehydrogenase hemmt, und dadurch den Stoffwechsel der Zelle von oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien zur Glykolyse im Zytosol verschiebt. Die Pyruvat-Dehydrogenase oxidiert Pyruvat zu Acetyl-CoA, das in

den Citratzyklus eingeschleust wird. Wird dagegen die Pyruvat-Dehydrogenase gehemmt, verbleibt Pyruvat im Zytosol und wird dort von der Laktatdehydrogenase zu Laktat reduziert (Höckel M, Vaupel P, 2001; Kim J-W, Dang CV, 2006; Bertout JA et al., 2008; Vander Heiden MG et al., 2009; Locasale JW, Cantley LC, 2011; Meijer TWH et al., 2012; Dang CV, 2012). Die von einigen Autoren postulierte Möglichkeit glykolytischer Zellen, NADH+H⁺ zusätzlich mit Hilfe von NADH-Oxidoreduktasen zu oxidieren (Herst PM et al., 2004), wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt (Herst PM et al., 2004).

Forschern aus Jena und Potsdam gelang es, die Bedeutung des glykolytischen Phänotyps für das maligne Zellwachstum experimentell zu belegen. Wird Frataxin, ein mitochondriales Protein mit Kontrollfunktion im oxidativen Zellstoffwechsel, in Mitochondrien maligner Zellen überexprimiert, so wird vermehrt Glukose oxidiert anstatt reduziert. Dies führt dazu, dass die Zellen ein geringeres Zellwachstum aufweisen. Mit anderen Worten: die massive Proliferation maligner Zellen ist Ausdruck ihres glykolytischen Phänotyps, der zudem beeinflusst werden kann (Schulz TJ et al., 2005). So wachsen Tumoren in Mäusen, die kein Frataxin exprimieren, deutlich schneller als in Wildtyp-Mäusen (Thierbach R et al., 2005).

Untersuchungen zur Versorgung der Krebszelle mit ATP bestätigen, dass der Warburg-Effekt keinen gravierenden Nachteil für die Krebszelle darstellt. Das ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass mit der Glykolyse wesentlich schneller ATP produziert wird als mit der Atmungskette (Pfeiffer T et al., 2001). Der auf einen gesteigerten Glukoseumsatz angepasste Zellstoffwechsel von Krebszellen ist Grundlage für Wachstum und Invasivität (Upadhyay M et al., 2013). Zusätzlich stellt die Glykolyse essentielle Zwischenprodukte zur Synthese von Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen bereit und ermöglicht somit den gesteigerten anabolen Stoffwechsel von Krebszellen (Vander Heiden MG et al., 2009; Weinberg F, Chandel NS, 2009). Auch Daten dieser Arbeit zum Zellwachstum maligner Zellen deuten mit Ausnahme von SW620 auf einen direkten Zusammenhang zwischen Verdopplungszeit und Laktatbildung hin (Tab. 6.1). Auch die Ergebnisse von Schulz et al. zeigen, dass die Proliferation von Krebszellen

durch das Verhältnis von Glykolyse zur Atmung beeinflusst wird (Schulz TJ et al., 2005).

Tab. 6.1: Vergleich von Zellwachstum und Stärke der Laktatbildung. Die Daten sind den Tab. 4.1 und 4.4 entnommen. Siehe auch graphische Auswertung im Anhang (Abb. 11.14).

Zelllinie	Verdopplungszeit in Tagen	Laktatbildung $10^{-9} \text{ mol/L} \times \text{min}^{-1}$
HCT116	$1,3 \pm 0,2$	$1.660,1 \pm 309,0$
Colo741	$1,5 \pm 0,5$	$2.757,8 \pm 546,8$
SW620	$1,5 \pm 0,1$	$1.039,2 \pm 32,3$
LS174T	$1,6 \pm 0,3$	$2.359,7 \pm 247,2$
WiDr	$2,4 \pm 0,9$	$1.232,2 \pm 241,4$
HT29	$2,7 \pm 1,2$	$1.152,0 \pm 282,9$
J774	$3,4 \pm 1,1$	$1.312,4 \pm 360,0$

Auch wenn Otto Warburg die molekularen Grundlagen zur malignen Transformation noch unbekannt waren, ist seine Annahme, dass wesentliche Eigenschaften malignen Wachstums mit konkreten Veränderungen im Zellstoffwechsel assoziiert sind, auch heute weitgehend akzeptiert. Diesen Aspekt haben die beiden US-Amerikaner Hanahan und Weinberg in einer aktualisierten Version ihres Übersichtsartikels aus dem Jahr 2000 übernommen und Veränderungen im Tumorstoffwechsel als eine weitere wesentliche Eigenschaft malignen Wachstums anerkannt (Hanahan D, Weinberg RA, 2011).

6.2 Mitochondrien maligner und nicht-maligner Zellen

Als Ursache für den Warburg-Effekt nahm Otto Warburg an, dass „die Atmung der Krebszellen geschädigt ist“ (Warburg O, 1955, 1956). Diese Aussage, die bereits seinerzeit Widerspruch hervorrief (Weinhouse S, 1956), gilt heute als überholt. Die meisten Tumoren verfügen zwar über funktionelle Mitochondrien (Moreno-Sánchez R et al., 2007; Weinberg F, Chandel NS, 2009). doch weisen diese in aller Regel zahlreiche Veränderungen auf wie eine Überexpressionen von „uncoupling proteins“ (Samudio I et al., 2008; Kuai XY et al., 2010; Li W et al., 2010) oder Strukturänderungen in der inneren Mitochondrienmembran. Eine Gruppe von Phospholipiden mit der Trivialbezeichnung Cardiolipine stabi-

lisieren die Proteinkomplexe der Atmungskette (Tab. 1.1). Kiebish et al. zeigten, dass Änderungen in der Struktur der Cardiolipine zu einer verringerten Aktivität der Elektronentransportkette führt (Kiebish MA et al., 2008). Kiebish et al. zeigten, dass die Struktur von Cardiolipin in den Mitochondrien erkrankter Mäusen sich von der gesunder Tieren unterscheidet. Das veränderte Cardiolipin führte zu einer verringerten Aktivität der Elektronentransportkette in den erkrankten Mäusen (Kiebish MA et al., 2008).

Ein weiteres Argument, dass Tumoren über funktionelle Mitochondrien verfügen, ist die Tatsache, dass sie Substrate wie Glutamin, Laktat und Ketonkörper in ihren Mitochondrien verstoffwechseln; hierzu sind die Zellen auf Sauerstoff angewiesen (Reitzer LJ et al., 1979; DeBerardinis RJ, Cheng T, 2010; Otto C et al., 2014). Die Fähigkeit zur Nutzung zahlreicher Energieträger ändert aber nichts an der Tatsache, dass Tumoren eine starke Abhängigkeit vom Energieträger Glukose zeigen. Dies hängt u.a. mit der bereits erwähnten Tatsache zusammen, dass Glukose der einzige Energieträger ist, der auch in Hypoxie verstoffwechselt werden kann.

Die Mitochondrien der in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen Karzinomzellen weisen zwar eine Funktion auf, die Effizienz der Atmungskette kann aber deutlich verringert sein. So bilden die Mitochondrien der Zelllinien Colo741, HCT116, HT29, LS174T und WiDr im Vergleich zur Kontrollzelllinie J774 weniger ATP, sie sind aber nicht vollständig funktionslos (Kapitel 4.2). Mit weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit zum basalen Sauerstoffverbrauch (BASIS), mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (OxP) und nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (NMO2) war diese Beobachtung nicht zu erklären, da keine Unterschiede zwischen den Tumorzellen und zwischen Tumorzellen und Kontrollzellen nachzuweisen waren (Tab. 4.3). Eine in der Literatur beschriebene Ursache für eine ineffektive Atmungskette, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurde, ist ein sogenanntes Protonenleck (Brand MD, Nicholls DG, 2011). Ein Protonenleck in der Atmungskette führt zu einer Verringerung des Protonengradienten, da Protonen durch undichte Stellen in der Mitochondrienmembran in die Mitochondrienmatrix zurückdiffundieren (Abb. 1.1) und damit weniger Protonen

für die ATP-Synthase (Abb. 11.1) zur Verfügung stehen (Brand M, 2005). Derartige Protonenlecks sind für maligne Zellen wie Glioblastomzellen und Brustkrebszellen beschrieben (Pike Winer LS, Wu M, 2014; Radde BN et al., 2015).

Eine Protonenleckage in der Mitochondrienmembran bildet sich über zwei unterschiedliche Wege. Die sogenannte basale Leckage, deren Ursache zwar noch nicht vollständig verstanden ist, die aber wohl mit der metabolischen Aktivität der Zelle in Zusammenhang steht (Brand M, 2005; Jastroch M et al., 2010; Divakaruni AS, Brand MD, 2011). Zusätzlich zur basalen Leckage führen sogenannte Entkopplungsproteine oder „uncoupling proteins“ (UCP) zu einem Protonenleck (Brand M, 2005; Jastroch M et al., 2010). Die physiologische Funktion dieser mitochondrialen Membranproteine ist vielfältig. So ist z. B. UCP1 oder Thermogenin an der Thermogenese in braunem Fettgewebe beteiligt. UCP2 und UCP3 tragen zur Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei und übernehmen somit eine Schutzfunktion gegenüber oxidativem Zellstress (Brand M, 2005; Jastroch M et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die respiratorische Reservekapazität (RRK) berechnet (Tab. 4.3), ein quantitativer Indikator für den mitochondrialen Energiestatus der Zelle. RRK ist ein Maß dafür, wie gut die Atmungskette auf physiologische Besonderheiten in der Zelle wie Differenzierung, Teilung und Stress reagiert (Hill BG et al., 2012). Die respiratorische Reservekapazität von J774 Kontrollzellen ist wesentlich geringer als die der getesteten Karzinomzellen, was auf eine geringere Fähigkeit der J774 Zellen schließen lässt, einen plötzlichen Energiebedarf zu kompensieren (Brand MD, Nicholls DG, 2011; Desler C et al., 2012; Hill BG et al., 2012). Der Grund für die bessere „Stressresistenz“ der kolorektalen Karzinomzellen könnte sein, dass sie durch die maligne Transformation (s. oben) per se besser an Stresssituationen, verursacht durch Phasen von Sauerstoff- bzw. Nährstoffmangel, angepasst sind.

6.3 Antiproliferative Effekte der Kombination aus NaOx und α CHC

Tumorzellen haben sich mit einer gesteigerten Glykolyserate, dem sog. Warburg-Effekt, perfekt an hypoxische Bedingungen angepasst (Solaini G et al.,

2010). Die Reduktion von Pyruvat zu Milchsäure bzw. ihrem Anion, dem Laktat, sichert bei anaeroben Bedingungen die Verstoffwechslung von Glukose über die Glykolyse. Glukose ist der einzige Energieträger für eukaryotische Zellen, der auch ohne den Elektronenakzeptor Sauerstoff zur Bildung von ATP über Substratkettenphosphorylierung genutzt werden kann (Krebs HA, 1972; Racker E, 1974). Damit die Glykolyse nicht zum Stillstand kommt, ist es notwendig, dass mit Hilfe der Laktatdehydrogenase die reduzierten Reduktionsäquivalente $\text{NADH}+\text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert werden; dabei fungiert Pyruvat als Elektronenakzeptor. Um eine Ansäuerung der Zelle, die zur Induktion von Apoptose führen würde, zu vermeiden, ist ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Export von Laktat notwendig (Izumi H et al., 2003; Pinheiro C et al., 2010; Kumar A et al., 2013). Monocarboxylat-Transporter (MCT) sind für den Transport von Laktat aus der Zelle nach außen unerlässlich. Hierdurch kommt es zu einer lokalen Ansäuerung und Schädigung säuresensitiver Zellen. Andererseits stellt Laktat einen energetisch wertvollen Metaboliten dar, der von Stromazellen des Tumors bei Anwesenheit von Sauerstoff über Pyruvat zu CO_2 und H_2O oxidiert wird (Sonveaux P et al., 2008; Rattigan YI et al., 2012; Collier HA, 2014). Außerdem verhindert Laktat Immunreaktionen gegen maligne Zellen (Fischer K et al., 2007). Erhöhte intrazelluläre Laktatspiegel korrelieren mit einem erhöhten Rezidiv- und Metastasierungsrisiko sowie mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben (Walenta S et al., 1997; Walenta S et al., 2000). Der Tumorstoffwechsel ist nicht nur von prognostischer Relevanz, er hat auch direkte Auswirkungen auf die Therapie. So weisen Tumoren mit einer starken glykolytischen Aktivität eine erhöhte Strahlenresistenz auf (Quennet V et al., 2006; Sattler UG et al., 2010).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die Hemmstoffe NaOx und αCHC zytostatische und zytotoxische Effekte in kolorektalen Karzinomzellen auslösen. Ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Laktatbildung als Maß für die Ausprägung des Warburg-Effekts und der Stärke des antiproliferativen Effekts beider Hemmstoffe kann vermutet werden (Tab. 6.2). Zumindest für SW620 Zellen war der antiproliferative Effekt von NaOx und αCHC nach 120 Stunden am geringsten und der Anteil vitaler Zellen nahm maximal um bis zu 49 % bei 5 % und 1 % Sauerstoff ab (Abb. 4.9; Tab. 6.2). SW620 Zellen weisen

den geringsten Verbrauch an Glukose und die geringste Bildung an Laktat unabhängig von der Sauerstoffkonzentration auf (Tab. 4.4). Bei den anderen kolorektalen Karzinomzellen wie Colo741 war der antiproliferative Effekt der Kombination aus NaOx und α CHC sehr viel stärker und der Anteil vitaler Zellen nahm um bis zu 80 % ab (Kapitel 4.7; Tab. 6.2). Inwieweit die gute Funktion der Atmungskette für die Sonderstellung von SW620 Zellen verantwortlich ist (siehe Tab. 4.2), kann nicht zweifelsfrei entschieden werden, doch könnte das Verhältnis von Glykolyse zu oxidativer Phosphorylierung in diesen Zellen ein anderes sein als bei den fünf übrigen kolorektalen Karzinomzelllinien (Abb. 11.16 im Anhang).

Tab. 6.2: Wirksamkeit der beiden Inhibitoren NaOx und α CHC bei Tumorzellen in Abhängigkeit von der Stärke der Laktatbildung. Die kolorektalen Zelllinien sind nach der Stärke der Laktatbildung bei 5 % Sauerstoff in drei Kategorien eingeordnet (Tab. 4.4): Starke Laktatbildner: Colo741, LS174T; mittelstarke Laktatbildner: HCT116, HT29, WiDr und schwacher Laktatbildner: SW620.

Zelllinie	Laktatbildung 10^{-9} mol/L x min^{-1}	IC ₅₀ (NaOx)	IC ₅₀ (α CHC)	Abnahme vitaler Zellen (%) bei 5 % O ₂ NaOx+ α CHC ¹⁾		Abnahme vitaler Zellen (%) bei 1 % O ₂ NaOx+ α CHC ¹⁾	
		10^{-3} mol/L	10^{-3} mol/L	120 Stunden	9 Tage	120 Stunden	9 Tage
Colo741	2.757,8 ± 546,8	30,9 (22,2-43,2)	2,3 (1,5-3,4)	59,47	74,71	58,05	76,79
LS174T	2.359,7 ± 247,2	35,7 (26,4-48,3)	1,3 (1,1-1,5)	63,48	66,49	49,07	67,23
HCT116	1.660,1 ± 309,0	27,2 (19,0-39,0)	1,7 (1,2-2,3)	65,28	53,07	60,04	80,18
WiDr	1.232,2 ± 241,4	37,3 (28,4-49,1)	2,0 (1,4-2,9)	56,65	64,30	55,13	75,13
HT29	1.152 ± 2820,9	31,3 (25,4-38,6)	1,2 (0,9-1,6)	62,80	60,66	45,65	81,54
SW620	1.039,2 ± 32,3	38,6 (30,8-48,4)	3,2 (1,9-5,5)	23,08	40,08	33,02	49,31

¹⁾ Im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle.

Die Daten in Tab. 6.2 zur Abnahme vitaler Zellen verdeutlichen, dass der durch die beiden Inhibitoren NaOx und α CHC induzierte zelltoxische Effekt keinen massiven Zelluntergang auslöst, sondern bei den verwendeten IC₅₀-Konzentrationen zu einer kontinuierlichen Abnahme vitaler Zellen führt (siehe auch Abb. 11.15 im Anhang). Eine solche „milde“ zytotoxische Eigenschaft ist sicherlich grundsätzlich nicht abzulehnen, da die Inhibitoren in einer geringeren

Dosis einzusetzen wären, mit vermutlich geringeren Nebenwirkungen, die zudem in der adjuvanten Situation länger verabreicht werden könnten.

6.4 Weitere Targetstrukturen im Tumorstoffwechsel

Der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat (NaOx) und α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (α CHC) wurde auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen nachgewiesen und ist vergleichbar mit der Wirkung von 5-Fluorouracil (5-FU) in der Konzentration von 5 μ mol/L. Mit dem Chemotherapeutikum 5-FU aus der Gruppe der Antimetabolite wird die Synthese und Translation von DNA, bedingt durch eine Ähnlichkeit zum Pyrimidin Uracil, gehemmt (Tennant DA et al., 2010; Álvarez P et al., 2012).

Zusätzlich zu den beiden in dieser Arbeit getesteten Inhibitoren werden aktuell noch weitere Inhibitoren untersucht, die bestimmte Zielstrukturen im Stoffwechsel von Tumoren hemmen (Abb. 6.1). Hierzu gehören u. a. (1) α -Carboanhydrasen, (2) der Glukose- bzw. Glutamintransport (3) in die Zelle, (4) die Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (Tennant DA et al., 2010).

Zu den drei Zielstrukturen im Zellstoffwechsel im Einzelnen:

(1) Tumorzellen exprimieren unter der Kontrolle von HIF-1 α die membrangebundenen Isoformen der Carboanhydrasen (CA): CAIX und CAXII. Carboanhydrasen katalysieren die Hydratisierung von Kohlenstoffdioxid (CO₂) zu Kohlensäure (H₂CO₃). CAIX und CAXII verlagern die Hydratisierung von Kohlendioxid auf die extrazelluläre Seite, wodurch die Außenseite angesäuert wird (H₂CO₃ \rightarrow HCO₃⁻ + H⁺) und der intrazelluläre pH-Wert nahezu konstant bleibt. Die Blockade von Carboanhydrasen führt somit zur Ansäuerung der Zelle, vergleichbar mit einer MCT-Blockade, wodurch der Laktattransport gehemmt wird (Chiche J et al., 2009). Der Inhibitor Indisulam befindet sich gegenwärtig in einer Phase II Studie.

(2) Der Inhibitor Phloretin hemmt den Transport von Glukose in die Zelle. Die Hemmung der Glykolyse zeigt zwar nur moderate Effekte, sensibilisiert Tumoren aber für eine Behandlung mit Chemotherapeutika. Diese Beobachtung be-

ruht vermutlich darauf, dass die für die Chemoresistenz verantwortlichen „multidrug resistance“ (MDR)-Transporter aufgrund abfallender ATP-Spiegel nur noch begrenzt Chemotherapeutika aus dem Zellinneren transportieren können. Im Gegensatz zum Tumor wird Phloretin von Zellen gesunder Gewebe gut toleriert (Bonnet S et al., 2007).

(3) Inzwischen geht man davon aus, dass die Toleranz gesunder Zellen gegenüber einer Behandlung mit Phloretin mit einem gesteigerten Verbrauch an Glutamin zusammenhängt. Da auch Tumorzellen unter bestimmten Umständen den Energieträger Glutamin oxidativ verstoffwechseln, ist es möglich, mit Phenylacetat den Transport von Glutamin in die Tumorzelle zu beeinflussen (Samid D et al., 1993; Bonnet S et al., 2007). Glutamin ist die am häufigsten vorkommende Aminosäure und stellt für Tumoren eine wichtige Quelle für Kohlenstoff und Stickstoff dar (DeBerardinis RJ, 2008). Auch soll es möglich sein, dass die Tumorzelle ihre gesamte Energieversorgung mit Glutamin decken kann (Reitzer LJ et al., 1979; DeBerardinis RJ, Cheng T, 2010). Inwieweit Strategien, die die Aufnahme von Glutamin hemmen, therapeutischen Erfolg haben werden, bleibt abzuwarten. Es ist bekannt, dass ein Glutaminmangel durch Schädigung der Darmmukosa das Infektionsrisiko erhöht (D'Souza R, Powell-Tuck J, 2004).

(4) Seit vielen Jahren stellt Dichloracetat (DCA) eine Möglichkeit zur Therapie der angeborenen Lactacidose bei Kindern dar. Dabei hemmt DCA in den Zellen die Bildung von Milchsäure. Bonnet et al. zeigten im Jahr 2007, dass Dichloracetat in Krebszellen das Zellwachstum verringert und Apoptose induziert, ohne dabei normale Zellen zu beeinflussen. Dichloracetat hemmt die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1 und verschiebt damit den Stoffwechsel der Krebszelle von der (Reduktion von Pyruvat zu Laktat) zur Glukoseoxidation (Oxidation von Pyruvat zu CO₂) (Bonnet S et al., 2007).

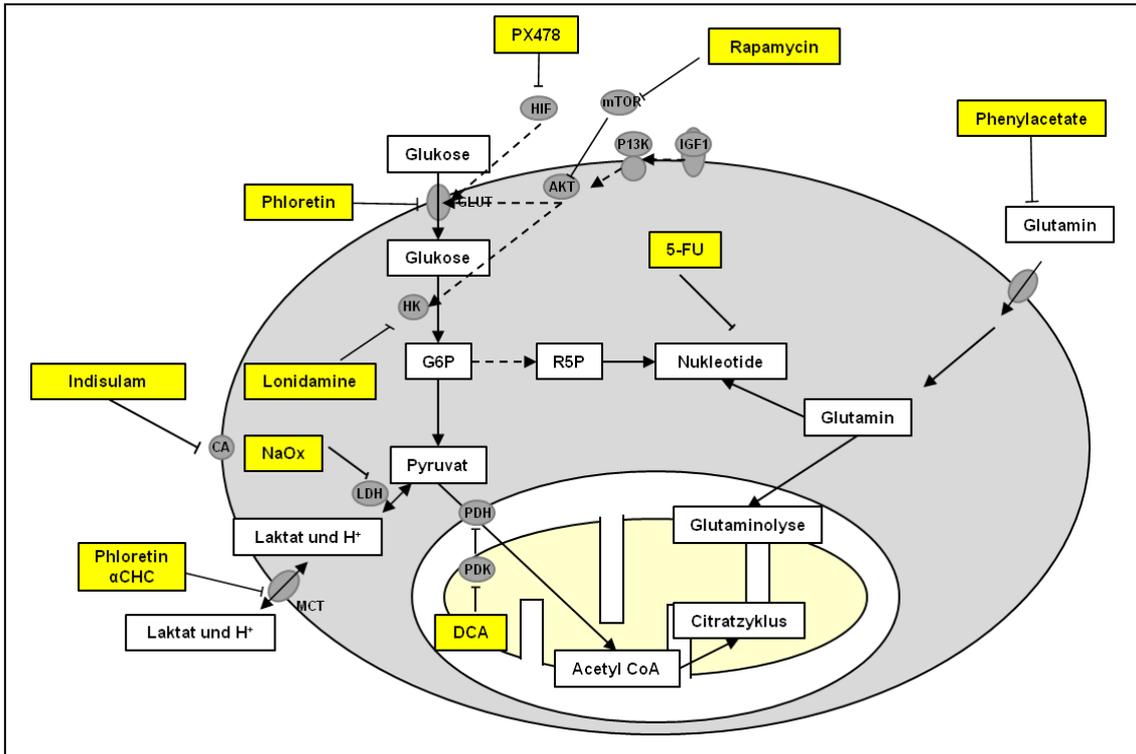


Abb. 6.1: Mögliche Targetstrukturen im Tumorstoffwechsel. Sämtliche in dieser Abbildung dargestellten Inhibitoren (gelb) befinden sich, mit Ausnahme von Natriumoxamat, in klinischen Studien. 5-FU, 5-Fluorouracil; AKT, Proteinkinase B, auch AKT-Enzym genannt; CA, α -Carboanhydrasen; α CHC, α -Cyano-4-Hydroxycinnamat; DCA, Dichloracetat; G6P, Glukose-6-Phosphat; GLUT, Glukose-Transporter; HIF, Hypoxie-induzierte Faktor ; HK, Hexokinase; IGF1, Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor 1; LDH, Laktatdehydrogenase; MCT, Monocarboxylat-Transporter; PDH, Pyruvat-Dehydrogenase; PDK, Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase; R5P, Ribose-5-Phosphat. Grafik selbst erstellt und in Anlehnung an Tennant et al. 2010.

7 Ausblick

Ein Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Mitochondrien einiger kolorektaler Karzinomzelllinien (Colo741, HCT116, HT29, LS174T WiDr) eine verringerte Funktion aufweisen, aber nicht vollkommen funktionslos sind. Die Ursache ließ sich auch mit umfangreichen Messungen zum basalen (BASIS), mitochondrialen (OxPh) und nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (NMO_2) nicht eindeutig klären. Eine mögliche Ursache könnte ein Protonenleck sein, verursacht z. B. durch die Überexpression von „uncoupling protein“. Dies sollte in weiteren Versuchen untersucht werden, z. B. durch Messungen zur Depolarisierung der Zellmembran mit dem Fluoreszenzfarbstoff „JC1“ oder mit einer Clark Elektrode (Perry SW et al., 2011). Zusätzlich wäre es notwendig, neben J774, andere geeignete benigne Kontrollzelllinien für Messung mit der Clark-Elektrode zu untersuchen.

Durch den Warburg-Effekt weist der Stoffwechsel von Krebszellen potentielle Targetstrukturen auf, die möglicherweise für therapeutische Ansätze geeignet sind. In der vorliegenden Arbeit wurde das Konzept geprüft, die Laktatbildung gezielt zu stören (durch Hemmung der Laktatdehydrogenase) bzw. den notwendigen Export von Laktat zu behindern (durch Hemmung der Monocarboxylat-Transporter). Die spezifische Wirkung solcher Inhibitoren sollte an weiteren kolorektalen Karzinomzelllinien bei unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen untersucht werden.

Die selektive Hemmung von LDH und MCT mit NaOx und αCHC war bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % so wirksam wie 5×10^{-6} mol/L 5-FU. Um die Wirksamkeit dieser Strategie auch *in vivo* überprüfen zu können, sollten sicherlich auch andere zur Verfügung stehende Inhibitoren als NaOx und αCHC getestet werden. So könnte der LDH-Inhibitor Galloflavin, der einen wesentlich geringeren IC_{50} -Wert als NaOx aufweist, getestet werden. Mit AZD3965 steht ein patentierter MCT1-Inhibitor zur Verfügung, der zurzeit in einer Phase I Studie getestet wird (Polański R et al., 2014). Von den Untersuchungen *in vivo* wird erwartet, dass sie die selektive Wirkung von LDH und MCT-Hemmstoffen auf Krebszellen bestätigen.

8 Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war zu untersuchen, ob der Stoffwechsel kolorektaler Karzinomzellen geeignete Targetstrukturen für mögliche therapeutische Ansätze aufweist. In Krebszellen induziert sowohl der Warburg-Effekt bei Normoxie als auch die anaerobe Glykolyse bei Hypoxie eine massive Bildung von Laktat. Wird die Krebszelle dauerhaft daran gehindert, die für die Glykolyse notwendigen Reduktionsäquivalente $\text{NADH}+\text{H}^+$ mit Hilfe der Laktatdehydrogenase zu reoxidieren und/oder Laktat über die Transporter MCT1 und MCT4 nach außen zu schleusen, dann löst diese Kombination aus Mangelsituation und intrazellulärer Ansäuerung den apoptotischen Zelltod aus. Für die Situation *in vivo* ist entscheidend, dass auch Zellen von Normalgeweben zwar Laktat in Hypoxie bilden, dies jedoch keine vorherrschende physiologische Situation darstellt.

Die Hemmstoffe Natriumoxamat (NaOx) für die Laktatdehydrogenase und α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (α CHC) für MCT1 und MCT4 wurden an den sechs humanen kolorektalen Karzinomzelllinien Colo741, HCT116, HT29, LS174T, SW620 und WiDr untersucht. Zusätzlich wurde der Glukoseverbrauch und die Laktatbildung bestimmt und die Funktion der Atmungskette überprüft. Die IC_{50} -Werte für 5-FU, NaOx und α CHC wurden bestimmt und danach NaOx in einer Konzentration von 40×10^{-3} mol/L, α CHC in einer Konzentration von 2×10^{-3} mol/L und 5-FU in einer Konzentration von 5×10^{-6} mol/L eingesetzt. Die Zellen wurden bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % Sauerstoff für bis zu 120 Stunden inkubiert.

Die Funktion der Atmungskette in den Mitochondrien der kolorektalen Karzinomzellen wurde u. a. durch Bestimmung wichtiger Kenngrößen wie dem P:O Quotienten und des respiratorischen Kontrollindex (RKI) nachgewiesen. Fünf der sechs Karzinomzelllinien wiesen im Vergleich zur Kontrollzelllinie J774 einen verringerten P:O-Quotienten und respiratorischen Kontrollindex (RKI) auf, was darauf hindeutet, dass die Funktion der Mitochondrien dieser Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zwar verringert war, aber nicht vollständig aufgehoben. Dieses Ergebnis stützt die allgemein akzeptierte Auffassung, dass die meisten Tumore über funktionelle Mitochondrien verfügen.

Durch die Analyse des Glukosestoffwechsels wurden die sechs kolorektalen Zelllinien, die einen unterschiedlich stark ausgeprägten glykolytischen Phänotyp aufwiesen, nach der Stärke der Laktatbildung bei 5 % Sauerstoff in drei Kategorien eingeordnet. Zudem wurde für jede der sechs Zelllinien die Expression von LDH-A, LDH-B sowie MCT-1 und MCT-4 auf Proteinebene nachgewiesen.

Wesentliches Ziel der Untersuchungen war die Überprüfung des antiproliferativen Potentials der beiden Inhibitoren NaOx und α CHC einzeln oder in Kombination mit 5-FU bei den tumorspezifischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 %. Die Kombination aus NaOx und α CHC induzierte bei 1 % Sauerstoff nach 9 Tagen in Kultur zytotoxische Effekte und war damit so wirksam wie 5×10^{-6} mol/L 5-FU. Die Zugabe von 5-FU zur Kombination aus NaOx und α CHC führte zu keiner Steigerung des zelltoxischen Effektes. Die beiden Inhibitoren NaOx und α CHC waren für SW620 Zellen weniger wirksam als für Zellen der anderen fünf Zelllinien. Das mehr „oxidative“ Profil von SW620 Zellen (bester P:O-Quotient, geringste Laktatbildung bei 5 % und 1 % Sauerstoff; zudem die höchsten IC_{50} -Werte für NaOx und α CHC) könnte erklären, warum die beiden Stoffwechsellinhibitoren, die einen glykolytischen Phänotyp (starke Bildung von Laktat) erfordern, für SW620 Zellen von geringerer Wirksamkeit waren.

Für die Hemmstoffe NaOx und α CHC wurden zytostatische bzw. zytotoxische Effekte in kolorektalen Karzinomzellen gezeigt. Dies deutet darauf hin, dass Krebszellen auf einen ungehinderten glykolytischen Stoffwechsel angewiesen sind. Für beide Hemmstoffe wurde ebenfalls gezeigt, dass sie auch bei tumorrelevanten Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % wirksam sind.

9 Summary

The aim of the thesis was to investigate whether the metabolism of colorectal carcinoma cells can provide suitable target structures for possible therapeutic approaches. Both the Warburg effect, in the case of normoxia, and anaerobic glycolysis, in the case of hypoxia, induce a massive production of lactate in cancer cells. If a cancer cell can be permanently prevented from reoxidising reduction equivalents $\text{NADH} + \text{H}^+$ with the help of lactate dehydrogenase, which is necessary for glycolysis, and/or the removal of lactate via the transporters MCT1 and MCT4 can be inhibited, then this combination of a deficiency and intracellular acidification results in the apoptotic death. As far as the *in vivo* situation is concerned, it is crucial that cells from normal tissue also produce lactate in hypoxia, but that this does not constitute a predominant physiological situation.

Sodium oxamate (NaOx), an inhibitor for the lactate dehydrogenase and α -cyano-4-hydroxy cinnamate (α CHC), an inhibitor for MCT 1 and MCT 4 were examined in the six human colorectal carcinoma cell lines Colo741, HCT116, HT29, LS174T, SW620 and WiDr. In addition, glucose consumption and lactate production were determined as well as the function of the respiratory chain. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) for 5-FU, NaOx, and α CHC was determined and NaOx was used in a concentration of 40×10^{-3} mol/L, α CHC in a concentration of 2×10^{-3} mol/L and 5-FU in a concentration von 5×10^{-6} mol/L. The cells were incubated for up to 120 hours at tumour physiological concentrations of oxygen of 5% and 1%.

The respiratory chain function in the mitochondria of colorectal carcinoma cells was verified by determining the P:O quotient and the respiratory control index (RCI), two important parameters for respiratory chain function. Five of the six carcinoma cell lines showed a reduced P:O quotient and respiratory control index (RCI), when compared to control cell line J774. These results indicate that the mitochondria of these cells were malfunctioning, but not fully defective. This

finding supports the generally accepted view that most tumours possess functional mitochondria.

By analysing the glucose metabolism of the six colorectal cell lines, which showed varying degrees of glycolytic phenotype, these cells were ranked into three categories according to the amount of lactate production at 5% oxygen. Moreover, the expression of LDH-A, LDH-B and MCT-1 and MCT-4 at protein level was confirmed for each of the six cell lines.

The main focus of the work was to verify the antiproliferative potential of the two inhibitors NaOx and α CHC alone and in combination with 5-FU in the presence of tumour-specific oxygen concentrations of 5% and 1%. At 1% oxygen the combination of NaOx and α CHC induced cytotoxic effects after 9 days of culture, making it as effective as 5×10^{-6} mol/L 5-FU. The addition of 5-FU to the combination of NaOx and α CHC did not increase the cell-toxic effect. NaOx and α CHC were less effective for SW620 cells than in the other five cell lines. The more "oxidative" profile of SW620 cells (best P:O quotient, least amount of lactate production at 5% and 1% oxygen, and the highest IC₅₀ values for NaOx and α CHC) might explain why the two metabolism inhibitors, which require a glycolytic phenotype (strong lactate production) were less effective in SW620 cells.

Cytostatic or cytotoxic effects of the inhibitors NaOx and α CHC were demonstrated in colorectal carcinoma cells. This indicates that cancer cells are dependent on a functioning glycolytic metabolism. Both inhibitors were also effective in the presence of tumour-relevant oxygen concentrations of 5% and 1%.

10 Literaturverzeichnis

- Ahmad Z, Cox JL. ATP Synthase: The Right Size Base Model for Nanomotors in Nanomedicine. *ScientificWorldJournal*. 2014; published Online ArtikelNr.: 567398
- Allegra A, Alonci A, Penna G, Innao V, Gerace D, Rotondo F, Musolino C. The cancer stem cell hypothesis: a guide to potential molecular targets.. *Cancer Invest*. 2014; 32(9), 470-495
- Álvarez P, Marchal JA, Boulaiz H, Carrillo E, Vélez C, Rodríguez-Serrano F, Melguizo C, Prados J, Madeddu R, Aranega A. 5-Fluorouracil derivatives: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2012; 22(2), 107-123
- Ballas SK. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. *Blood*. 2013; 121(1), 243-244
- Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS, Crofts AR. Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu Rev Biochem*. 2000; 69, 1005-1075
- Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8(12), 967-975
- Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*. 2000; 21(6), 167-223
- Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GC, Puttagunta L, Bonnet S, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*. 2007; 11(1), 37-51
- Brand M. The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochemical Soc Trans* 2005; 33(Pt 5), 897-904
- Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J*. 2011; 435, 297-312
- Brugger H. Der Einfluss veränderter Arbeitslast auf die Regulation der Kapazität isolierter Mitochondrien. Dissertation der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. (2006)
- Chaban Y, Boekema EJ, Dudkina NV. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1837(4), 418-426
- Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem*. 1955; 217(1), 409-427
- Chiche J, Ilc K, Laferrière J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, Brahim-Horn MC, Pouysségur J. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor

- cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res.* 2009; 69(1), 358-368
- Clark LC, Wolf R, Granger D, Taylor Z. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. 1953; 189-193
- Coller HA. Is cancer a metabolic disease?. *Am J Pathol.* 2014; 184(1), 4-17
- Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 2012; 26(9), 877-890
- Dashty M. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin Biochem.* 2013; 46(15), 1339-1352
- DeBerardinis RJ. Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genet Med.* 2008; 10(11), 767-777
- DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene.* 2010; 313-324, 29(3)
- Desler C, Hansen TL, Frederiksen JB, Marcker ML, Singh KK, Juel Rasmussen L. Is There a Link between Mitochondrial Reserve Respiratory Capacity and Aging. *J Aging Res.* 2012; Artikel ID 192503
- Divakaruni AS, Brand MD. The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak. *Physiology (Bethesda)* 2011; 26(3), 192-205
- Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest.* 2013; 123(9), 3685-3692
- D'Souza R, Powell-Tuck J. Glutamine supplements in the critically ill. *J R Soc Med.* 2004; 97(9), 425-427
- Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Krause SW, Kreutz M. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood.* 2007; 109(9), 3812-3819
- Flick DA, Gifford GE. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods.* 1984; 68(1-2), 167-175
- Garegew A, Moncada S. Mitochondrial dysfunction and HIF1 α stabilization in inflammation. *J Cell Sci.* 2008; 121(Pt 20), 3468-3475
- Garegew A, Salvador M. Mitochondrial dysfunction and HIF1 α stabilization in inflammation. *J. Cell Sci.* 2008; 121, 3468-3475
- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(11), 891-899

- Gatenby RA, Smallbone K, Maini PK, Rose F, Averill J, Nagle RB, Worall L, Gillies RJ. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *British Journal of Cancer* 2007; 646-653
- Grander D. How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer?. *Med Oncol.* 1998; 15(1), 20-26
- Halestrap AP. Monocarboxylate transporter 1. *UCSD Nature Molecule Pages* 2009; Published online: 29 Okt 2009
- . The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life.* 2012; 64(1), 1-9
- Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life.* 2012; 64(2), 109-119
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5), 646-674
- Herst PM, Berridge MV. Cell surface oxygen consumption: A major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1767(2), 170-177
- Herst PM, Tan AS, Scarlett DJ, Berridge MV. Cell surface oxygen consumption by mitochondrial gene knockout cells. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1656(2-3), 79-87
- Hill BG, Benavides GA, Lancaster JR Jr, Ballinger S, Dell'Italia L, Jianhua Z, Darley-Usmar VM. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol Chem.* 2012; 393(12), 1485-1512
- Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93(4), 266-276
- Hofhaus G, Shakeley RM, Attardi G. Use of polarograph to detect respiration defects in cell cultures. *Methods Enzymol.* 1996; 264, 476-483
- Horn F. Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Georg Thieme Verlag KG (2012, 5. Auflage) (ISDN: 978-3131308856)
- Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, Ise T, Murakami T, Yoshida T, Nomoto M, Kohno K. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev.* 2003; 29(6), 541-549
- Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 2010; 47, 53-67
- Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman

- J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccharani M, Morra E. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002; 346, 645-652
- Kiebish MA, Han X, Cheng H, Chuang JH, Seyfried TN. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J Lipid Res.* 2008; 49(12), 2545-2556
- Kim YS. Malonate metabolism: biochemistry, molecular biology, physiology, and industrial application. *J Biochem Mol Biol.* 2002; 35(5), 443-451
- Kim J-W, Dang CV. Cancers's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect. *Cancer Res.* 2006; 66(18), 8927-8930
- Kim JW, Gao P, Dang CV. Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26(2), 291-298
- Kim HJ, Khalimonchuk O, Smith PM, Winge DR. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1823(9), 1604-16
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006; 3(3), 177-185
- Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J.* 2000; 19(15), 3896-3904
- Krebs HA. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem.* 1972; 8, 1-34
- Kuai XY, Ji ZY, Zhang ZY. Mitochondrial uncoupling protein 2 expression in colon cancer and its clinical significance. *World J. Gastroenterol* 2010; 16, 5773-5778
- Kulawiak B, Höpker J, Gebert M, Guiard M, Wiedemann N, Gebert N. The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1827(5), 612-626
- Kumar A, Kant S, Singh SM. Targeting monocarboxylate transporter by α -cyano-4-hydroxycinnamate modulates apoptosis and cisplatin resistance of Colo205 cells: implication of altered cell survival regulation. *Apoptosis.* 2013; 18(12), 1574-1585

- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994; 367(6464), 645-648
- Leitlinie Kolorektales Karzinom. (Juni 2013, Langversion 1.0) (ISDN: Reg.Nr.: 021-007OL)
- Li X, Lu W, Hu Y, Wen S, Qian C, Wu W, Huang P. Effective inhibition of nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo by targeting glycolysis with oxamate. *Int J Oncol*. 2013; 43(5), 1710-1718
- Li W, Nichols K, Nathan CA, Zhao Y. Mitochondrial uncoupling protein 2 is up-regulated in human head and neck, skin, pancreatic, and prostate tumors. *Cancer Biomark*. 2010; 13, 377-383
- Locasale JW, Cantley LC. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab*. 2011; 14(4), 443-451
- Manning Fox JE, Meredith D, Halestrap AP. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J Physiol*. 2000; 529 Pt 2, 285-293
- Mathupala SP, Ko YH, Pederson PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol*. 2009; 19(1), 17-24
- Meijer TWH, Schuurbiens OCJ, Kaanders JHAM, Looijen-Salamon MG, de Geus-Oei L-F, Verhagen AFTM, Lok J, van der Heijden HFM, Rademakers SE, Span PN, Bussink J. Differences in metabolism between adeno- and squamous cell non-small cell lung carcinomas: spatial distribution and prognostic value of GLUT1 and MCT4. *Lung Cancer*. 2012; 76(3), 316-23
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007; 274(6), 1393-1418
- Morris ME, Felmler MA. Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid. *AAPS J*. 2008; 10(2), 311-321
- Nicolson GL, Rosenberg NL. Diversification and progression of malignant tumors. *Bioessays*. 1987; 6(5), 204-208
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194(4260), 23-28
- Otto C, Klingelhöffer C, Biggemann L, Melkus G, Mörchel P, Jürgens C, Gahn S, Kämmerer U. Untersuchungen zur Verstoffwechslung von Ketonkörpern und

- Laktat durch Tumorzellen des Gastrointestinaltrakts. *Aktuel Ernährungsmed* 2014; 39, 1-9
- Pacini N, Borziani F. Cancer Stem Cell Theory and the Warbur Effect, Two Sides of the Same Coin?. *Int. J. Mol. Sci* 2014; 15, 8893-8930
- Pasteur L. Memoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère. Examen de la doctrine des générations spontanées. *Ann Sci Nat.* 1861; 16, 5-98
- Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques.* 2011; 50(2), 98-115
- Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science.* 2001; 292(5516), 504-507
- Pfetzer N. Identifizierung und Testung spezifischer Inhibitoren des Energiestoffwechsels von Tumorzellen. Dissertation an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (2011)
- Philp NJ, Ochrietor JD, Rudoy C, Muramatsu T, Linser PJ. Loss of MCT1, MCT3, and MCT4 expression in the retinal pigment epithelium and neural retina of the 5A11/basigin-null mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44(3), 1305-1311
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, G Steger, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD, Team Herceptin Adjuvant (HERA) Trail Study. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353(16), 1659-1672
- Pike Winer LS, Wu M. Rapid Analysis of Glycolytic and Oxidative Substrate Flux of Cancer Cells in a Microplate. *PLoS One.* 2014; 9(10), e109916
- Pinheiro C, Reis RM, Ricardo S, Longatto-Filho A, Schmitt F, Baltazar F. Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44. *J Biomed Biotechnol.* 2010; Article ID: 427694
- Polański R, Hodgkinson CL, Fusi A, Nonaka D, Priest L, Kelly P, Trapani F, Bishop PW, White A, Critchlow SE, Smith PD, Blackhall F, Dive C, Morrow CJ. Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(4), 926-937

- Quennet V, Yaromina A, Zips D, Rosner A, Walenta S, Baumann M, Mueller-Klieser W. Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother Oncol.* 2006; 81(2), 130-135
- Racker E. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem.* 1974; 5(1-2), 17-23
- Radde BN, Ivanova MM, Mai HX, Salabei JK, Hill BG, Klinge CM. Bioenergetic differences between MCF-7 and T47D breast cancer cells and their regulation by oestradiol and tamoxifen. *Biochem. J.* 2015; 465, 49-61
- Rahman M, Deleyrolle L, Vedam-Mai V, Azari H, Abd-El-Barr M, Reynolds BA. The Cancer Stem Cell Hypothesis: Failures and Pitfalls. *Neurosurgery.* 2011; 68(2), 531-545
- Rattigan YI, Patel BB, Ackerstaff E, Sukenick G, Koutcher JA, Glod JW, Banerjee D. Lactate is a mediator of metabolic cooperation between stromal carcinoma associated fibroblasts and glycolytic tumor cells in the tumor microenvironment. *Exp Cell Res.* 2012; 318(4), 326-335
- Reitzer LJ, Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem.* 1979; 254(8), 2669-2676
- Samid D, Shack S, Myers CE. Selective growth arrest and phenotypic reversion of prostate cancer cells in vitro by nontoxic pharmacological concentrations of phenylacetate. *J Clin Invest.* 1993; 95(5), 2288-2295
- Samudio I, Fiegl M, McQueen T, Clise-Dwyer K, Andreeff M. The Warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation. *Cancer Res.* 2008; 68, 5198-5205
- Sattler UG, Meyer SS, Quennet V, Hoerner C, Knoerzer H, Fabian C, Yaromina A, Zips D, Walenta S, Baumann M, Mueller-Klieser W. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother Oncol.* 2010; 94(1), 102-109
- Schneiderhan W, Scheler M, Holzmann KH, Marx M, Gschwend JE, Bucholz M, Gress TM, Seufferlein T, Adler G, Oswald F. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in vivo and in vitro models. *Gut.* 2009; 58(10), 1391-1398
- Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Drewes G, Mietzner BH, Steinberg P, Pfeiffer AFH, Ristow M. Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J. Bio. Chem.* 2005; 281(2), 977-981

- Sebastian C. Tracking down the origin of cancer: metabolic reprogramming as a driver of stemness and tumorigenesis. *Crit Rev Oncog.* 2014; 19(5), 363-382
- Senior AE, Nadanaciva S, Weber J. The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1553(3), 188-211
- Shen YC, Hsu C, Chen LT, Cheng CC, Hu FC, Cheng AL. Adjuvant interferon therapy after curative therapy for hepatocellular carcinoma (HCC): a meta-regression approach. *J Hepatol.* 2010; 52(6), 889-94
- Shroff V, Todor A, Khanal S, Imai M, Sabbah H. Cyclosporine A attenuates mitochondrial permeability transition and improve mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes isolated from dogs with heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(1), 150-158
- Slomiany MG, Grass GD, Robertson AD, Yang XY, Maria BL, Beeson C, Toole BP. Hyaluronan, CD44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 2009; 69(4), 1293-1301
- Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1797(6-7), 1171-1177
- Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest.* 2008; 118(12), 3930-3942
- Stock D, Gibbons C, Arechaga I, Leslie AGW, Walker JE. The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol.* 2000; 10(6), 672-679
- Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(4), 267-277
- Thierbach R, Schulz TJ, Isken F, Voigt A, Mietzner B, Drewes G, von Kleist-Retzow JC, Wiesner J, Magnuson MA, Puccio H, Pfeiffer AF, Steinberg P, Ristow M. Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(24), 3857-3864
- Upadhyay M, Samal J, Kandpal M, Singh OV, Vivekanandan P. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther.* 2013; 137(3), 318-330
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324(5930), 1029-1033

- Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26(2), 225-239
- Walenta S, Salameh A, Lyng H, Evensen JF, Mitze M, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol.* 1997; 150(2), 409-415
- Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfjør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* 2000; 60(4), 916-921
- Wang T, Marquardt C, Foker J. Wang T, Marquardt Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 1976; 261(5562), 702-705
- Warburg O. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Die Naturwissenschaften* 1924; 30, 1131-1137
- . Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Klinische Wochenschrift* 1925; 4(12), 534-536
- . Über die Entstehung der Krebszellen. *Die Naturwissenschaften* 1955; 42(14), 401-406
- Warburg O, Minami S. Versuche an überlebendem Karzinomgewebe. *Klinische Wochenschrift* 1923; 17, 776-777
- Weber J, Senior AE. ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase. *FEBS Lett.* 2003; 545(1), 61-70
- Weinberg F, Chandel NS. Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 11777, 66-73
- Weinhouse S. On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* 1956; 124(3215), 267-269
- Wiedemann J. Die mitochondriale Funktion im Ischämie-Reperfusionsschaden der Lunge. Dissertation an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (2012)
- Wolman SR. Cytogenetic heterogeneity: its role in tumor evolution. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986; 19(1-2), 129-140
- Zhai X, Yang Y, Wan J, Zhu R, Wu Y. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2013; 30(6), 2983-2991

11 Appendix

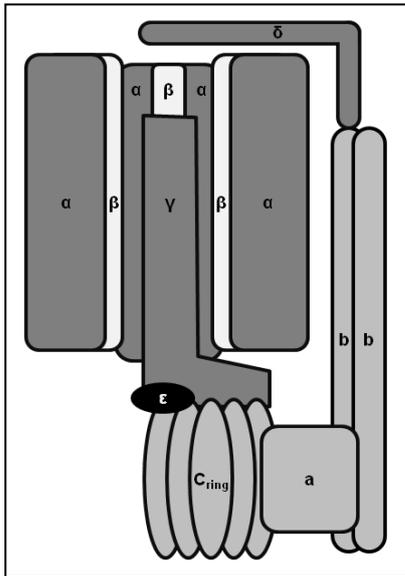


Abb. 11.1: Schematischer Aufbau der ATP-Synthase (Komplex V). Der F₀-Teil (ab₂c₁₀₋₁₄) liegt in der Mitochondrienmembran und F₁-Teil (α₃β₃γ₁δ₁ε₁) befindet sich in der Matrix. Der F₀-Teil besteht aus einer a-, b- und ringförmig angeordneten c-Untereinheit (c_{ring}). Der F₁-Teil besitzt drei katalytische Reaktionszentren, bestehend aus jeweils einer α- und β-Untereinheit sowie einer zentral gelegenen γε Untereinheit. Ein Rotor (γεc_{ring}) verbindet die Teile F₁ und F₀ (Stock D et al., 2000; Senior AE et al., 2002; Weber J, Senior AE, 2003; Wiedemann J, 2012; Ahmad Z, Cox JL, 2014). Die Untereinheiten b₂ (F₀) und δ (F₁) verhindern ein Rotieren der Untereinheiten a (F₀) und der Reaktionszentren αβ (F₁) (Weber J, Senior AE, 2003; Ahmad Z, Cox JL, 2014). Eigener Entwurf, basierend auf Stock D et al., 2000.

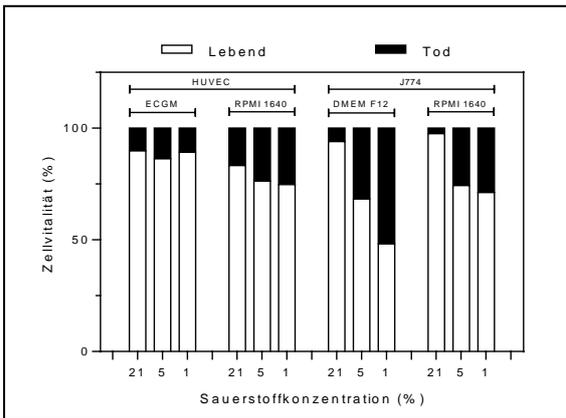


Abb. 11.2: Zellvitalität Kontrollzellen bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff und verschiedener Kulturmedien. Anteil lebender (weiß) und toter (schwarz) Zellen bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen und Medien. Die Ergebnisse basieren auf bis zu zwei unabhängigen Versuchen. Mit abnehmender Sauerstoffkonzentration sinkt die Zellvitalität bei allen Zelllinien.

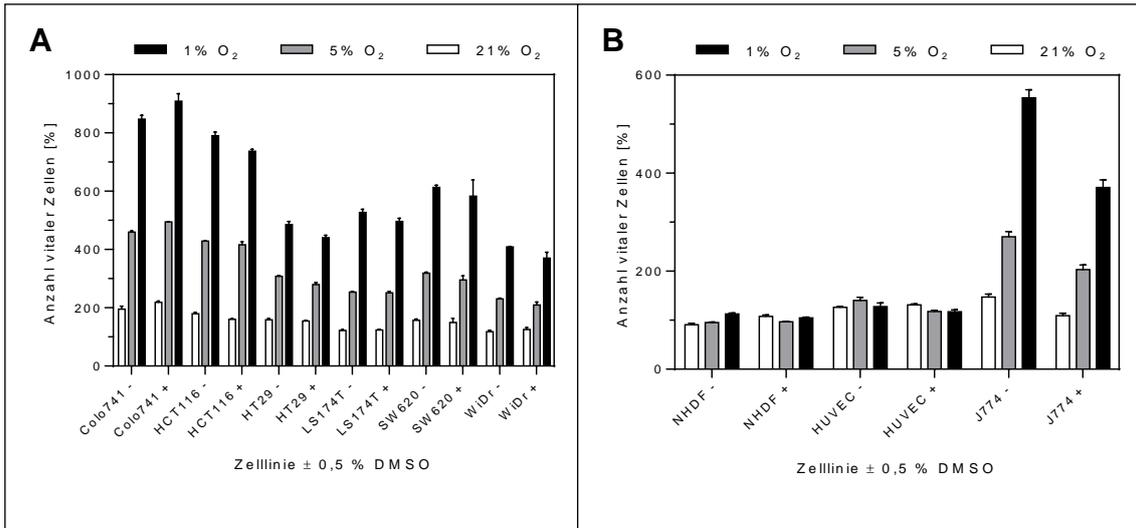


Abb. 11.3: Nachweis eines fehlenden Einflusses von 0,5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) auf das Zellwachstum von malignen (A) und nicht-malignen (B) Zellen. Die Inhibitoren Natriumoxamat (NaOx) und α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (α CHC) wurden in DMSO gelöst. Die Endkonzentration an DMSO in den Versuchsansätzen betrug maximal 0,5 % DMSO. Das Wachstum von jeweils 5 000 Zellen in RPMI 1640 Medium mit und ohne 0,5 % DMSO über einen Zeitraum von 24, 48, und 72 Stunden wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Ergebnisse basieren auf bis zu vier unabhängigen Versuchen.

Tab. 11.1: Basaler Sauerstoffverbrauch, Sauerstoffverbrauch durch oxidative Phosphorylierung, nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch und respiratorische Reservekapazität (RRK) nicht-maligner Zelllinien in unterschiedlichen Medien. Alle Werte sind angegeben in $10^{-6} \text{ mol/L s}^{-1}$ für 10^6 Zellen^{-1} und basieren auf drei unabhängigen Versuchen. Die benignen Zelllinien HUVEC und J774 wurden als Kontrolle verwendet. Die geringe RRK der Zelllinie J774 wird nicht durch unterschiedliche Kulturmedien beeinflusst.

Oligomycinversuch	HUVEC ⁶⁾ RPMI 1640	J774 RPMI 1640	J774 ECGM
Basaler Sauerstoffverbrauch ¹⁾	6,4±1,2	14,2±3,6	10,5±2,7
Oxidative Phosphorylierung ²⁾	k.d. ⁵⁾	10,9±3,0	8,0±2,2
Nicht-Mitochondrialer O ₂ -Verbrauch ³⁾	k.d. ⁵⁾	0,2±0,2	0,7±0,1
Respiratorische Reservekapazität ⁴⁾	k.d. ⁵⁾	4,1±4,2	3,0±4,6

¹⁾ Basaler Sauerstoffverbrauch; Der Sauerstoffverbrauch der Zellen zum Aufrechterhalten der basalen Zellfunktionen. ²⁾ Berechneter Sauerstoffverbrauch, der verwendet wird für die Oxidative Phosphorylierung; auch „ATP Turnover“ genannt. ³⁾ NMO₂: Nicht-Mitochondrialer Sauerstoffverbrauch. ⁴⁾ Respiratorische Reservekapazität: Messgröße für den mitochondrialen Energiestatus der Zelle als Maß für die Anpassung des Elektronentransports an einen erhöhten Energiebedarf dar. ⁵⁾ Keine Daten vorhanden. ⁶⁾ N=2.

Tab. 11.2: Glukoseverbrauch und Laktatbildung bei 21 % Sauerstoff. Die Werte sind angegeben in 10^{-9} mol/L x min^{-1} für 10^6 Zellen. Die Messwerte (Mittelwert \pm Standardabweichung) basieren auf bis zu drei unabhängigen Versuchen. Das Medium war stets RPMI 1640. Zur grafischen Darstellung siehe Abb. 11.4.

	Glukoseverbrauch	Laktatbildung
Colo741	638,7,0 \pm 189,0	1299,0 \pm 301,8
HCT116	519,3 \pm 87,1	922,7 \pm 227,6
HT29	352,1 \pm 29,5	553,8 \pm 36,7
LS174T	770,5 \pm 317,3	1559,8 \pm 534,8
SW620	348,9 \pm 105,6	612,7 \pm 132,4
WiDr	449,7 \pm 59,7	696,6 \pm 78,3
J774	380,1 \pm 35,9	625,5 \pm 80,4
HUVEC	684,1 \pm 231,7	1441,0 \pm 466,5

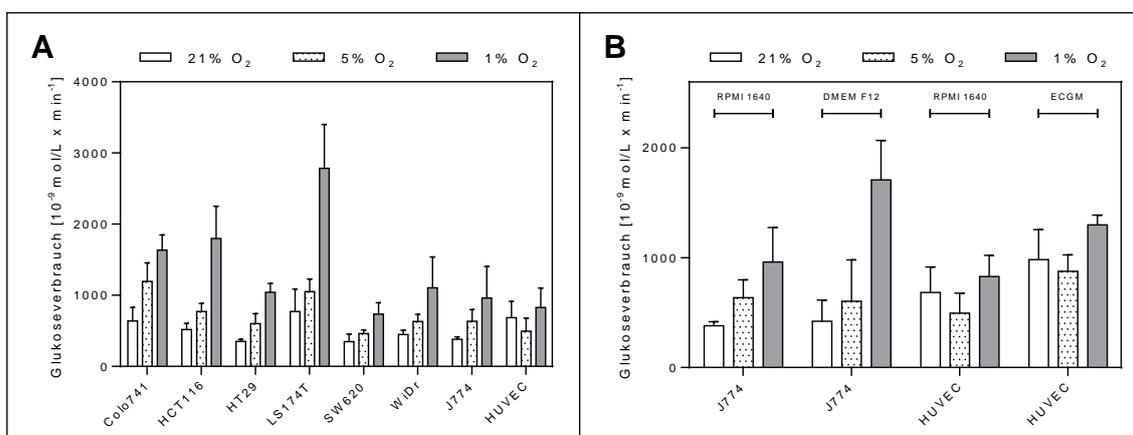


Abb. 11.4: A) Glukoseverbrauch bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff maligner Zellen (A) und nicht-maligner Zellen (B) Alle Versuche wurden im RPMI 1640 Medium durchgeführt und basieren auf drei unabhängigen Versuchen (siehe für die einzelnen Messwerte Tab. 4.4, Tab. 11.2 und Tab. 11.3). Der Glukoseverbrauch ist für 1 Million Zellen angegeben.

Tab. 11.3: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion von Kontrollzellen (J774 und HUVEC) bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff. Alle Werte sind in $10^{-9} \text{ mol/L} \times \text{min}^{-1} \times 10^6 \text{ Zellen}$ angegeben und basieren auf drei unabhängigen Versuchen. Das Versuchsmedium war entweder RPMI 1640 oder das für die Zelllinie spezifische Kulturmedium.

	Glukoseverbrauch			Laktatverbrauch		
	21 %	5 %	1 %	21 %	5 %	1 %
J774 (RPMI 1640)	380,1±35,9	635,5±163,5	961,0±445,3	625,5±80,4	1312,4±360	2244±1049
J774 (DMEM/F12)	422,2±192,2	603,5±376,1	1708,5±508	1072,4±19,7	1976,9±265	3489,4±743
HUVEC (RPMI 1640)	684,1±231,7	495,1±182,3	828,6±272,5	1441,0±467	1094,6±370	1822,9±565
HUVEC (ECGM)	982,8±272,5	876,8±149,9	1299,4±125	2066,0±467	1857,6±270	3476,4±240

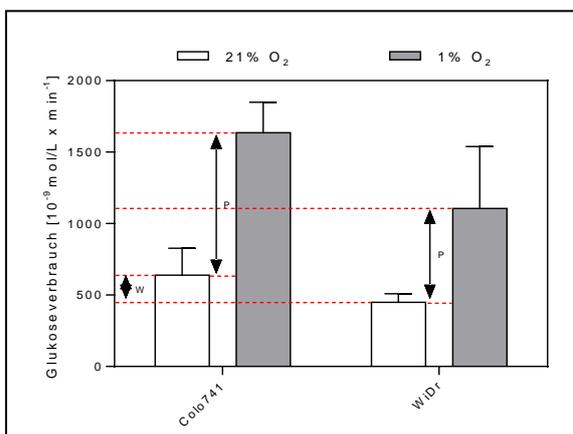
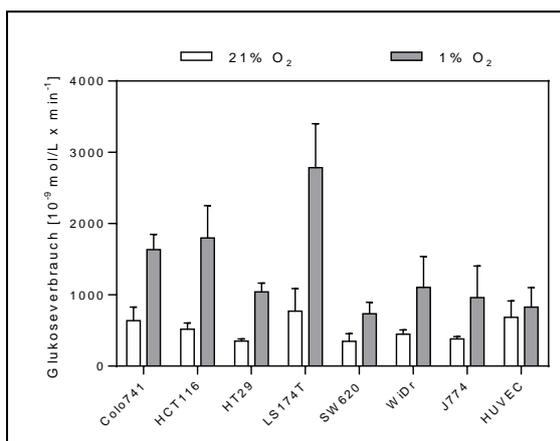


Abb. 11.5: Glukoseverbrauch der Zelllinien WiDr und Colo741 bei 21 % und 1 % Sauerstoff. Die Versuche wurden in RPMI 1640 Medium durchgeführt und basieren auf drei unabhängigen Versuchen. Der Glukoseverbrauch ist für 1 Million Zellen angegeben. Bei beiden Zelllinien ist der Glukoseverbrauch in Anwesenheit von Sauerstoff verringert; dies wird als Pasteur-Effekt („P“) bezeichnet. Der Warburg-Effekt, also der Anteil an Glukose, der in Gegenwart von Sauerstoff in Laktat übergeht, ist mit einem „W“ gekennzeichnet.

Abb. 11.6: Glukoseverbrauch bei 21 % und 1 % Sauerstoff. Die Versuche wurden in RPMI 1640 Medium durchgeführt und basieren auf drei unabhängigen Versuchen. Der Glukoseverbrauch ist für 1 Million Zellen angegeben.



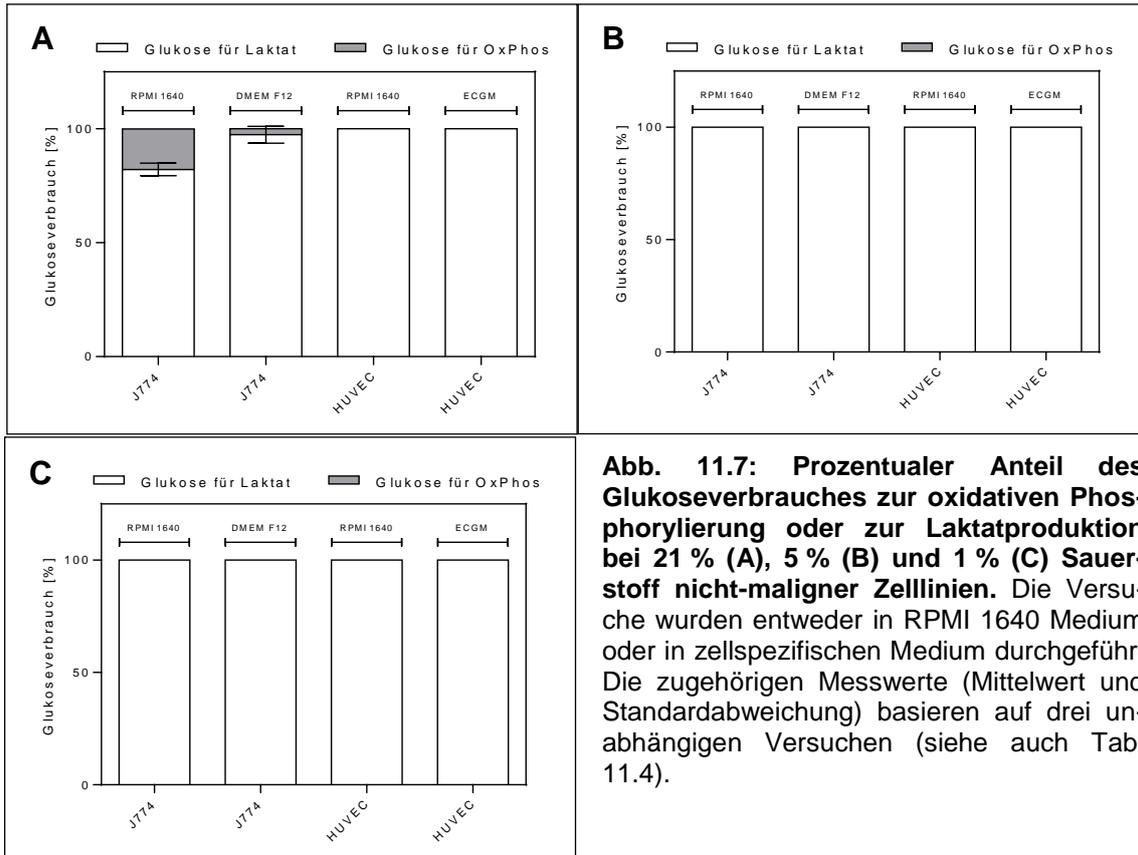


Abb. 11.7: Prozentualer Anteil des Glukoseverbrauches zur oxidativen Phosphorylierung oder zur Laktatproduktion bei 21 % (A), 5 % (B) und 1 % (C) Sauerstoff nicht-maligner Zelllinien. Die Versuche wurden entweder in RPMI 1640 Medium oder in zellspezifischen Medium durchgeführt. Die zugehörigen Messwerte (Mittelwert und Standardabweichung) basieren auf drei unabhängigen Versuchen (siehe auch Tab. 11.4).

Tab. 11.4: Einzelwerte zum prozentualen Glukoseverbrauch anteilig für oxidative Phosphorylierung und Laktatbildung. Alle Messwerte (Mittelwert ± zugehöriger Standardabweichung) sind in Prozent (%) angegeben und stellen die zugehörigen Einzelwerte von Abb. 11.7 dar. Die Versuche wurden entweder in RPMI 1640 Medium oder in zellspezifischen Medium durchgeführt. Die Messwerte basieren auf drei unabhängigen Versuchen.

	OxPh ¹⁾	Laktat ²⁾	OxPh ¹⁾	Laktat ²⁾	OxPh ¹⁾	Laktat ²⁾
	21 %	21 %	5 %	5 %	1 %	1 %
J774 (RPMI)	17,9 ± 3,2	82,1 ± 3,2	-	100	-	100
J774 (DMEM/F12)	2,6 ± 4,2	97,4 ± 4,2	-	100	-	100
HUVEC (RPMI)	-	100	-	100	-	100
HUVEC (ECGM)	-	100	-	100	-	100

¹⁾ OxPh: Prozentualer Anteil Glukoseverbrauch für die oxidative Phosphorylierung ²⁾ Laktat: Prozentualer Anteil Glukoseverbrauch für die Laktatproduktion. Glukose. (-) kein Messwert, somit kein Nachweis für OxPh.

Tab. 11.5: Einzelwerte zum prozentualen Glukoseverbrauch anteilig für oxidative Phosphorylierung und Laktatbildung. Alle Messwerte (Mittelwert \pm zugehöriger Standardabweichung) sind in Prozent (%) angegeben und stellen die zugehörigen Einzelwerte von Abb. 4.4 dar. Die Versuche wurden in RPMI 1640 Medium durchgeführt.

	21% Sauerstoff		5% Sauerstoff		1 % Sauerstoff	
	OxPh ¹⁾	Laktat ²⁾	OxPh ¹⁾	Laktat ²⁾	OxPh ¹⁾	Laktat ²⁾
Colo 741	1,0 \pm 1,2	99,0 \pm 1,2	-	100	-	100
HCT116	11,9 \pm 6,5	88,1 \pm 6,5	0,1 \pm 0,1	99,9 \pm 0,1	-	100
HT29	21,2 \pm 1,6	78,8 \pm 1,6	4,4 \pm 1,4	96,6 \pm 1,4	-	100
LS174T	1,4 \pm 1,2	98,6 \pm 1,2	-	100	-	100
SW620	10,6 \pm 9,2	89,4 \pm 9,2	-	100	-	100
WiDr	21,8 \pm 2,1	78,2 \pm 2,1	3,1 \pm 4,1	96,9 \pm 4,1	-	100
J774	17,9 \pm 3,2	82,1 \pm 3,2	-	100	-	100
HUVEC	-	100	-	100	-	100

¹⁾ OxPh: Prozentualer Anteil Glukoseverbrauch für die oxidative Phosphorylierung ²⁾ Laktat: Prozentualer Anteil Glukoseverbrauch für die Laktatproduktion

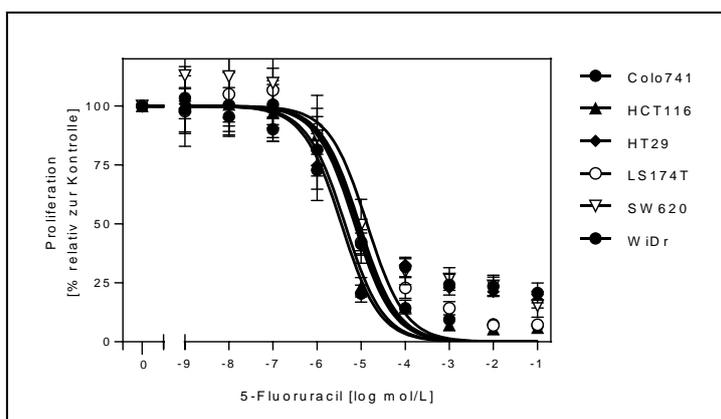


Abb. 11.8: Bestimmung der IC₅₀-Werte von 5 Fluoruracil (5FU) für die kolorektalen Karzinomzelllinien. Für die Dreifachkombinationen wurde ein IC₅₀-Wert von 5×10^{-6} mol/L gewählt. Die für diese Entscheidung zu Grunde liegenden Versuche basieren auf bis zu sechs unabhängigen Versuchen. Im Laufe der Kombinationsversuche erhöhte sich die Versuchszahl auf bis zu acht (siehe Tab. 4.6 und Abb. 4.5). Die

Wirksamkeit von 5-FU wurde für einen Konzentrationsbereich von 10^{-9} mol/L bis 10^{-1} mol/L überprüft. Mit dem Computerprogramm „Graphpad Prism 6.04“ wurde der Kurvenverlauf erstellt und die IC₅₀-Werte berechnet.

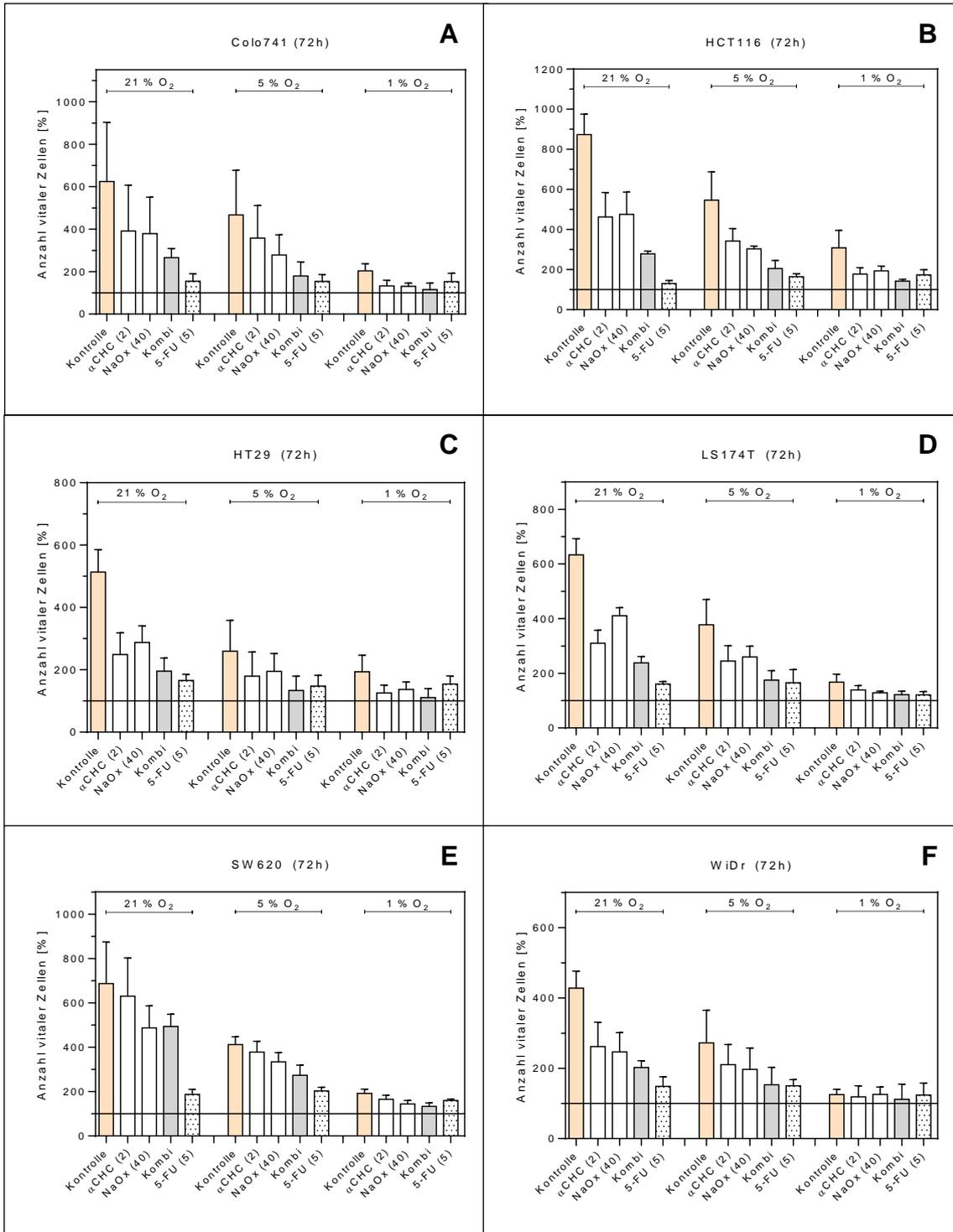


Abb. 11.9: Der antiproliferative Effekt von NaOx, αCHC und 5-FU. Der Anteil vitaler Zellen wurde bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) nach 72 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse beruhen auf vier unabhängigen Versuchen und sind bezogen auf die Aussaat (5.000 Zellen pro Vertiefung), die als 100 % gesetzt wird. Unbehandelte Kontrolle (rot); αCHC 2×10^{-3} mol/L (weiß); NaOx 40×10^{-3} mol/L (weiß); Kombi 2×10^{-3} mol/L αCHC und 40×10^{-3} mol/L NaOx (grau, „Kombi“); 5-FU 5×10^{-6} mol/L (gepunktet).

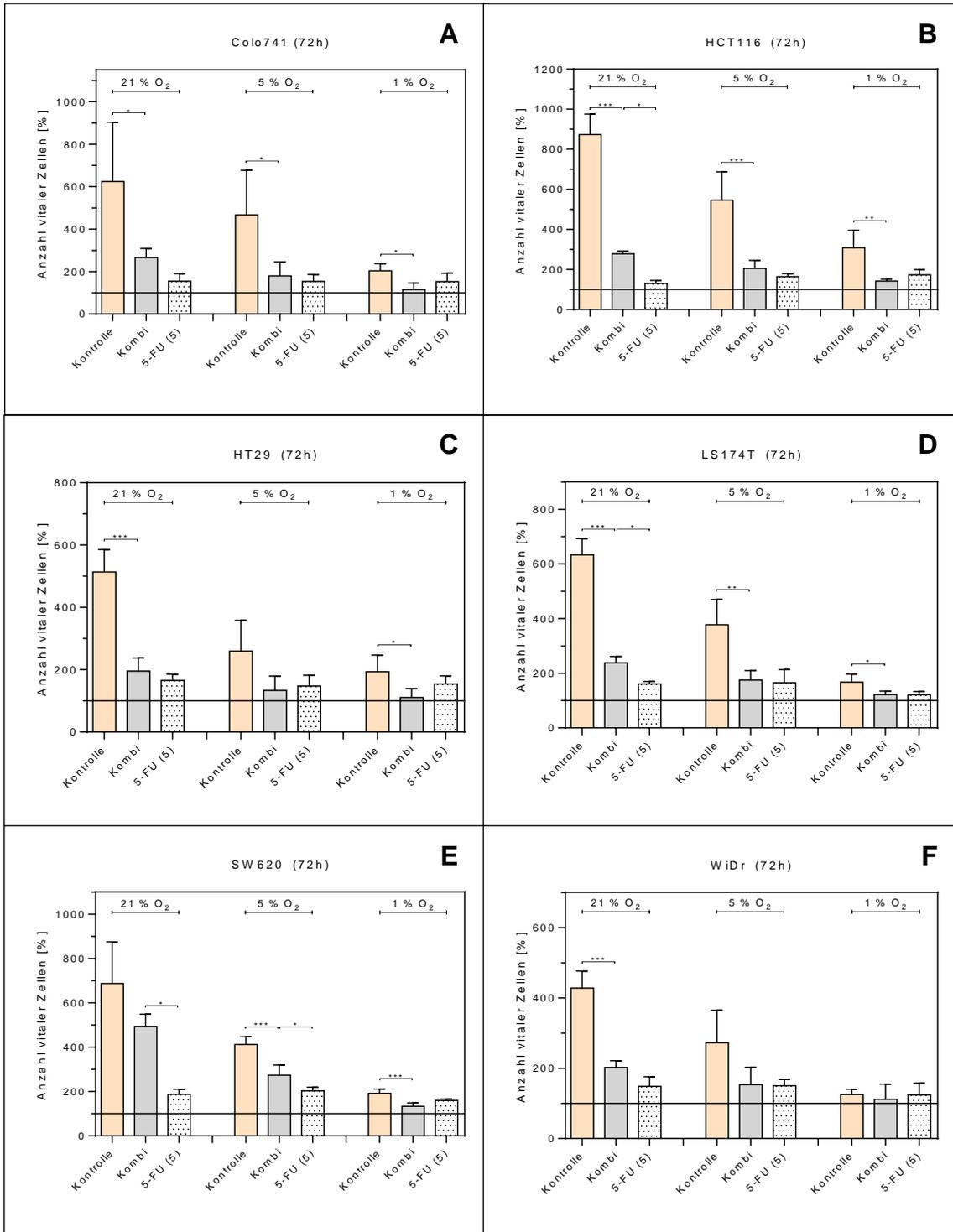


Abb. 11.10: Der antiproliferative Effekt der Kombination aus NaOx und α CHC im Vergleich zu 5-FU. Der Anteil vitaler Zellen bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) wurde nach 72 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse beruhen auf vier unabhängigen Versuchen und sind bezogen auf die Aussaat (5.000 Zellen pro Vertiefung), die als 100 % gesetzt wird. Unbehandelte Kontrolle (rot); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC und 40×10^{-3} mol/L NaOx (grau, „Kombi“); 5-FU 5×10^{-6} mol/L (gepunktet).

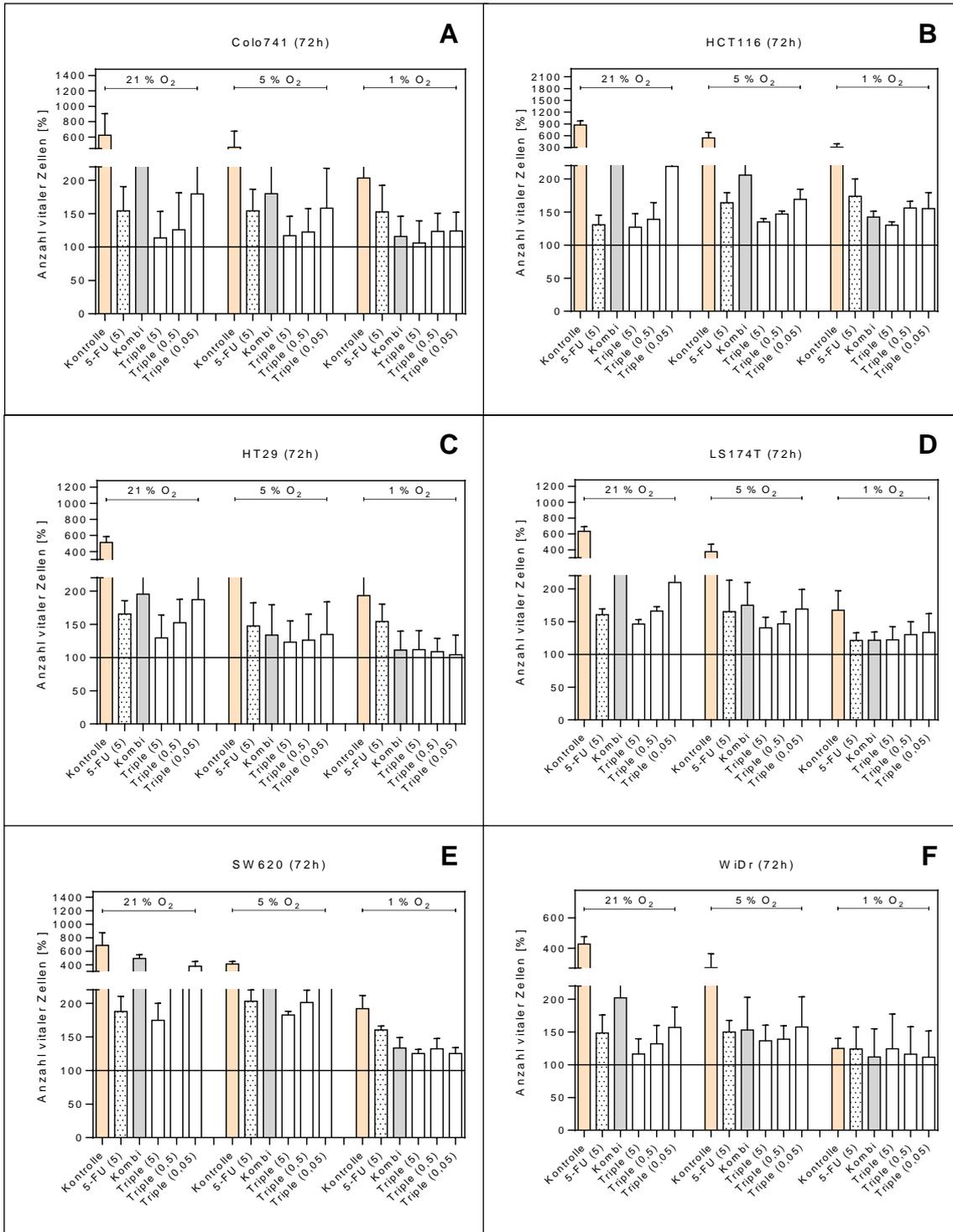


Abb. 11.11: Der antiproliferative Effekt der Dreifachkombinationen. Der Anteil vitaler Zellen wurde bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % und 1 %) nach 72 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse beruhen auf vier unabhängigen Versuchen und sind bezogen auf die Aussaat (5.000 Zellen pro Vertiefung), die als 100 % gesetzt wird. Unbehandelte Kontrolle (rot); 5-FU 5×10^{-6} mol/L (gepunktet); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC und 40×10^{-3} mol/L NaOx (grau, „Kombi“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und 5×10^{-6} mol/L 5-FU (weiß; „Triple 5“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und $0,5 \times 10^{-6}$ mol/L 5-FU (weiß; „Triple 0,5“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und $0,05 \times 10^{-6}$ mol/L 5-FU (weiß; „Triple 0,05“).

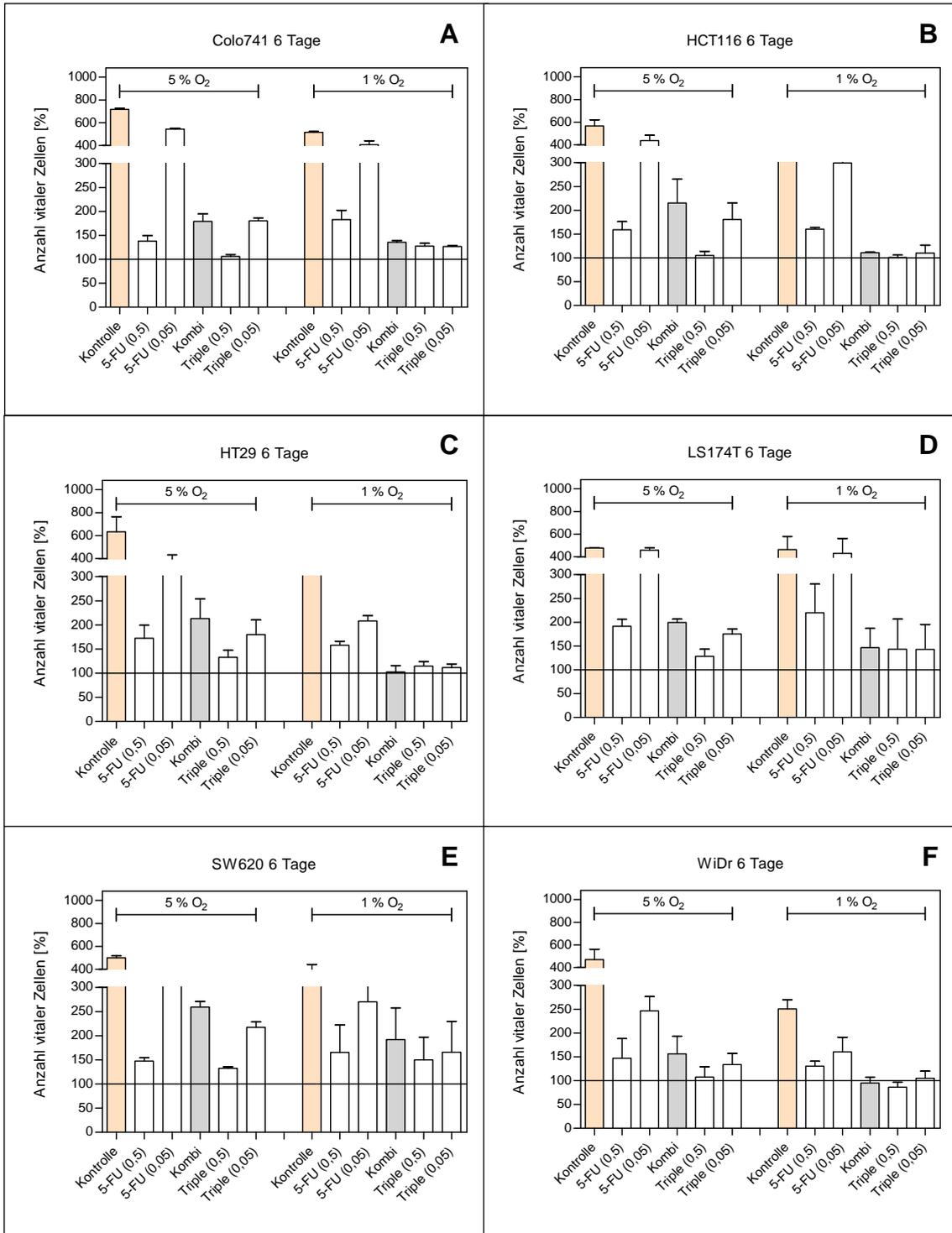


Abb. 11.12: Der antiproliferative Effekt der Zweifach- und Dreifachkombinationen. Der Anteil vitaler Zellen wurde bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 % nach 6 Tagen bestimmt. Die Ergebnisse beruhen auf bis zu zwei unabhängigen Versuchen und sind bezogen auf die Aussaat (5.000 Zellen pro Vertiefung), die als 100 % gesetzt wird. Unbehandelte Kontrolle (rot); 5-FU $0,5 \times 10^{-6}$ mol/L (weiß; „5-FU 0,5“); 5-FU $0,05 \times 10^{-6}$ mol/L (weiß; „5-FU 0,05“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC und 40×10^{-3} mol/L NaOx (grau; „Kombi“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und $0,5 \times 10^{-6}$ mol/L 5-FU (weiß; „Triple 0,5“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und $0,05 \times 10^{-6}$ mol/L 5-FU (weiß; „Triple 0,05“).

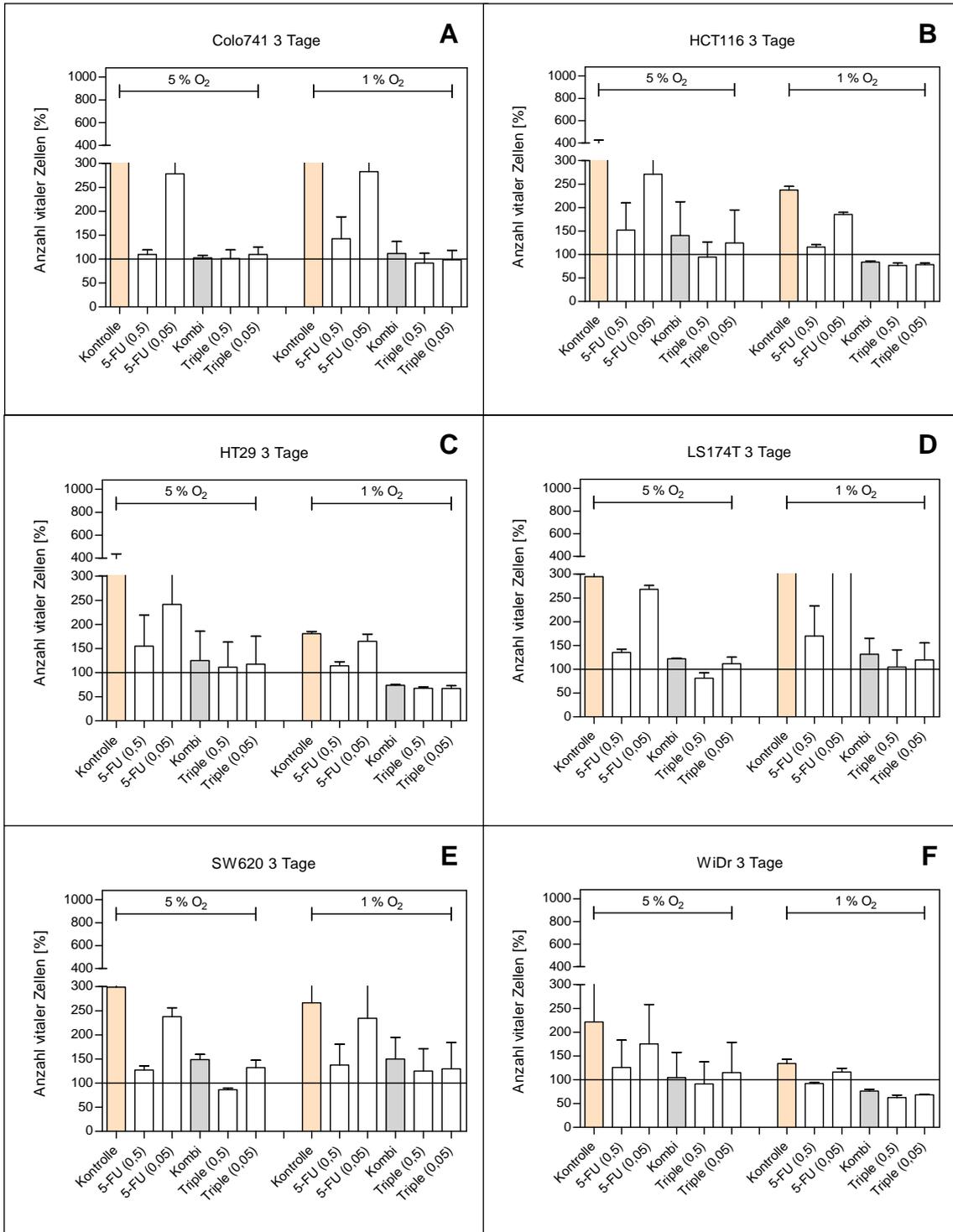


Abb. 11.13: Der antiproliferative Effekt der Zweifach- und Dreifachkombinationen. Der Anteil vitaler Zellen wurde bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 %) nach 3 Tagen bestimmt. Die Ergebnisse beruhen auf bis zu zwei unabhängigen Versuchen und sind bezogen auf die Aussaat (5.000 Zellen pro Vertiefung), die als 100 % gesetzt wird. Unbehandelte Kontrolle (rot); 5-FU $0,5 \times 10^{-6}$ mol/L (weiß; „5-FU 0,5“); 5-FU $0,05 \times 10^{-6}$ mol/L (weiß; „5-FU 0,05“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC und 40×10^{-3} mol/L NaOx (grau; „Kombi“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und $0,5 \times 10^{-6}$ mol/L 5-FU (weiß; „Triple 0,5“); Kombination aus 2×10^{-3} mol/L α CHC, 40×10^{-3} mol/L NaOx und $0,05 \times 10^{-6}$ mol/L 5-FU (weiß; „Triple 0,05“).

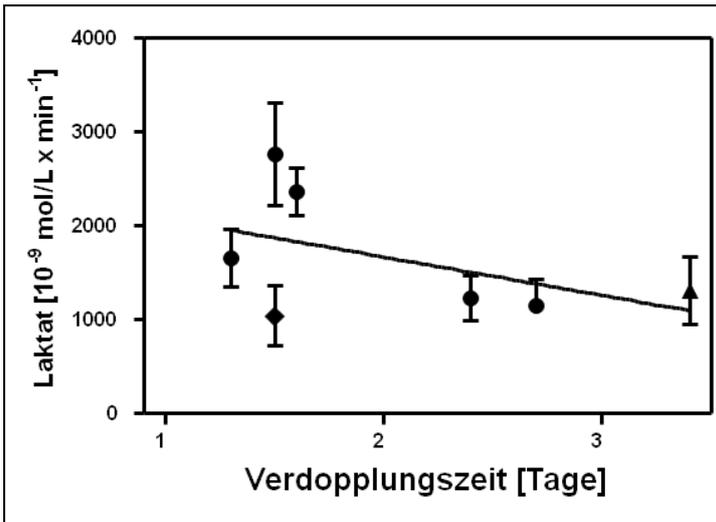
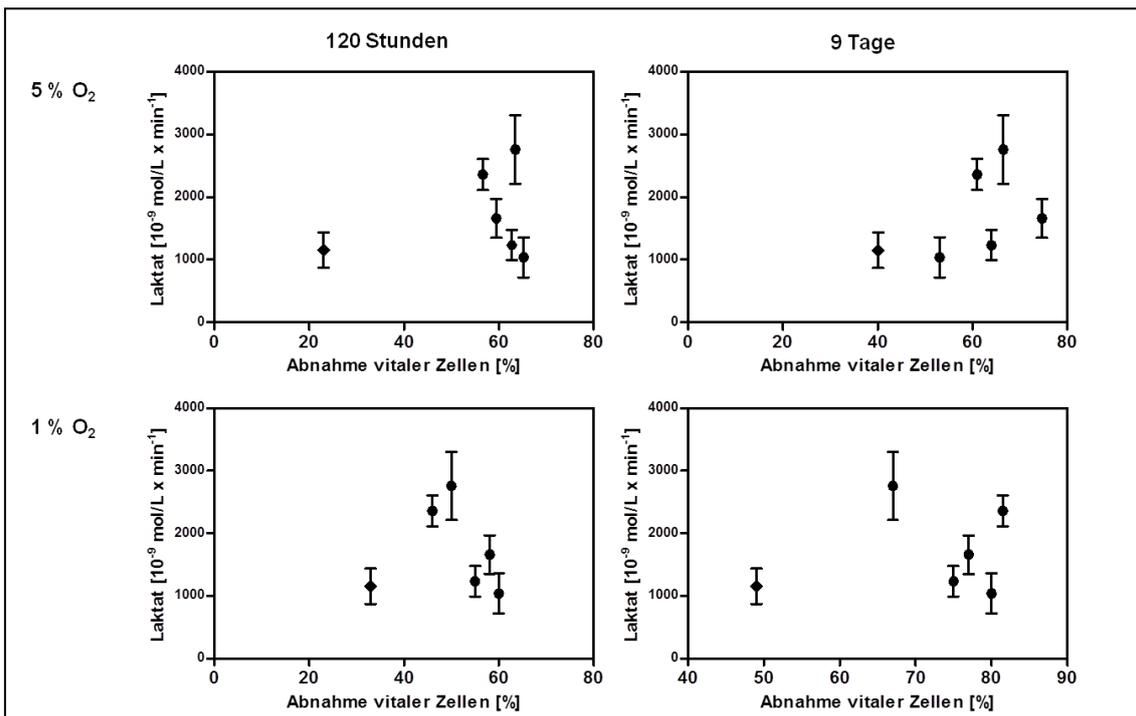


Abb. 11.14: Vergleich zwischen Zellwachstum und Stärke der Laktatbildung bei kolorektalen Karzinomzelllinien. Aus der graphischen Darstellung ist zu erkennen, dass, die stärksten Laktatbildner die kürzeste Verdopplungszeit aufweisen. Der Zusammenhang ist mit dieser geringen Anzahl an untersuchten Zelllinien statistisch nicht signifikant. SW620 (Raute), J774 (Dreieck), Colo741, HCT116, HT29, LS174T, WiDr (Kreis).

Abb. 11.15: Wirksamkeit der beiden Inhibitoren NaOx und α CHC in Abhängigkeit der Stärke der Laktatbildung. Gezeigt ist die prozentuale Abnahme vitaler Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle nach 120 Stunden und 9 Tagen bei 5 % und 1 % Sauerstoff. Bei dieser Darstellung wird deutlich, dass SW620-Zellen (Raute) weniger sensitiv auf die Inkubation mit beiden Inhibitoren reagiert, als die Zellen der anderen 5 Zelllinien Colo741, LS174T, HCT116, WiDr und HT29 (siehe auch Tab. 6.2).



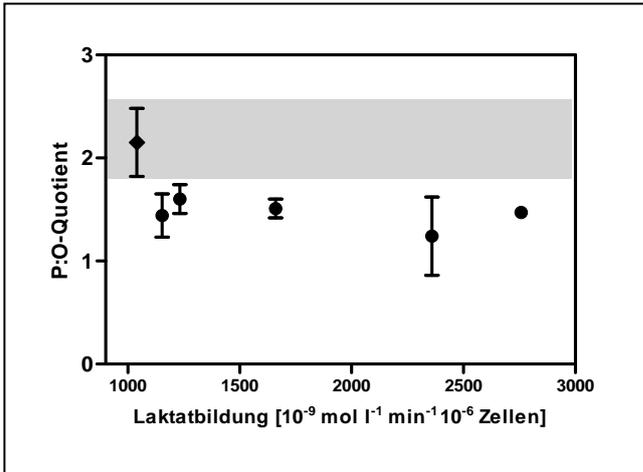


Abb. 11.16: Zusammenhang zwischen der Effektivität der Atmungskette (P:O-Quotient) und der Stärke der Laktatbildung. In dieser Darstellung kommt das mehr „oxidative“ Profil von SW620 Zellen (Raute) im Vergleich zu dem glykolytischen Profil der anderen kolorektalen Karzinomzelllinien zum Ausdruck.

Abb. 11.17: Die in dieser Arbeit verwendeten Originalblots für Abb. 4.2. Nachweis von LDH-A und LDH-B in kolorektalen Karzinomzellen und Kontrollzellen (HUVEC, J774). HeLa = interne Kontrolle.

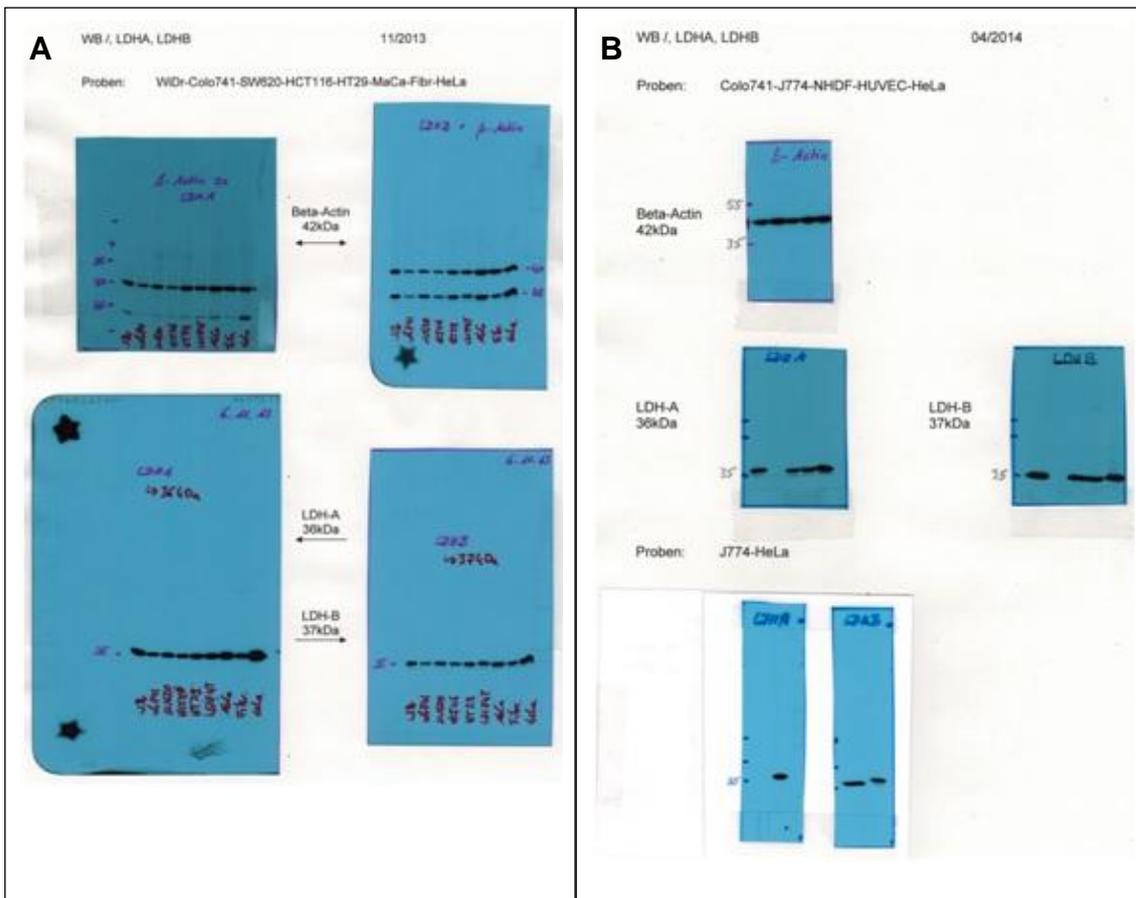
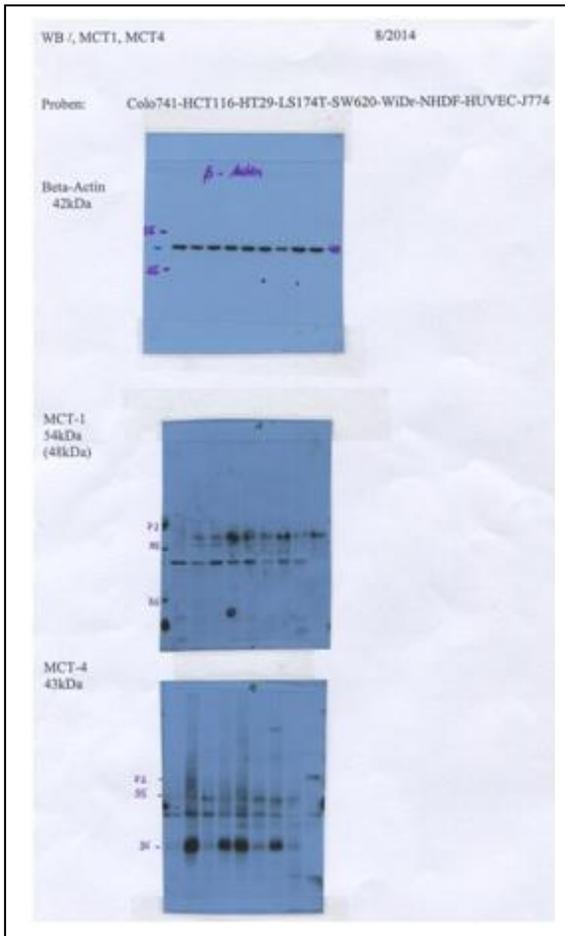


Abb. 11.18: Die in dieser Arbeit verwendeten Originalblots für Abb. 4.2. Nachweis von MCT-1 und MCT-4.



Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Untersuchungen zum anti-proliferativen Potential von Stoffwechsellinhibitoren bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen“ eigenhändig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Investigations on antiproliferative potential of metabolism inhibitors in the presence of tumor physiological concentrations of oxygen” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. C.-T. Germer, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg der Julius-Maximilians-Universität danke ich für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Otto danke ich außerordentlich für das interessante Thema, die zuverlässige und nachhaltige wissenschaftliche Betreuung, sowie für seine freundliche Unterstützung, kritischen Ratschläge und Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Frau Dr. S. Sommer möchte ich besonders für ihre tatkräftige, intensive sowie hervorragende Unterstützung bei den Messungen mit der Clark-Elektrode danken.

Die Mitarbeiter und Doktoranden der Experimentellen Chirurgie haben mich in angenehmer Arbeitsatmosphäre unermüdlich unterstützt. Für die praktischen Tipps, wertvollen Anregungen und stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche bedanke ich mich insbesondere bei Frau S. Gahn, Frau M. Koospal, Frau B. Mühling und Frau M. Hofmann.

Frau Prof. Dr. rer. hum. biol. U. Kämmerer, Leiterin des Forschungsbereichs der Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg, danke ich für ihre kritischen Ratschläge. Frau M. Kapp bin ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und intensive Unterstützung bei den Untersuchungen in der Hypoxiekammer sehr dankbar.

Auch Frau Dr. M. Camara und Frau F. Krummenast sei an dieser Stelle für den hilfreichen und intensiven Gedankenaustausch, die guten und lehrreichen Gespräche und ihre Unterstützung sehr herzlich gedankt.