



**Der antiproliferative Effekt des *Multidrug resistance*-Protein 1 (MRP1)-Inhibitors  
Reversan und der Laktatdehydrogenase (LDH)-Inhibitoren Natriumoxamat und  
Galloflavin an kolorektalen Karzinomzellen bei tumorphysiologischen Sauerstoff-  
konzentrationen**

**Antiproliferative effects of multidrug resistance protein 1 (MRP1) inhibitor Reversan  
and lactate dehydrogenase (LDH) inhibitors Natriumoxamat and Galloflavin  
in human colorectal cells exposed to oxygen levels  
characteristic for tumor oxygenation**

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

**Anne Quenzer**

aus

**Schweinfurt**  
Würzburg 2017

Eingereicht am: .....

Bürostempel

### **Mitglieder des Promotionskomitees:**

Vorsitzende/r: .....

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

2. Betreuer: .....

3. Betreuer: .....

( 4. Betreuer: ..... )

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunden ausgehändigt am: .....

*Til min kjaere bestemor*  
*(Für meine geliebte Oma)*

*Solveig Iversen*

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
	1.1 Staging und Therapie des kolorektalen Karzinoms .....	1
	1.2 Der Energiestoffwechsel maligner Zellen .....	2
	1.3 Bedeutung der Laktatdehydrogenase für den Stoffwechsel maligner Zellen .....	5
	1.4 Konzept einer kombinierten Inhibition von MRP1 und LDH.....	7
	1.5 Erwartete Ziele .....	8
<b>2</b>	<b>Fragen .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>17</b>
	4.1 Charakterisierung der fünf kolorektalen Karzinomzelllinien .....	17
	4.2 Der antiproliferative Effekt von 5-FU.....	18
	4.3 Der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan einzeln und in Kombination mit 5-FU .....	22
	4.4 Der antiproliferative Effekt unterschiedlicher Kombinationen aus Natrium- oxamat, Galloflavin und Reversan .....	31
<b>5</b>	<b>Beantwortung der Fragen .....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>37</b>
	6.1 Die intratumorale Heterogenität von Tumoren .....	37
	6.2 Beeinflussung des Tumorwachstums durch Inhibition der Laktatdehydrogenase.....	38
	6.3 Effekte von MRP1 in normalen und malignen Zellen .....	41
	6.4 Antiproliferative Effekte der Kombinationen aus Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan .....	42
	6.5 Der Einfluss von Tumorphoxie auf die Funktion von LDH und MRP1 .....	45
<b>7</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>48</b>
<b>8.1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>49</b>
<b>8.2</b>	<b>Summary .....</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>10</b>	<b>Appendix.....</b>	<b>61</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung, Danksagung, Lebenslauf, Veröffentlichungen</b>	

# 1 Einleitung

---

Das kolorektale Karzinom, hierbei handelt es sich vorwiegend um ein Adenokarzinom, stellt das häufigste Malignom des Gastrointestinal-Traktes dar. Es steht bei Frauen an zweiter und bei Männern an dritter Stelle aller Krebsneuerkrankungen (Robert-Koch-Institut und Gesell. der epidemiolog. Krebsregister in Deutschland e.V., 2015)<sup>1)</sup>. Das kolorektale Karzinom entwickelt sich aus Neoplasien des Darmepithels (adenomatöse Polypen) über eine Reihe von Mutationen z. B. in den Tumorsuppressorgenen APC<sup>2)</sup> oder p53, die zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Diese neoplastische Transformation wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet (Fearon und Vogelstein, 1990; Armaghany et al., 2002).

## 1.1 Staging und Therapie des kolorektalen Karzinoms

Die Stadieneinteilung (»Staging«) des kolorektalen Karzinoms basiert innerhalb der Klassifikation nach UICC (*Union International Contre le Cancer*) auf dem TNM-System. Dabei wird mit »T« die Ausdehnung des Primärtumors bezeichnet, mit »N« das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und mit »M« das Vorhandensein hämatogener Fernmetastasen. Aus der Kombination dieser drei Parameter ergeben sich die Stadien I-IV (die Stadien II-IV sind noch unterteilt), woran sich maßgeblich die Therapie orientiert. In den UICC Stadien I und II befinden sich Patienten mit lokalem Tumor ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen, im UICC Stadium III befinden sich Patienten mit Lymphknotenmetastasen unabhängig von der Ausdehnung des Primärtumors und im UICC Stadium IV befinden sich alle Patienten mit Fernmetastasen unabhängig vom Primärtumor und Lymphknotenmetastasen (Wittekind und Meyer, 2010). Die 5-Jahres-Überlebensrate beim kolorektalen Karzinom liegt aktuell für Deutschland bei ca. 63 % (Robert-Koch-Institut und Gesell. der epidemiolog. Krebsregister in Deutschland e.V., 2015).

---

<sup>1)</sup> [www.gekid.de](http://www.gekid.de)

<sup>2)</sup> Adenomatous polyposis coli; das durch dieses Gen codierte Protein ist an der Degradation von  $\beta$ -Catenin, einem Mediatorprotein des für die Zellentwicklung wichtigen Wnt-Signalweges.

Als Behandlung der Wahl bleibt die vollständige operative (R0) Resektion des tumortragenden Darmabschnittes und der Lymphknoten im zugehörigen Lymphabflussgebiet. Dies gilt auch im fortgeschrittenen Stadium (ab UICC II) oder bei Vorliegen von Metastasen. Beim lokal fortgeschrittenen kolorektalen Karzinom erfolgt nach R0-Resektion eine multimodale Therapie aus adjuvanter Chemotherapie und/oder Radiochemotherapie. Als adjuvante Chemotherapie kommt für gewöhnlich eine auf 5-Fluoruracil (5-FU) basierte Mono- oder Kombinationstherapie zum Einsatz. Fortgeschrittene Rektumkarzinome im mittleren und unteren Drittel werden zudem neoadjuvant vorbehandelt. In den letzten Jahren wurde das Therapiespektrum für das kolorektale Karzinom um monoklonale Antikörper erweitert, die den Rezeptor von Wachstumsfaktoren (Cetuximab<sup>3)</sup>) blockieren oder an Angiogenesefaktoren (Bevacizumab<sup>4)</sup>) binden (Pox et al., 2013). Ein Überlebensvorteil durch die zusätzliche Behandlung mit diesen Antikörpern ist bisher für das metastasierte kolorektale Karzinom gesichert (Hagan et al., 2013).

## 1.2 Der Energiestoffwechsel maligner Zellen

Maligne Zellen weisen Besonderheiten in ihrem Energiestoffwechsel auf, die möglicherweise Targets für therapeutische Ansätze bieten (Tennant et al., 2010). Die beiden amerikanischen Krebsforscher Hanahan und Weinberg haben in ihrem viel beachteten Übersichtsartikel »*The Hallmarks of Cancer*« aus 2000 die Eigenschaften maligner Zellen kategorisiert (Hanahan und Weinberg, 2000) und in ihrer Überarbeitung aus 2011 um zwei weitere Eigenschaften ergänzt, wozu auch der tumorspezifische Energiestoffwechsel zählt (Hanahan und Weinberg, 2011).

Ein grundlegender Stoffwechselweg, über den nahezu sämtliche biologische Systeme verfügen, stellt die Glykolyse dar (Abb. 1.1). Hierbei handelt es sich um eine im Zytosol der Zelle lokalisierte mehrstufige Abfolge enzymatischer Reaktionen, bei der Glukose zu Pyruvat (teil)oxidiert wird und gleichzeitig ATP<sup>5)</sup> und Reduktionsäquivalente<sup>6)</sup> in

---

<sup>3)</sup> Der Antikörper Cetuximab bindet an den »Epidermal Growth Factor Receptor« (EGFR).

<sup>4)</sup> Der Antikörper Bevacizumab (Handelsname Avastin) den »Vascular Endothelial Growth Factor« (VEGF).

<sup>5)</sup> Adenosinriphosphat (ein universeller Energieträger der Zelle).

Form von  $\text{NADH}+\text{H}^+$  gebildet werden. Da der Großteil der aus Glukose nutzbaren Energie sich noch im Pyruvat befindet, wird dieser Metabolit von der Zelle weiter verstoffwechselt (oxidiert). Während die Oxidation von Glukose zu Pyruvat ohne Sauerstoff auskommt, sie stellt biochemisch eine Dehydrierung dar, ist für die weitere Oxidation von Pyruvat, die in den Mitochondrien abläuft, Sauerstoff erforderlich. Hierzu wird Pyruvat bzw. Acetyl-CoA<sup>7)</sup> zuerst im Citratzyklus zu Kohlendioxid oxidiert und die freiwerdenden Elektronen auf Reduktionsäquivalente ( $\text{NADH}+\text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$ ) übertragen. Diese und die Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse übergeben ihre Elektronen an die Atmungskette, die ihrerseits diese stufenweise auf molekularen Sauerstoff überträgt. Durch diese oxidative Phosphorylierung werden ca. 30 Moleküle ATP pro Molekül Glukose gebildet. Das ist 15mal mehr ATP als in der Glykolyse durch Teiloxidation von Glukose gewonnen wird (Dashty, 2013).

Gesundes Gewebe bezieht bis zu 70 % seines Energiebedarfs aus der oxidativen Phosphorylierung (Jang et al., 2013). Voraussetzung ist eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff (Normoxie), die im Gewebe für eine Diffusionsstrecke von ca. 100-150  $\mu\text{m}$  ab einem Blutgefäß erreicht wird. Zellen, die außerhalb dieser Versorgungszone liegen, sind mit Sauerstoff unterversorgt und damit hypoxischen Bedingungen ausgesetzt (Fenton et al., 2002; Lopci et al., 2014). Ein wesentlicher Grund für die unzureichende Versorgung von Tumoren mit Sauerstoff ist ihre abnorme Vaskularisation und Perfusion, die zu einer verminderten Diffusion führen (Höckel und Vaupel, 2001; Vaupel und Mayer, 2007). Schätzungen gehen davon aus, dass ca. 60 % der soliden Tumoren hypoxische und anoxische Bereiche aufweisen (Vaupel und Mayer, 2005).

In Hypoxie entfällt molekularer Sauerstoff als Akzeptor für Elektronen aus der Oxidation von Glukose und die Zelle muss die anfallenden Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse auf andere Weise reoxidieren. Hierzu verbleibt Pyruvat im Zytosol und wird selbst zum Akzeptor für die Elektronen von  $\text{NADH}+\text{H}^+$ . Dabei wird Pyruvat zu Milchsäu-

---

<sup>6)</sup> Die beiden »Wasserstoffträger« Nicotinamadenindinucleotid ( $\text{NAD}^+$ ) und (Flavinadenindinucleotid ( $\text{FAD}$ ) nehmen Elektronen aus Oxidationsreaktionen auf und geben diese bei Reduktionsreaktionen wieder ab wie z. B. an die Atmungskette.

<sup>7)</sup> Acetyl-CoA («aktivierte Essigsäure») entsteht durch oxidative Decarboxylierung von Pyruvat. Hierzu wird unter Abspaltung von  $\text{CO}_2$  der verbleibende Essigsäurerest an die SH-Gruppe des Coenzym A gebunden. Erst in dieser Form wird Pyruvat im Citratzyklus weiter verstoffwechselt (oxidiert). Diese Reaktion katalysiert der Multienzymkomplex Pyruvatdehydrogenase.

re bzw. Laktat<sup>8)</sup> reduziert und reoxidiertes NAD<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor erneut in der Glykolyse eingesetzt. Diese Reaktion wird von der Laktatdehydrogenase katalysiert (Dashty, 2013).

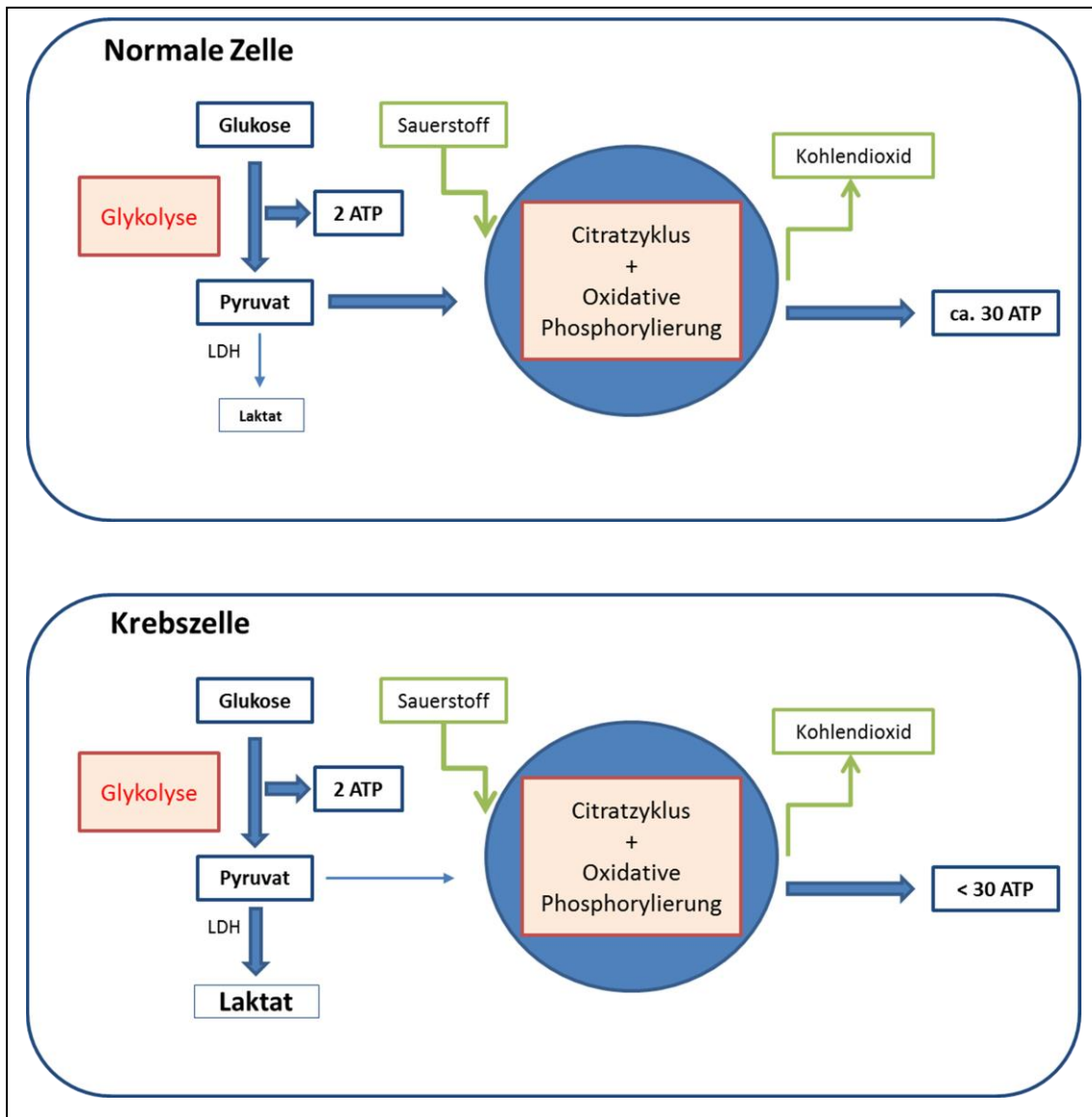
Die in soliden Tumoren vorherrschende Versorgung mit Sauerstoff von unter 2 % (McKeown, 2014) erfordert eine auf die Glykolyse weitestgehend beschränkte ATP-Produktion, die den Energiebedarf der Krebszelle sichern kann (Pelicano et al., 2006; Vander Heiden et al., 2009; Locasale und Cantley, 2011). Hierzu wird der Glukoseumsatz in der Glykolyse erhöht (hyperaktive Glykolyse), was mit einer starken Laktatbildung einhergeht, und als Anpassung an hypoxische Bedingungen gesehen wird (Bailey et al., 2013). Eine hyperaktive Glykolyse basiert auf einer Abhängigkeit der Krebszelle vom Energieträger Glukose, einer ungehemmten Aktivität der Laktatdehydrogenase und - zur Vermeidung einer intrazellulären Übersäuerung - einem unbeschränkten Transport von Laktat aus der Zelle (Pelicano et al., 2006; Draoui und Feron, 2011).

Die starke Laktatbildung als ein Charakteristikum der hyperaktiven Glykolyse wurde von Otto Warburg bereits 1923 beschrieben (Warburg und Minami, 1923). An Gewebeschnitten solider Tumoren bemerkte er eine starke Laktatbildung in Gegenwart von Sauerstoff. Dies war dahingehend überraschend, da bekannt war, dass in normalen Körperzellen die Bildung von Laktat (Milchsäuregärung) durch Sauerstoff gehemmt wird, der so genannte Pasteur-Effekt (Pasteur, 1861). In Tumorzellen dagegen verhindert Sauerstoff nicht die Bildung von Laktat. Die in Krebszellen gesteigerte Glukoseaufnahme wird klinisch bei der Positronen-Emissions-Tomographie genutzt. Dazu erhält der Patient das radioaktiv-markierte Glukoseanalogon <sup>18</sup>Fluor-2-Deoxyglukose, das sich bevorzugt im Tumorgewebe anreichert (Mankoff et al., 2007). Maßgeblich für eine hyperaktive Glykolyse, die nach Einschätzung des amerikanischen Krebsforschers Craig B. Thompson ca. 60-90 % der Tumoren aufweisen (Garber, 2006), ist die Funktion der Laktatdehydrogenase (Allison et al., 2014).

---

<sup>8)</sup> Bei den in einer Zelle vorherrschenden physiologischen Bedingungen liegt Milchsäure größtenteils in Form ihres Anions, dem Laktat vor.





**Abbildung 1.1: Der Energiestoffwechsel einer normalen und einer Krebszelle.** In normalen Zellen wird Pyruvat mehrheitlich in den Mitochondrien (Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung) zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O oxidiert. In Krebszellen dagegen wird der Großteil an Pyruvat im Zytosol zu Laktat reduziert. Die im Wesentlichen auf die Glykolyse (hyperaktive Glykolyse) beschränkte ATP-Produktion stellt dabei keinen Nachteil für die Krebszelle dar (Vander Heiden et al., 2009; Locasale und Cantley, 2011). LDH: Laktatdehydrogenase.

### 1.3 Bedeutung der Laktatdehydrogenase für den Stoffwechsel maligner Zellen

Die Laktatdehydrogenase stellt ein Tetramer dar, das in fünf Isoformen (LDH1-5) vorkommen kann (Tabelle 1.1) und aus den beiden Proteinuntereinheiten »H« (codiert durch das Gen LDH-B) und »M« (codiert durch das Gen LDH-A) gebildet wird. Beide Untereinheiten weisen unterschiedliche Affinitäten zu Pyruvat bzw. Laktat auf, was auch die Biochemie der fünf Isoformen maßgeblich beeinflusst. Die M-Untereinheit

weist eine stärkere Affinität zu Pyruvat auf als die H-Untereinheit, weshalb LDH5, bestehend aus vier M-Untereinheiten, auch bevorzugt die Reduktion von Pyruvat zu Laktat katalysiert. Dagegen oxidiert LDH1 mit seinen vier H-Untereinheiten bevorzugt Laktat zu Pyruvat, das damit dem oxidativen Stoffwechsel wieder zur Verfügung steht. Auch die Gewebeverteilung ist unterschiedlich: Während die Proteinuntereinheit H verstärkt in Herzmuskelzellen (H) exprimiert wird, dominiert die Proteinuntereinheit M in Skelettmuskelzellen (M), in Geweben mit hohem Glukoseverbrauch und in einer Vielzahl von Tumoren wie auch dem kolorektalen Karzinom (Porporato et al., 2011; Miao et al., 2013; Doherty und Cleveland, 2013).

**Tabelle 1.1. Die Isoformen der Laktatdehydrogenase.** In der Regel wird für Gen und Protein die gleiche Bezeichnung verwendet, was zu Missverständnissen führen kann. Deshalb werden in dieser Arbeit die unterschiedlichen Bezeichnungen für Gen und Protein bevorzugt, die so auch in der Literatur zu finden sind. Die Länge der Reaktionspfeile soll die bevorzugte Reaktion der Isoform verdeutlichen. Siehe auch Text. (L) = Laktat; (P) = Pyruvat.

Gen	LDH-B			LDH-A	
Protein	Untereinheit H			Untereinheit M	
Isoenzym	LDH1 HHHH	LDH2 HHHM	LDH3 HHMM	LDH4 HMMM	LDH5 MMMM
Bevorzugte Reaktion	P $\xleftarrow{\hspace{1cm}}$ L $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$		P $\xleftarrow{\hspace{1cm}}$ L $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$		P $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ L $\xleftarrow{\hspace{1cm}}$

Die verstärkte Genaktivität von LDH-A in Tumoren lässt ein Potential dieser Zielstruktur für eine gezielte Hemmung von Krebswachstum erwarten (Grancji et al., 2013a). So führte die Inhibition der Expression von LDH-A zu einer verminderten Tumorzellproliferation und einer Abnahme der ATP-Bildung bei Normoxie um 16 % und Hypoxie um 51 %; eine ektopische Expression von LDH-A dagegen führte wieder zur ursprünglichen Zellproliferation (Granchi et al., 2013). Zusätzlich beeinflusst eine Inhibition von LDH-A auch Metastasierung und Invasivität von Tumoren (Miao et al., 2013) mit Auswirkungen auf das mediane Überleben. Mäuse, die Tumorzellen mit einem LDH-Knockdown erhielten, überlebten 104 Tage länger als Mäuse, deren Tumorzellen eine funktionelle LDH aufwiesen (Fantin et al., 2006). Die Aktivität der Laktatdehydrogenase steht auch in Zusammenhang mit der Ausbildung von Chemoresistenzen. So konnte durch Inhibition von LDH-A die Resistenz maligner Zellen gegenüber Taxol aufgehoben werden

(Zhou et al., 2010). Auch wurde durch Hemmung von LDH-A das Ansprechen Herceptin-resistenter Tumorzellen auf den Antikörper Trastuzumab<sup>9)</sup> verstärkt (Zhao et al., 2011).

Im Gegensatz zu malignen Zellen wird bei nicht-transformierten epithelialen Zellen Zellteilung und Zellfunktion durch Hemmung der Laktatdehydrogenase unbeeinflusst (Fantin et al., 2006). Dies gilt für den »Normalzustand« Normoxie, hier decken sie ihren Energiedarf hauptsächlich mit oxidativer Phosphorylierung, nicht aber für Hypoxie, wo auch diese Zellen auf Glykolyse »umschalten«. Für gesunde Gewebe stellt Hypoxie aber nicht den »Normalzustand« dar. Personen mit einem genetisch bedingten Mangel an der M-Untereinheit zeigen keine bedrohlichen Ausfallerscheinungen (Kanno et al., 1988). Damit scheint die Abhängigkeit von der Aktivität der Laktatdehydrogenase charakteristisch für maligne Zellen zu sein (Miao et al., 2013) und ihre Hemmung folglich mit geringen Nebenwirkungen verbunden zu sein.

#### **1.4 Konzept einer kombinierten Inhibition von MRP1 und LDH**

Das *Multidrug resistance*-Protein 1 (MRP1) gehört zur Familie der ABC-Transporter. Hierbei handelt es sich um Transmembranproteine, die nach Bindung von ATP den Export von Substraten gegen einen Konzentrationsgradienten durchführen (Cole, 2014a). Nachdem für einige Mitglieder der ABC-Transporter-Familie eine Beteiligung an der Ausbildung von Chemoresistenz nachgewiesen werden konnte, wurde versucht, ihre Aktivität zu hemmen und dadurch das Ansprechen der Zelle auf Chemotherapeutika zu verstärken (Cui et al., 2015). Eine Überexpression von MRP1, die sich als negativer prognostischer Faktor für das Überleben erwiesen hat (Munoz et al., 2007), wurde in zahlreichen Tumoren nachgewiesen wie u. a. Lungen-, Kolon- und Mammakarzinom (Hipfner et al., 1999).

---

<sup>9)</sup> Der Antikörper Trastuzumab (Handelsname Herceptin) bindet an den EGF-Rezeptor HER2/neu.

Auch die Überexpression der M-Untereinheit der Laktatdehydrogenase (Tabelle 1.1) in verschiedenen Neoplasien (Balinsky et al., 1983) ist ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Koukourakis et al., 2003 u. 2011).

Ein starker Selektionsdruck auf Zellen eines soliden Tumors geht sicherlich von den wechselnden Bedingungen bei der Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff aus (Anderson et al., 2006; Ruan et al., 2009). So beeinflusst der durch Hypoxie stabilisierte Hypoxie-induzierte Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) u. a. die Aktivität von LDH und MRP1 und trägt zur Ausbildung von Chemoresistenz bei (Milane et al., 2011; Lv et al., 2015). Für die vorliegende Arbeit von größerer Bedeutung ist die Beteiligung von MRP1 an zahlreichen Zellfunktionen wie u. a. Metabolismus, Differenzierung, Proliferation und Kommunikation (Cole et al., 2014). So sollte bereits die Inhibition von MRP1 antiproliferative Effekte aufweisen und dies unabhängig von der Situation einer Chemoresistenz.

Die Tatsache, dass MRP1 und LDH von zahlreichen Tumoren überexprimiert werden, dass sie an der Ausbildung von Chemoresistenz beteiligt sind (Kapitel 1.3 und oben), dass sie auch in Hypoxie exprimiert werden - zudem in großen Teilen solider Tumoren hypoxische bzw. anoxische Bedingungen vorherrschen (Vaupel und Mayer, 2005) - und dass das für die Funktion von MRP1 notwendige ATP hauptsächlich in der hyperaktiven Glykolyse gebildet wird und damit von der Aktivität der Laktatdehydrogenase abhängt, lässt eine kombinierte Inhibition beider Zielstrukturen als geeignete Strategie erscheinen, um die Proliferation maligner Zellen auch bei hypoxischen Bedingungen zu hemmen.

### **1.5 Erwartete Ziele**

(I) Der antiproliferative Effekt einer Hemmung der Laktatdehydrogenase (LDH) durch Natriumoxamat und Galloflavin sowie von MRP1 durch Reversan soll gezeigt werden. Die Untersuchungen hierzu sollen an den fünf kolorektalen Karzinomzelllinien Colo741, HCT116, HT29, LS174T und SW620 durchgeführt werden. Die Überexpression von LDH

und MRP1 im kolorektalen Karzinom ist gezeigt (Koukourakis et al., 2006; Hlavata et al., 2012).

(II) Die beiden LDH-Inhibitoren Natriumoxamat und Galloflavin sollen auf ihren antiproliferativen Effekt verglichen werden. Natriumoxamat stellt ein Pyruvatanalogon dar, das kompetitiv LDH hemmt (Granchi et al., 2013b). Galloflavin wirkt dagegen spezifischer und wird von der Zelle besser aufgenommen (Valvona et al., 2015).

(III) Der antiproliferative Effekt des MRP1-Inhibitors Reversan für kolorektale Karzinomzellen soll gezeigt werden. Reversan ist ein neuer selektiver MRP1-Inhibitor (Burkhard et al., 2009), der die chemotherapeutische Wirkung von Etoposid, Vinkristin und Doxorubicin verstärkt (Tivnan et al., 2015). Durch die Beteiligung von MRP1 an zahlreichen Zellfunktionen (s. auch Kapitel 1.4) sollte für Reversan ein antiproliferativer Effekt auch unabhängig von der Situation einer Chemoresistenz nachzuweisen sein.

(IV) Unterschiedliche Kombinationen aus Reversan, Natriumoxamat und Galloflavin, auch kombiniert mit 5-FU, sollen untersucht werden. Hierfür liegen bisher keine Daten vor.

(V) Der antiproliferative Effekt unterschiedlicher Kombinationen der drei Inhibitoren soll auch für tumorphysiologische Sauerstoffkonzentrationen untersucht werden. Solide Tumoren weisen große Bereiche auf, in denen hypoxische Bedingungen vorherrschen (Vaupel und Mayer, 2005); zudem verringert Tumorphypoxie die Wirksamkeit einer Vielzahl konventioneller Chemotherapeutika (Teicher et al., 1990; Strese et al., 2013). Messungen zur Oxygenierung von Tumorgeweben haben ergeben, dass in hypoxischen Bereichen ein Sauerstoffanteil von 1 % und in oxygenierten Bereichen von 5 % vorherrscht (Kallinowski et al., 1990). Die Expression von MRP1 und LDH als HIF-Targetgene wird in Hypoxie induziert (Milane et al., 2011; Lv et al., 2015) und eine Überexpression von HIF-1 $\alpha$  konnte auch für das kolorektale Karzinom gezeigt werden (Ioannou et al., 2015).

## 2 Fragen

---

1. Weisen die beiden LDH-Inhibitoren Natriumoxamat und Galloflavin und der MRP1-Inhibitor Reversan einen antiproliferativen Effekt bei kolorektalen Karzinomzellen auf? Ist dieser auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % nachzuweisen?
2. Führen unterschiedliche Kombinationen der drei Inhibitoren Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan zu einem stärkeren antiproliferativen Effekt? Ist dieser auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % nachzuweisen?
3. Ist der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan bzw. ihre Kombination mit dem von 5-FU vergleichbar? Ist dieser auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % nachzuweisen?

### 3 Material und Methoden

---

#### 3.1 Zelllinien

Kolorektale Karzinomzelllinien und humane Fibroblasten wurden von kommerziellen Anbietern bezogen (Tabelle 3.1). Die Zellen wuchsen adhärent und waren frei von Mycoplasmen.

**Tabelle 3.1:** Die in dieser Arbeit untersuchten humanen Karzinomzelllinien des Kolons (Colo741, HCT116, HT29, SW620) bzw. des Rektums (LS174T).

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle	Referenz
Colo741	Nierenbeckenmetastase einer 69-Jährigen	Sigma Aldrich	ECACC <sup>1)</sup>
HCT116	Primärtumor eines erwachsenen Mannes	DSMZ	Brattain et al., 1981
HT29	Primärtumor einer 44-Jährigen	DSMZ	Fogh et al., 1975
LS174T	Primärtumor einer 58-Jährigen	CLS	Tom BH et al., 1976
SW620	Lymphknotenmetastase eines 51-Jährigen	Sigma Aldrich	ECACC <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> The European Collection of Authenticated Cell Cultures.

#### 3.2 Zellkulturmedium und Pufferlösung

Zellen der Karzinomzelllinien (Tabelle 3.1) wurden in der Erhaltungs- und Experimentalkultur in RPMI 1640 in „Dutch Modification“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit folgenden Zusätzen (Endkonzentration jeweils in Klammern) inkubiert: Penicillin G (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/l), Natriumpyruvat (1 mmol/l), Glukose (11 mmol/l), Glutamin (2 mmol/l), 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (alle Zusätze von Invitrogen GmbH, Karlsruhe) sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Cell Concepts GmbH, Umkirch).

Humane Fibroblasten (NHDF; PromoCell, Heidelberg) wurden in der Erhaltungskultur in „Fibroblast Growth“-Medium 2 (PromoCell, Heidelberg) kultiviert. Das Medium enthielt folgende Zusätze (in Klammern jeweils die Endkonzentration): fetales Kälber-

serum (2 %), rekombinanter humaner Fibroblastenwachstumsfaktor (1 ng/ml), insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (5 µg/ml).

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,2) wurde als steriles 10-fach Konzentrat (ohne Calcium- und Magnesium) vor Verwendung 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Die Endkonzentration der physiologischen Salzlösung betrug: Natriumchlorid (155 mmol/l), Natriumdihydrogenphosphat (7,2 mmol/l) sowie Kaliumhydrogenphosphat (1,5 mmol/l).

### 3.3 Inhibitoren

Die Stammlösungen der drei Inhibitoren (Tabelle 3.3) wurden wie folgt angesetzt:

**Galloflavin:** 10 mg Galloflavin wurden in 6 ml DMSO gelöst. Hierzu wurde DMSO in kleinen Portionen von 0,5-1 ml zugegeben und die Lösung mehrfach resuspendiert.

**Natriumoxamat:** 0,55 g Natriumoxamat wurden zusammen mit 5 ml RPMI 1640 und 50 µl DMSO gemischt (Vortex-Mixer) und anschließend 4,95 ml RPMI 1640 zugegeben und für 2 Minuten im Ultraschallbad gemischt.

**Reversan:** 10 mg Reversan wurden mit 4,5 ml DMSO gelöst (Zugabe von DMSO in kleinen Portionen); anschließend wurde die Lösung für 2 Minuten im Ultraschallbad gemischt.

**Tabelle 3.3: Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren.**

Inhibitor	Zielstruktur	Bezugsquelle	Stammlösung
Galloflavin	M & H-Untereinheit	Tocris	5 mmol/l
Natriumoxamat	M-Untereinheit	Sigma Aldrich	500 mmol/l
Reversan	MRP1	Tocris	5 mmol/l
5-FU <sup>1)</sup>	DNA/ RNA	Apotheke UKW	10 <sup>-1</sup> mol/l

<sup>1)</sup> Die Stamm-Lsg. wurde von der Apotheke des Universitätsklinikums angesetzt.

**Referenzen:** 5-FU (Heidelberger et al., 1957), Natriumoxamat (Novoa et al., 1958); Galloflavin (Manerba et al., 2012); Reversan (Burkhart et al., 2009).



### 3.4 Zellkultur und Zellpassage

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mittlerer Größe (Greiner Bio-One GmbH) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> (in wasserdampfgesättigter Atmosphäre) in einem Inkubator (NU-5500, NuAire, USA) bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt. Die maximale Anzahl an Zellpassagen betrug 15.

Für die Zellpassage wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml Trypsin / EDTA (0,05 % / 0,22 % in PBS) für 5-7 Minuten inkubiert und mit 40 ml PBS zentrifugiert (250 xg für 5 Minuten). Daraufhin wurden die Zellen in 25 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) bei 250 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Medium (ca. 5 ml) resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblaulösung (0,04 % von Sigma Aldrich, Taufkirchen) gemischt, hiervon 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) pipettiert und die Zellen der vier Großquadrate ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{(\sum \text{Zellen der 4 Großquadrate}) \times (\text{Volumen Zellsuspension}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor}}{4}$$

Die konstante Größe in dieser Formel ist der Kammerfaktor mit 10<sup>4</sup> zur Umrechnung auf ein Volumen von 1 ml (Kammervolumen: 0,1 µL).

### 3.5 Sauerstoffkonzentrationen

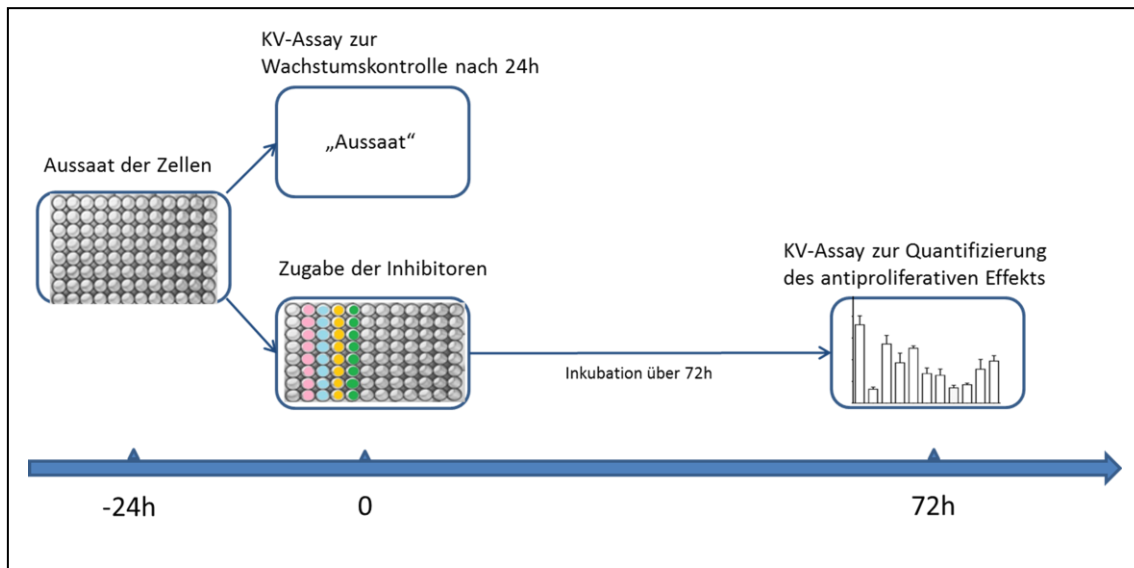
Der antiproliferative Effekt der Inhibitoren wurde bei den Sauerstoffkonzentrationen 21 % und den beiden physiologisch relevanteren Sauerstoffkonzentrationen 5 % und 1 % untersucht (Coy Laboratory Products, Michigan/USA, Vertrieb über Toepffer Laborsysteme Göppingen). Die unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen wurden durch Zumischen von Stickstoff erreicht. Die Kulturen wurden ebenfalls bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

### **3.6 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen (Kristallviolett-Assay)**

Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay photometrisch bestimmt. Der Assay beruht darauf, dass Kristallviolett (Sigma-Aldrich) an die DNA fixierter Zellen bindet und die Anzahl gebundener Farbstoffmoleküle mit der Anzahl vitaler Zellen korreliert. Nicht-adhärenente Zellen werden während der Färbeprozedur mit dem Überstand entfernt. Die optische Dichte (OD) der mit Essigsäure in Lösung gebrachten Farbstofflösung wird bei 570 nm photometrisch im ELISA Reader gemessen.

Die Zellen (Tabelle 3.1) wurden in Zellkulturschalen mit 96 Vertiefungen ausgesät (5000 Zellen pro Vertiefung in 200 µl Medium). Am nächsten Tag (nach ca. 16 Stunden in Kultur) wurde die Aussaat an einem Teil der Zellen mit Kristallviolett bestimmt. Zum anderen Teil der Zellen wurden mit frischem Medium (200 µl pro Vertiefung nach Mediumwechsel) die jeweiligen Inhibitoren in der entsprechenden Konzentration (Kapitel 3.7) zugegeben. Jeder Inhibitor wurde in 3-4 unabhängigen Experimenten (= biologische Replikate) und pro Experiment jede Konzentrationsstufe in sechs Vertiefungen (= technische Replikate) untersucht.

Der Anteil vitaler Zellen wurde nach einer Inkubation von 72 Stunden bestimmt. Der Zellkulturüberstand wurde verworfen und die Zellen mit jeweils 100 µl Methanol pro Vertiefung für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurde das Methanol gegen 100 µl einer 0,05 %igen Kristallviolett-Lösung (bestehend aus ¼ Methanol und ¾ PBS) ausgetauscht, die für zehn Minuten gefärbt, überschüssige Farbstofflösung mit Aqua dest. entfernt und die Zellen für 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet. Mit 200 µl 10 %iger Essigsäure wurde der Farbstoff wieder in Lösung gebracht (30 Minuten auf dem Wipp-Schüttler) und anschließend die optische Dichte bei 570 nm photometrisch bestimmt.



**Abbildung 3.1: Experimentelles Design zur Quantifizierung des antiproliferativen Effekts der Inhibitoren.**

### 3.7 Bestimmung der halbmaximalen Inhibitor-Konzentration (IC<sub>50</sub>)

Die IC<sub>50</sub> der vier Inhibitoren (Tabelle 3.3) wurden aus folgenden Verdünnungsreihen berechnet: Galloflavin (10<sup>-4</sup> bis 10<sup>-9</sup> mol/l) Natriumoxamat (10<sup>-4</sup> bis 10<sup>-9</sup> mol/l), Reversan (10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-9</sup> mol/l) und 5-FU (10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-9</sup> mol/l). Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde der Anteil vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Mit dem Biostatistikprogramm GraphPad Prism 6.0 wurde der Anteil vitaler Zellen von jeder Konzentrationsstufe mit dem Anteil vitaler Zellen der unbehandelten Kontrolle prozentual verrechnet und aus dem sich ergebenden sigmoiden Kurvenverlauf (Konzentration versus Anteil vitaler Zellen) der IC<sub>50</sub> bestimmt.

### 3.8 Westernblot-Analysen

Die Westernblot- (bzw. Immunoblot-) Technik ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen. Hierzu wird das Proteingemisch aus Zelllysaten mit der Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Größe und Ladung aufgetrennt, anschließend die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen („geblottet“) und mit spezifischen Antikörpern die gewünschten Proteine nachgewiesen.

Eine Million Zellen wurden mit RIPA-Puffer (Thermo Fisher, Pierce), der zusätzlich noch Protease- und Phosphatase-Inhibitoren enthielt, lysiert und das Lysat anschließend zentrifugiert (10 Minuten bei 10 000 g und 4°C). Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford Assay bestimmt und jeweils 30 µg Protein einer Probe wurden pro Geltasche in ein 9 %iges Agarosegel (Amresco) 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, 350 mA, 30 Minuten) übertragen. Anschließend wurde der Transfer durch Färbung mit Ponceau-Rot (Sigma) überprüft. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3.2 beschrieben. Die Reaktion wurde mit dem Chemilumineszenz-Reagenz ECL (GE Healthcare, Amersham) gestartet. Der Proteinstandard von Fermentas, Life Science wurde zur Größenbestimmung verwendet.

**Tabelle 3.2: Die zum Nachweis von LDH (M- und H- Untereinheit) und MRP1 verwendeten Antikörper.**

Spezifität	Isotyp	MG	Verdünnung	Bezugsquelle
M-Untereinheit	IgG	36kDa	1:20 000	abcam (ab47010)
H-Untereinheit	IgG	37kDa	1:40 000	abcam (ab75167)
MRP1	IgG	170kDa	1:20	Enzo Life Sciences

### 3.9 Auswertung und Statistik

Für die Darstellung der Einzelwerte wurden Mittelwert  $\pm$ Standardabweichung aus 2-3 unabhängigen Experimenten bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.), SPSS Statistics 23 (IBM) und Excel 2010 (Microsoft). Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde bei 2 unabhängigen Versuchsgruppen der t-Test und bei mehr als 2 unabhängigen Versuchsgruppen ein einfaktorieller ANOVA und mit anschließender posthoc-Analyse nach Tukey angewandt. Unterschiede von  $p < 0,05$  wurden als signifikant gewertet. Die Darstellung der Graphen erfolgte mit GraphPad Prism 6.0.

## 4 Ergebnisse

---

In der vorliegenden Arbeit wurde der antiproliferative Effekt der beiden LDH-Inhibitoren Natriumoxamat und Galloflavin sowie des MRP1-Inhibitors Reversan einzeln und in Kombination an fünf kolorektalen Karzinomzelllinien bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen *in vitro* untersucht. Zusätzlich wurde der antiproliferative Effekt der drei Inhibitoren mit dem antiproliferativen Effekt von 5-FU in einer Konzentration von 5  $\mu\text{mol/l}$  verglichen.

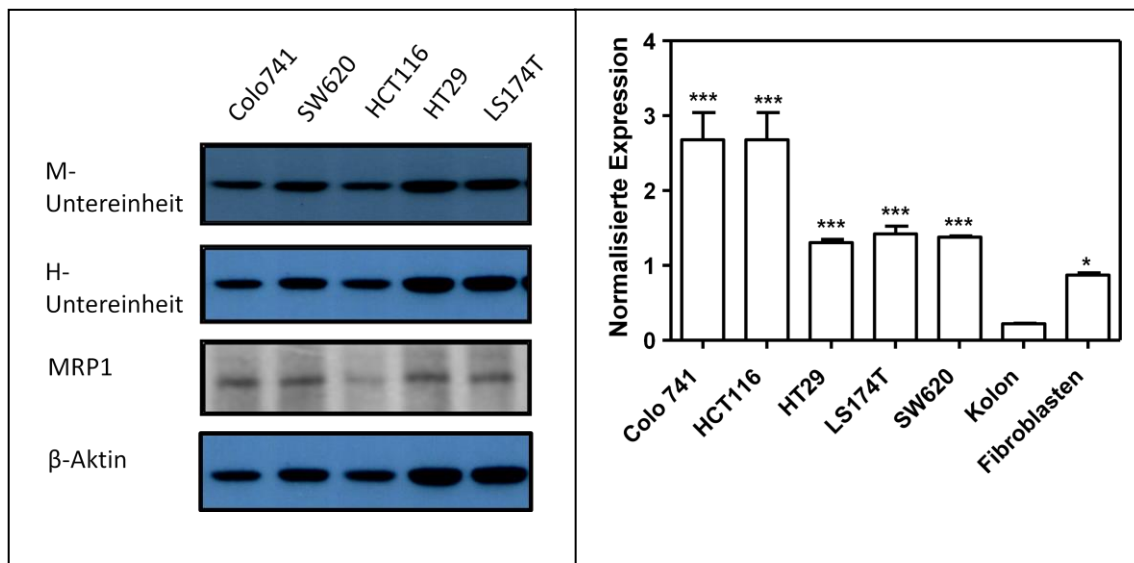
### 4.1 Charakterisierung der fünf kolorektalen Karzinomzelllinien

Als erstes wurde die Zellproliferation der fünf kolorektalen Tumorzelllinien, also die Zunahme an vitalen Zellen, untersucht, um Unterschiede in der Geschwindigkeit der Zellteilung zu bestimmen. Mit einer Verdopplungszeit von 0,8 bis 0,9 Tagen (zw. 19,2 und 21,6 Stunden) wuchsen HT29 und HCT116 am schnellsten und SW620 mit einer Verdopplungszeit von 1,4 Tagen (33,6 Stunden) am langsamsten. Mit abnehmender Sauerstoffkonzentration nahmen die Verdopplungszeiten bei allen Zelllinien zu (Tabelle 4.1). Die für die fünf Zelllinien gebildeten Mittelwerte der Verdopplungszeiten bestätigen die Erwartung, dass die Verdopplungszeiten mit der Sauerstoffkonzentration negativ korreliert ist, d.h. mit abnehmender Sauerstoffkonzentration verlängert sich die Verdopplungszeit.

**Tabelle 4.1: Bestimmung der Verdopplungszeiten.** Die kolorektalen Karzinomzellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS kultiviert. Die Verdopplungszeit (angegeben in Tagen  $\pm$  Standardabweichung für drei unabhängige Versuche) wurde für eine Inkubationszeit von 72 Stunden aus den Kristallviolett-Daten berechnet.

	Colo741	HCT116	HT29	LS174T	SW620	Mittelwert
21 % Sauerstoff	1,0 [ $\pm 0,04$ ]	0,9 [ $\pm 0,04$ ]	0,8 [ $\pm 0,06$ ]	1,0 [ $\pm 0$ ]	1,4 [ $\pm 0,12$ ]	1,0 [ $\pm 0,2$ ]
5 % Sauerstoff	1,2 [ $\pm 0,12$ ]	1,3 [ $\pm 0,13$ ]	1,9 [ $\pm 0,15$ ]	1,5 [ $\pm 0,11$ ]	1,5 [ $\pm 0,12$ ]	1,5 [ $\pm 0,3$ ]
1 % Sauerstoff	1,9 [ $\pm 0,19$ ]	2,1 [ $\pm 0,13$ ]	2,7 [ $\pm 0,17$ ]	1,9 [ $\pm 0,14$ ]	2,5 [ $\pm 0,21$ ]	2,2 [ $\pm 0,4$ ]

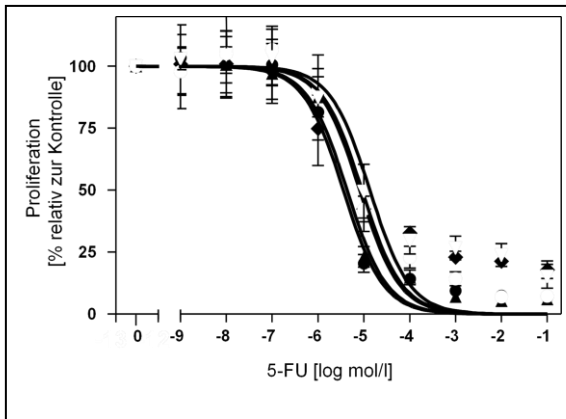
Um den antiproliferativen Effekt der Inhibitoren auch tatsächlich auf die Inhibition von LDH und MRP1 zurückführen zu können, wurde die Expression der beiden Proteinuntereinheiten von LDH »M« (codiert durch Gen LDH-A) und »H« (codiert durch LDH-B), und MRP1 in diesen Zellen nachgewiesen (Abb. 4.1). Der Nachweis beider Untereinheiten lässt keine Rückschlüsse darauf, welche der fünf Isoformen der LDH (Tabelle 1.1) in den kolorektalen Karzinomzellen dominiert.



**Abbildung 4.1: Nachweis der Expression der beiden LDH-Proteinuntereinheiten »M« und »H« und von MRP1 bei 21 % Sauerstoff.** Die Proteine wurden im Western blot (A) und die MRP1-Expression noch zusätzlich auf mRNA-Ebene (B) für die fünf kolorektalen Karzinomzelllinien nachgewiesen. Das Molekulargewicht der Proteine ist wie folgt: 36 kDa für die M-Untereinheit, 37 kDa für die H-Untereinheit und 171 kDa für MRP1. Die Ladekontrolle war  $\beta$ -Aktin. Die fünf kolorektalen Karzinomzelllinien zeigen eine signifikante Überexpression von MRP1 im Vergleich zu Kolon-Normalgewebe (Kolon; cDNA von Ambion, Thermo Fisher Scientific). Für nicht-maligne, dermale Fibroblasten war ebenfalls eine Expression von MRP1 nachzuweisen. \*\*\* $p=0.001$  und \* $p=0.05$  im Vergleich zu Kolon-Normalgewebe.

#### 4.2 Der antiproliferative Effekt von 5-FU

Zur Bestimmung des antiproliferativen Effekts von 5-FU wurde ein Konzentrationsbereich von  $10^{-1}$  bis  $10^{-9}$  mol/l untersucht (Abb. 4.2). Eine grundlegende mathematische Größe, den antiproliferativen Effekt einer Substanz quantitativ anzugeben, stellt die halbmaximale inhibitorische Konzentration oder  $IC_{50}$  dar. Dieser Wert, der aus dem sigmoiden Kurvenverlauf berechnet wird (Abb. 4.2), gibt die Konzentration für eine Substanz an, bei der die Hälfte der Zellen in ihrer Proliferation beeinflusst werden.



**Abbildung 4.2: Der antiproliferative Effekt von 5-FU in der graphischen Darstellung.** Zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde jede Zelllinie mit unterschiedlichen Konzentrationen an 5-FU für 72 Stunden bei 21 % Sauerstoff inkubiert und anschließend der Anteil vitaler Zellen jeder Konzentrationsstufe mit dem Anteil vitaler Zellen der unbehandelten Kontrolle prozentual verrechnet. Der sigmoide Kurvenverlauf und die IC<sub>50</sub> Werte (Tabelle 4.2) wurden mit dem Biostatistikprogramm GraphPad Prism berechnet.

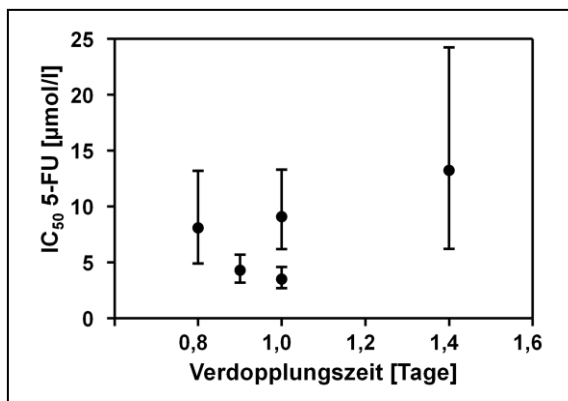
Aus dem sigmoiden Kurvenverlauf (Abb. 4.2) berechnete das Biostatistikprogramm GraphPad Prism den IC<sub>50</sub> Wert für jede der fünf kolorektalen Karzinomzelllinien (Tabelle 4.2).

Der Vergleich der IC<sub>50</sub> Werte verdeutlicht, dass zum Erreichen eines 50-prozentigen inhibitorischen Effektes die 3 bis 4fach höhere Konzentration an 5-FU für SW620 nötig ist als für Colo741 oder HCT116. Für nicht maligne humane dermale Fibroblasten wurde ein IC<sub>50</sub> von 49,3 µmol/l ermittelt.

**Tabelle 4.2: Der antiproliferative Effekt von 5-FU bei kolorektalen Karzinomzelllinien und dermalen Fibroblasten.** Der IC<sub>50</sub> von 5-FU ist als Mittelwert mit dem entsprechenden 95 %-Konfidenzintervall [in Klammern] in µmol/l für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. Der mittlere IC<sub>50</sub> der fünf kolorektalen Zelllinien liegt bei 7,8 ± 4,2 µmol/l und der drei Zelllinien Colo741, HCT116 und HT29 bei 5,0 ± 2,6 µmol/l. Für die weiteren Untersuchungen mit 5-FU wurde die Konzentration von 5,0 µmol/l gewählt. Dies stellt sicher, dass eine für alle fünf kolorektalen Karzinomzelllinien wirksame Konzentration eingesetzt wird, die nicht auf einer »Überkonzentration« an 5-FU basiert und damit physiologisch relevante Ergebnisse zu erwarten sind.

Colo741	HCT116	HT29	LS174T	SW620	Fibroblasten
3,5 [2,7-4,6]	4,3 [3,2-5,7]	8,1 [4,9-3,2]	9,1 [6,2-23]	14 [7,0-25]	49,3 [13,6-179]

Einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf 5-FU und der Zellteilungsgeschwindigkeit kolorektaler Zellen lässt sich aus Abb. 4.3 ableiten; zumindest wird deutlich, dass SW620 sich in beiden Parametern deutlich von den vier anderen kolorektalen Karzinomzelllinien unterscheidet.



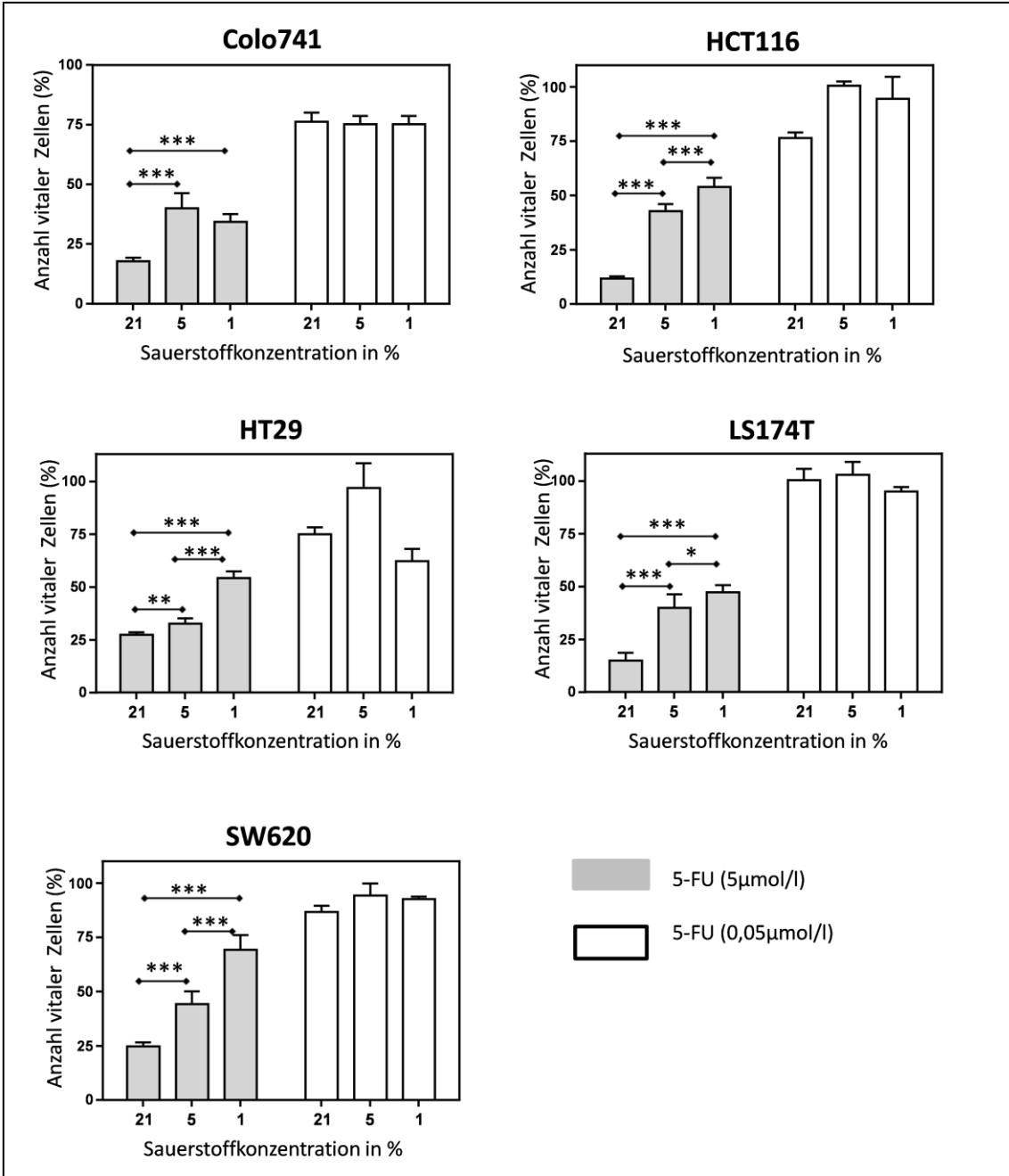
**Abbildung 4.3: Der antiproliferative Effekt von 5-FU (IC<sub>50</sub>) in Abhängigkeit von den Verdopplungszeiten.** Die Abb. basiert auf den Angaben aus Tabelle 4.1 und 4.2. SW620 weist eine Verdopplungszeit von 1,4 Tagen auf. Auch wenn die Stichprobengröße mit n=5 Karzinomzelllinien ungeeignet für eine Korrelationsanalyse ist, unterscheidet sich SW620 in Verdopplungszeit und Ansprechen auf 5-FU (IC<sub>50</sub>) deutlich von den anderen vier Zelllinien. Fibroblasten wiesen eine Verdopplungszeit von  $2,2 \pm 0,2$  Tagen auf (nicht gezeigt).

Da die Versorgung mit Sauerstoff die Zellproliferation (Tabelle 4.1) und möglicherweise auch das Ansprechen der Zellen auf antiproliferative Substanzen beeinflusst, wurde der antiproliferative Effekt von 5-FU bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen bestimmt. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen an 5-FU überprüft: 5 und 0,05 µmol/l.

5-FU in einer Konzentration von 5 µmol/l zeigte bei 21 % Sauerstoff einen starken antiproliferativen Effekt und der Anteil vitaler Zellen nahm bis zu 85 % ab (Abb. 4.4). Dass der antiproliferative Effekt von 5-FU bei dieser Konzentration auf Zytostase basiert, wird deutlich, wenn der Anteil vitaler Zellen auf die Aussaat berechnet wird. Dies ist in Abb. 4.5 exemplarisch für HCT116 Zellen gezeigt (für die anderen Zelllinien s. Abb. 10.1-10.4 im Anhang).

Die bei 21 % Sauerstoff durchgeführten Untersuchungen wurden für 5 % und 1 % Sauerstoff wiederholt. Dabei fiel auf, dass der antiproliferative Effekt von 5 µmol/l 5-FU bei beiden Sauerstoffkonzentrationen im Vergleich zu 21 % um das 2 bis 4fache abnahm (Abb. 4.4).

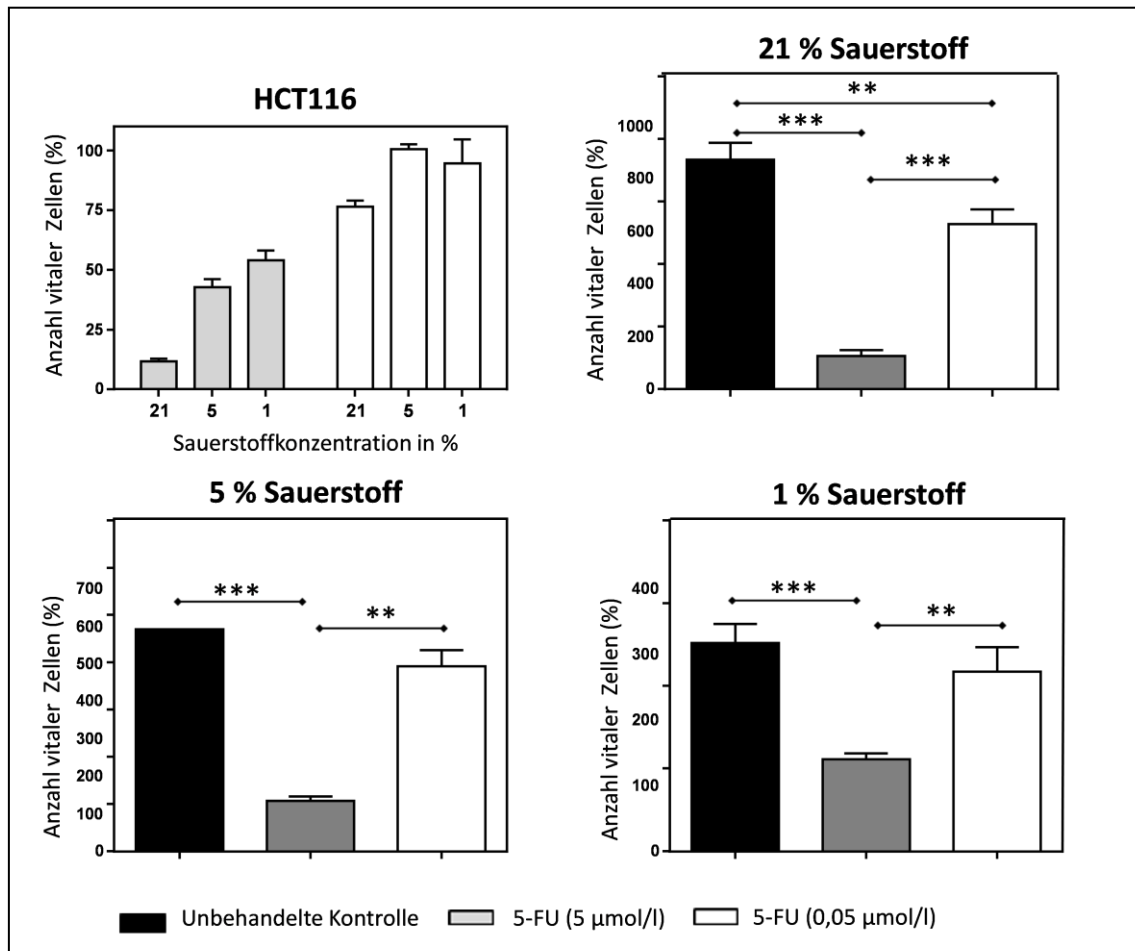




**Abbildung 4.4: Der antiproliferative Effekt von 5-FU bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen.** Die Zellen wurden mit 5 µmol/l (graue Balken) bzw. 0,05 µmol/l (weiße Balken) 5-FU für 72 Stunden inkubiert. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle (=100 %) berechnet. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

Im Gegensatz zu 5 µmol/l 5-FU war die 100fach geringere Konzentration an 5-FU nahezu ohne antiproliferativen Effekt und der Anteil vitaler Zellen war maximal um bis zu 25 % verringert (Abb. 4.4). Aufgrund des bereits geringen antiproliferativen Potentials von 0,05 µmol/l 5-FU war auch kein wesentlicher Einfluss der Sauerstoff-

konzentration auf den antiproliferativen Effekt dieser Konzentration an 5-FU nachzuweisen (Abb 4.4). Auch war diese Konzentration an 5-FU in Kombination mit den Inhibitoren unwirksam (Abb. 10.10).



**Abbildung 4.5: Der antiproliferative Effekt von 5 µmol/l 5-FU basiert auf Zytostase.** Dieser Zusammenhang ist exemplarisch für die Zelllinie HCT116 gezeigt (für die anderen Zelllinien s. Abb. 10.1-10.4 im Anhang). Im oberen linken Diagramm wurde die Anzahl vitaler Zellen auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. In den drei anderen Diagrammen wurde die Anzahl vitaler Zellen auf die Aussaat normalisiert. Aus dieser Darstellung wird ersichtlich, dass der antiproliferative Effekt von 5-FU auf Zytostase und nicht auf Zytotoxizität beruht. Hierzu wäre es notwendig, dass die Anzahl vitaler Zellen unter die Aussaat (=100 %) fällt. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*\* p≤0,01; \*\*\* p≤0,001.

### 4.3 Der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan einzeln und in Kombination mit 5-FU

Die IC<sub>50</sub> Werte für Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan wurden ebenfalls bestimmt (Tabelle 4.3). Die für die drei Inhibitoren getesteten Konzentrationsbereiche

sind in Material und Methoden angegeben (Kapitel 3.7). Für die fünf kolorektalen Karzinomzelllinien wurde ein mittlerer IC<sub>50</sub> Wert von 32,8 ± 5,6 mmol/l (± Standardabweichung) für Natriumoxamat berechnet. Dagegen zeigen die IC<sub>50</sub> Werte für den zweiten LDH-Inhibitor Galloflavin eine größere Schwankung zwischen den fünf Zelllinien: Drei Zelllinien wiesen einen IC<sub>50</sub> unter 100 µmol/l und zwei Zelllinien über 200 µmol/l auf (Tabelle 4.3).

Zusätzlich zu den beiden LDH-Inhibitoren wurde ebenfalls der antiproliferative Effekt von Reversan, einem Inhibitor von MRP1, untersucht. Der mittlere IC<sub>50</sub> Wert für vier der fünf Zelllinien lag bei 34 ± 5,0 µmol/l (±Standardabweichung), während der IC<sub>50</sub> Wert für SW620 mit 138 µmol/l um das 4fache erhöht war (Tabelle 4.3). Für die Reihung der kolorektalen Zelllinien nach ihrem IC<sub>50</sub> Werten (von niedrig nach hoch) ist auffällig, dass diese für Natriumoxamat und Galloflavin identisch ist. Dies gilt auch für Reversan mit der einzigen Ausnahme, dass LS174T Zellen nach dieser Reihung einen zu niedrigen IC<sub>50</sub> für Reversan aufweist (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3: Der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan bei 21 % Sauerstoff.** Die IC<sub>50</sub> Werte sind als Mittelwert mit dem 95 % Konfidenzintervall [in Klammern] für jeweils drei unabhängige Versuche angeben. Für die fünf kolorektalen Zelllinien liegt der mittlere IC<sub>50</sub> für Natriumoxamat bei 33 ± 4,7 mmol/l, für Galloflavin bei 120 ± 78 µmol/l (für Colo741, HCT116, HT29 bei 64 ± 13 µmol/l) und für Reversan bei 55 ± 47 µmol/l. Für die weiteren Untersuchungen wurden folgende Konzentrationen festgelegt: Natriumoxamat: 40 mmol/l, Galloflavin 60 µmol/l und Reversan 60 µmol/l. Dadurch, dass die festgelegten Konzentrationen sich im Bereich des jeweiligen mittleren IC<sub>50</sub> Wertes befinden, war mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen, dass bei den weiteren Experimenten unspezifische Effekte, verursacht durch zu hohe Konzentrationen an Inhibitoren, gemessen wurden.

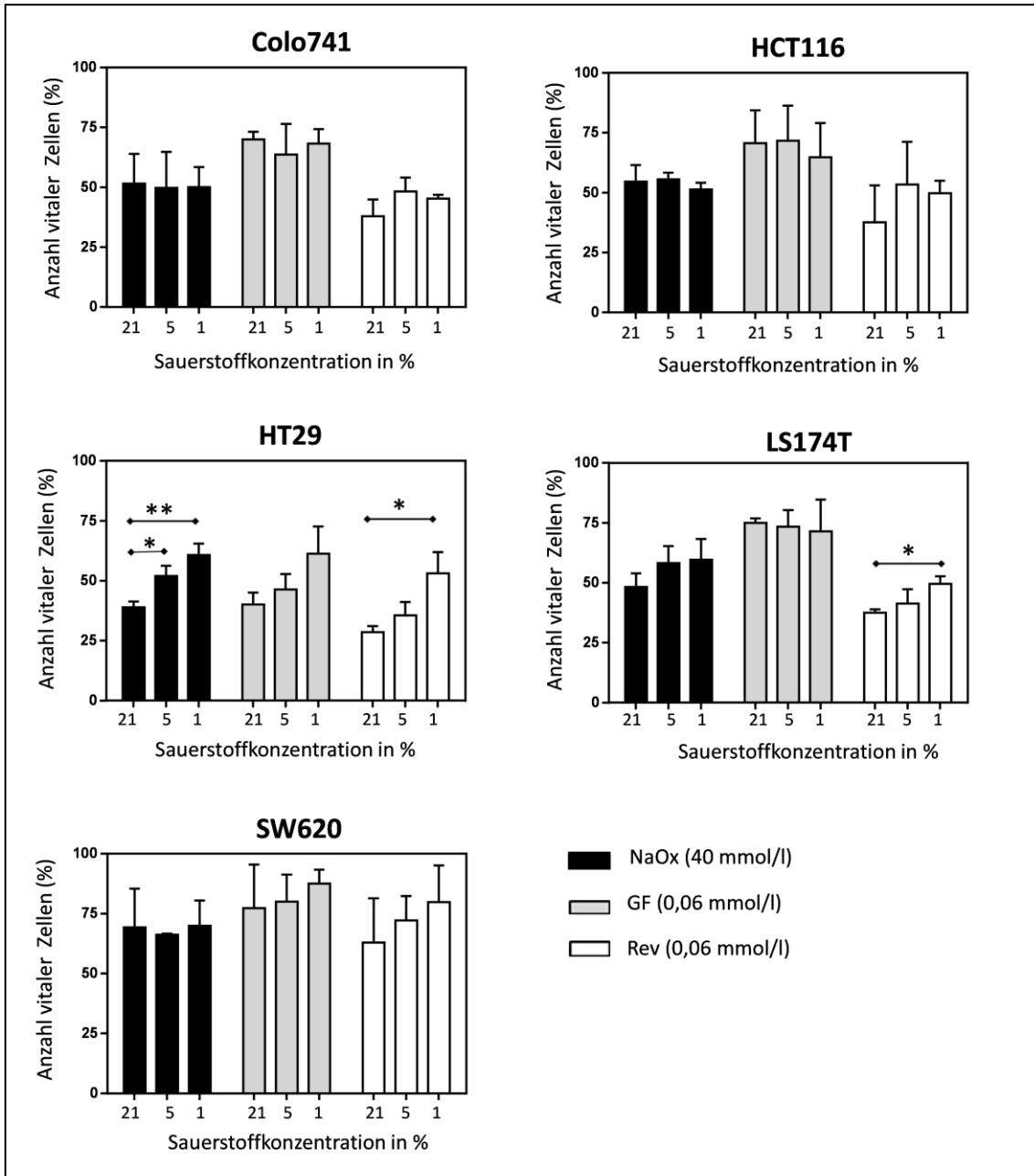
Zelllinie	Natriumoxamat [10 <sup>-3</sup> mol/l]	Galloflavin [10 <sup>-6</sup> mol/l]	Reversan [10 <sup>-6</sup> mol/l]
HCT116	27 [19-39]	50 [37-69]	32 [20-52]
Colo741	31 [22-43]	66 [50-88]	36 [22-58]
HT29	31 [25-37]	75 [44-127]	39 [25-61]
LS174T	36 [26-48]	200 [41-980]	28 [17-49]
SW620	39 [31-48]	210 [41-1.066]	138 [97-197]
Fibroblasten	70 [41-120]	155 [121-199]	157 [121-203]

Im Vergleich zu den anderen vier kolorektalen Karzinomzelllinien wiesen SW620 Zellen Tendenzen zu höheren  $IC_{50}$  Werten auf, insbesondere für Galloflavin und Reversan; d.h. ihr Ansprechen auf die beiden Inhibitoren war geringer (Tabelle 4.3) – ebenso wie für 5-FU (Tabelle 4.2). Der antiproliferative Effekt der drei Inhibitoren war auch bei nicht-malignen Fibroblasten geringer.

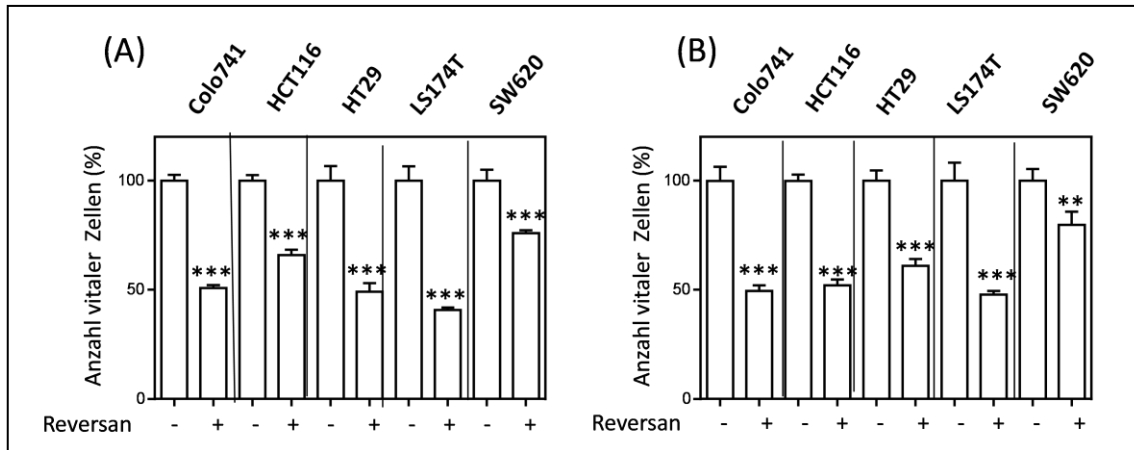
Die für die weiteren Experimente eingesetzten Konzentrationen orientierten sich an der mittleren  $IC_{50}$  Konzentration (Tabelle 4.3): Natriumoxamat: 40 mmol/l; Galloflavin: 60  $\mu$ mol/l und Reversan: 60  $\mu$ mol/l. Für die beiden LDH-Inhibitoren wurde ein antiproliferativer Effekt für kolorektale Karzinomzellen bei 21 % Sauerstoff nachgewiesen (Abb. 4.6). Auch für Reversan wurde ein antiproliferativer Effekt eindeutig nachgewiesen, der zu einer Verringerung vitaler Zellen um bis zu 60 % führte (Abb. 4.6). Dieses Ergebnis war im Gegensatz zu den LDH-Inhibitoren unerwartet gewesen, da Reversan bisher stets in Zusammenhang mit Chemoresistenz untersucht worden war (s. auch Kapitel 1.4).

Zusätzlich wurde der antiproliferative Effekt der drei Inhibitoren bei 5 % und 1 % Sauerstoff bestimmt (Abb. 4.6). Der antiproliferative Effekt der beiden LDH-Inhibitoren wurde durch beide Sauerstoffkonzentrationen (5 % und 1 %) kaum beeinflusst (Abb. 4.7). So verringerte sich der Anteil vitaler Zellen durch Natriumoxamat bzw. Galloflavin um bis zu maximal 50 % bei 5 % und 1 % Sauerstoff (Abb. 4.6). Hierin unterschieden sich beide LDH-Inhibitoren, aber auch Reversan, von 5-FU, dessen antiproliferativer Effekt bei beiden Sauerstoffkonzentrationen geringerer war als bei 21 % (Abb. 4.4).

Im Vergleich zu den beiden LDH-Inhibitoren, für die ein antiproliferativer Effekt bei 5 % und 1 % Sauerstoff erwartet wurde, war der antiproliferative Effekt von Reversan bei beiden Sauerstoffkonzentrationen überraschend stark ausgeprägt und der Anteil vitaler Zellen verringerte sich um bis zu 60 % (Abb. 4.7). Der antiproliferative Effekt der drei Inhibitoren basierte auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff auf Zytostase (Abb. 4.8).



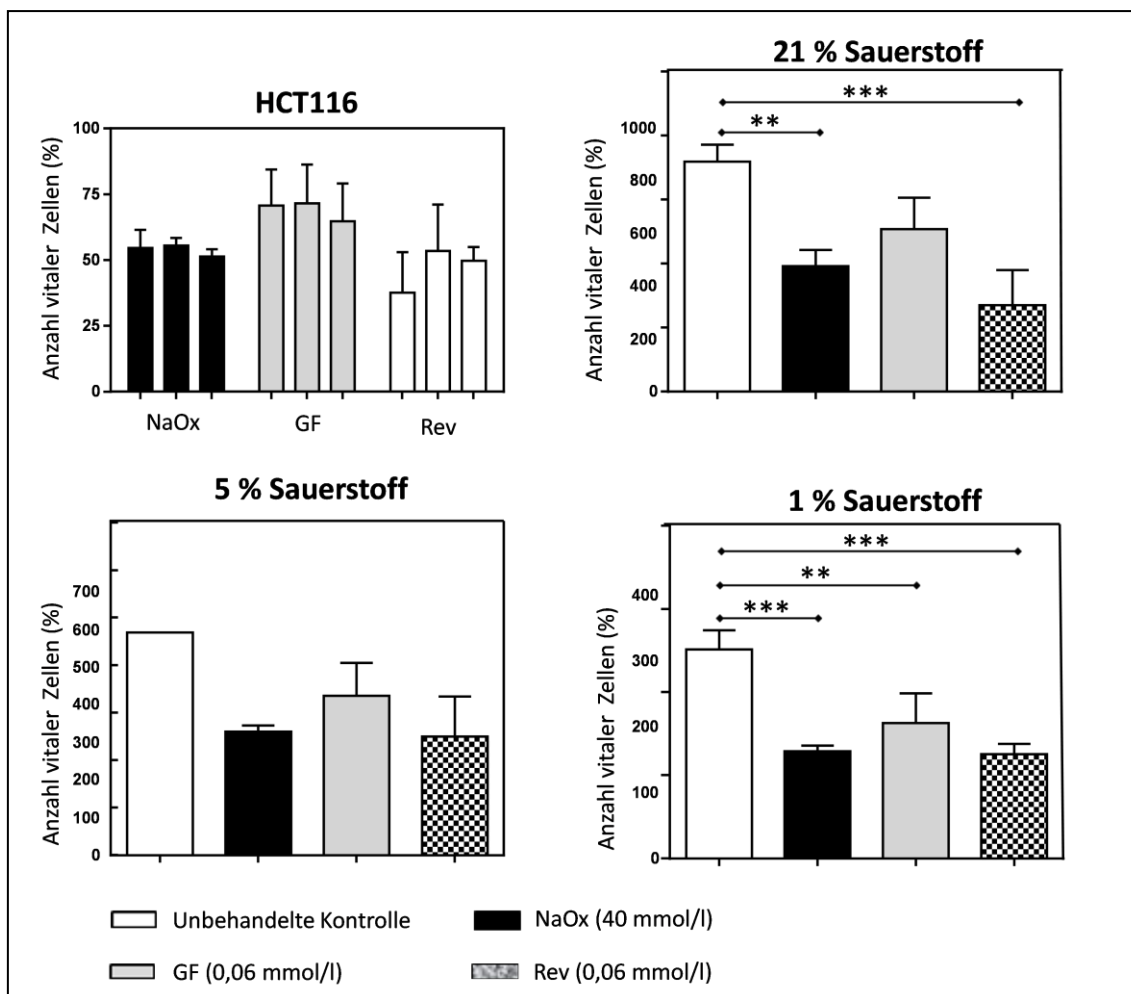
**Abbildung 4.6:** Der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat (NaOx), Galloflavin (GF) und Reversan (Rev) bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen. Die Zellen wurden für 72 Stunden inkubiert. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle prozentual berechnet. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .



**Abbildung 4.7: Der antiproliferative Effekt von Reversan bei 5 % (A) und 1 % (B) Sauerstoff.** Die Zellen wurden für 72 Stunden inkubiert. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit Kristallviolett bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle prozentual berechnet. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben (s. auch Abb. 10.5 im Anhang). \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Der antiproliferative Effekt von Reversan für kolorektale Karzinomzellen (Abb. 4.6 und 4.7) war, wie bereits erwähnt, so nicht erwartet worden. Reversan wurde bisher ausschließlich in Zusammenhang mit Chemoresistenz untersucht (Kapitel 1.4 und 6.3). Dabei weist MRP1 eine breite Spezifität für unterschiedliche Molekülgruppen auf wie Lipide, Peptide und metabolische Produkte (s. auch Kapitel 1.4).

Der nachgewiesene antiproliferative Effekt von Reversan jenseits der Chemoresistenz könnte somit darauf hindeuten, dass MRP1 auch eine grundlegende Aufgabe im Stoffwechsel der untersuchten kolorektalen Karzinomzellen übernimmt; dies weiter zu untersuchen, wäre sicherlich von Interesse.



**Abbildung 4.8: Der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat (NaOx), Galloflavin (GF) und Reversan (Rev) basiert auf Zytostase.** Dieser Zusammenhang ist exemplarisch für die Zelllinie HCT116 gezeigt (für die anderen Zelllinien s. Abb. 10.6 - 10.9 im Anhang). Im oberen linken Diagramm wurde die Anzahl vitaler Zellen auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. In den drei anderen Diagrammen wurde die Anzahl vitaler Zellen auf die Aussaat normalisiert. Aus dieser Darstellung wird ersichtlich, dass der antiproliferative Effekt der drei Inhibitoren auf Zytostase beruht und nicht auf Zytotoxizität. Hierzu wäre es notwendig, dass die Anzahl vitaler Zellen unter die Aussaat (=100 %) fällt. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit Kristallviolett bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Als nächstes wurde die Wirkung der drei Inhibitoren in Kombination mit 5-FU untersucht. Dazu wurden zu jeder der neun Verdünnungsstufen von 5-FU (von  $10^{-1}$  bis  $10^{-9}$  mol/l) 20, 40, 60 oder 80 mmol/l Natriumoxamat zugegeben und für diese Kombinationen die  $IC_{50}$  Werte bestimmt. Dadurch war es möglich, die für weitere Untersuchungen bereits festgelegte Konzentration an Natriumoxamat von 40 mmol/l (Tabelle 4.3) in seiner Wirkung mit 5-FU mit weiteren Konzentrationen an Natriumoxamat zu vergleichen (Tabelle 10.1) und sich so einen Überblick über die Dynamik

möglicher Wirkeffekte von Natriumoxamat zu verschaffen. Diese Vorgehensweise machte es notwendig, dass allein für die Kombination von 5-FU mit den vier Konzentrationen an Natriumoxamat bei mindestens 3 unabhängigen Versuchen zu jeweils 6 technischen Replikaten pro Verdünnungsstufe für 5-FU über 500 Messungen notwendig waren.

Für die Konzentration von 40 mmol/l Natriumoxamat sind die Ergebnisse in Tabelle 4.4 aufgeführt. Die IC<sub>50</sub> Werte der anderen Kombinationen sind in Tabelle 10.1 im Anhang zu finden. Entsprechend wurde für Galloflavin (20, 40 und 60 µmol/l) und Reversan (20, 40, 60 µmol/l) verfahren (Tabelle 10.2 und Tabelle 10.3).

Um die Steigerung des antiproliferativen Effekts von 5-FU durch Kombination mit den Inhibitoren zu verdeutlichen, wurde der Wirksamkeits-Index berechnet. Hierzu wird der Quotient aus den IC<sub>50</sub> Werten für 5-FU und der jeweiligen Kombination gebildet. In Tabelle 4.5 ist der Wirksamkeits-Index für 40 mmol/l Natriumoxamat, 80 µmol/l Galloflavin und 60 µmol/l Reversan in Kombination mit 5-FU aufgelistet. Der Quotient weist für den Großteil der Kombinationen Werte über 1000 auf, was auf eine mehr als 1000-fache Zunahme des antiproliferativen Effekts der jeweiligen Kombination im Vergleich zu 5-FU hindeutet.

Für SW620 fiel auf, dass der antiproliferative Effekt von Galloflavin und Reversan in Kombination mit 5-FU wesentlich geringer war als für Natriumoxamat und 5-FU (Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.4: Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) von 5-FU in Kombination mit 40 mmol/l Natriumoxamat (NaOx) bei 21 % Sauerstoff.** Die IC<sub>50</sub> Werte in nmol/l (10<sup>-9</sup> mol/l) sind als Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall [in Klammern] für jeweils drei unabhängige Versuche angeben. Die IC<sub>50</sub> Werte für 5-FU sind Tabelle 4.2 und für Natriumoxamat in Tabelle 4.3 aufgeführt.

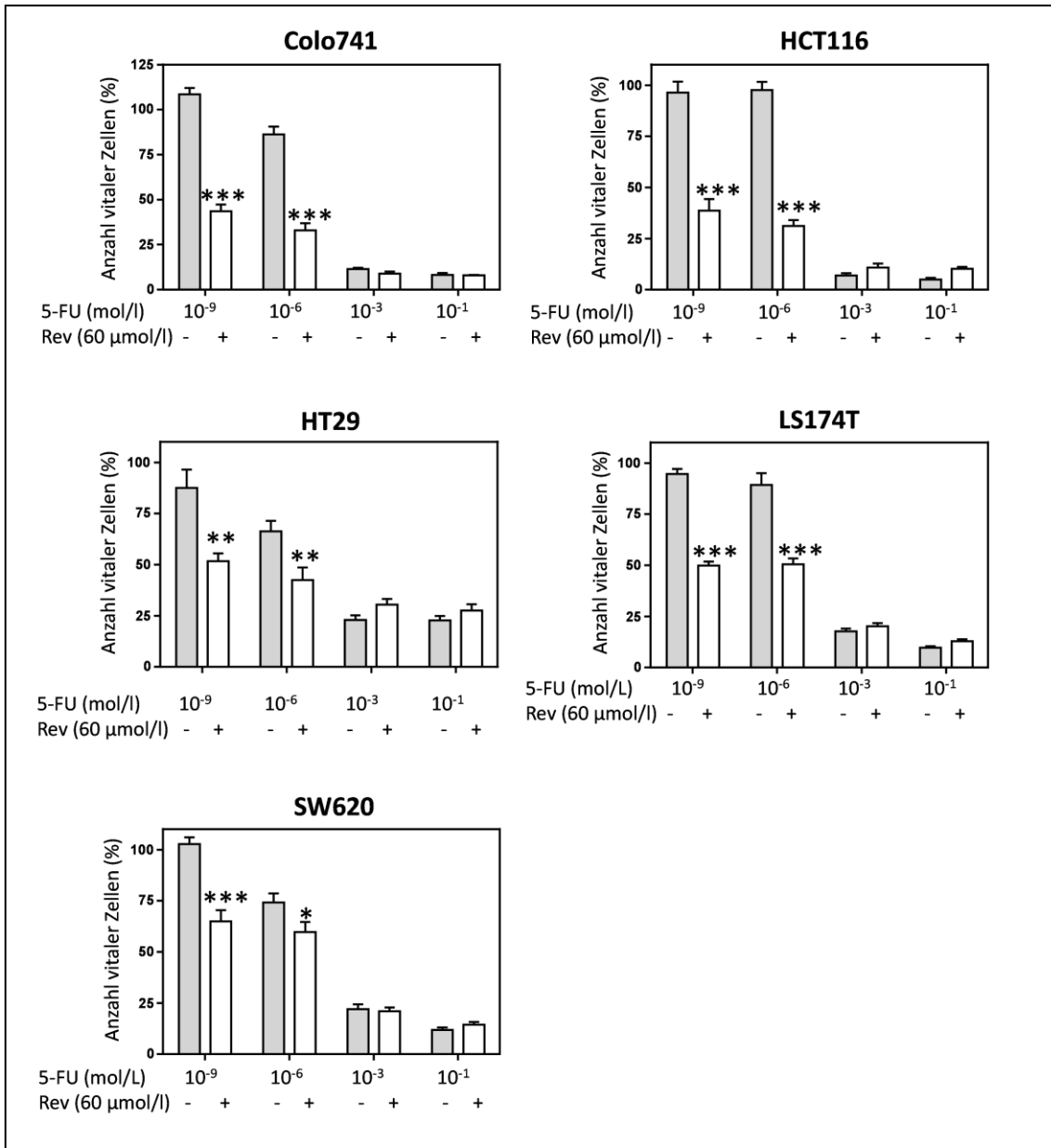
5-FU (10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-9</sup> mol/l) plus	Colo741	HCT116	HT29	LS174T	SW620
40 mmol/l NaOx	1,9 [0,6-6,6]	7,6 [2,1-28]	1,3 [0,3-5,9]	9,3 [2,2-39]	290 [61-1300]



**Tabelle 4.5: Der antiproliferative Effekt für die Kombination aus 5-FU und den Inhibitoren Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan.** Hierzu wurde das Verhältnis (= Wirksamkeits-Index) der IC<sub>50</sub> Werte für 5-FU und der jeweiligen Kombination aus 5-FU und Inhibitor berechnet: IC<sub>50</sub> 5-FU / IC<sub>50</sub> (5-FU+Inhibitor). Die jeweiligen IC<sub>50</sub> Werte sind in Tabelle 4.2 und Tabelle 4.4 sowie im Anhang in den Tabelle 10.2 und 10.3 aufgelistet. NaOx: Natriumoxamat; GF: Galloflavin; Rev: Reversan.

5-FU (10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-9</sup> mol/l) plus	Colo741	HCT116	HT29	LS174T	SW620
40 mmol/l NaOx	>1000	566	>1000	978	48
60 µmol/l GF	>1000	>1000	>1000	11,6	18,5
60 µmol/l Rev	>1000	>1000	711	520	6,0

Zu der bereits oben angesprochenen Tatsache, dass in dieser Arbeit zum ersten Mal ein antiproliferativer Effekt für Reversan unabhängig von der Situation einer Chemoresistenz gezeigt wurde, fehlt noch die endgültige Klärung, ob MRP1 eine Spezifität für 5-FU aufweist. Die Daten der Arbeit lassen einen solchen Zusammenhang vermuten. So verstärkte Reversan, eindeutig den antiproliferativen Effekt von 5-FU um bis zu 60 % (Abb. 4.9). Auch dies wurde bisher so nicht gezeigt.



**Abbildung 4.9: Reversan (Rev) verstärkt den antiproliferativen Effekt von 5-FU bei 21 % Sauerstoff.** Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 21 % Sauerstoff inkubiert. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle (=100 %) berechnet. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001 im Vergleich zu 5-FU.

#### **4.4 Der antiproliferative Effekt unterschiedlicher Kombinationen aus Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan**

Auf Basis der für Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan ermittelten  $IC_{50}$  Werte (Tabelle 4.3) wurde der antiproliferative Effekt verschiedenster Kombinationen der Inhibitoren bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff bestimmt. Dazu wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 40 mmol/l Natriumoxamat, 60  $\mu$ mol/l Galloflavin und 60  $\mu$ mol/l Reversan.

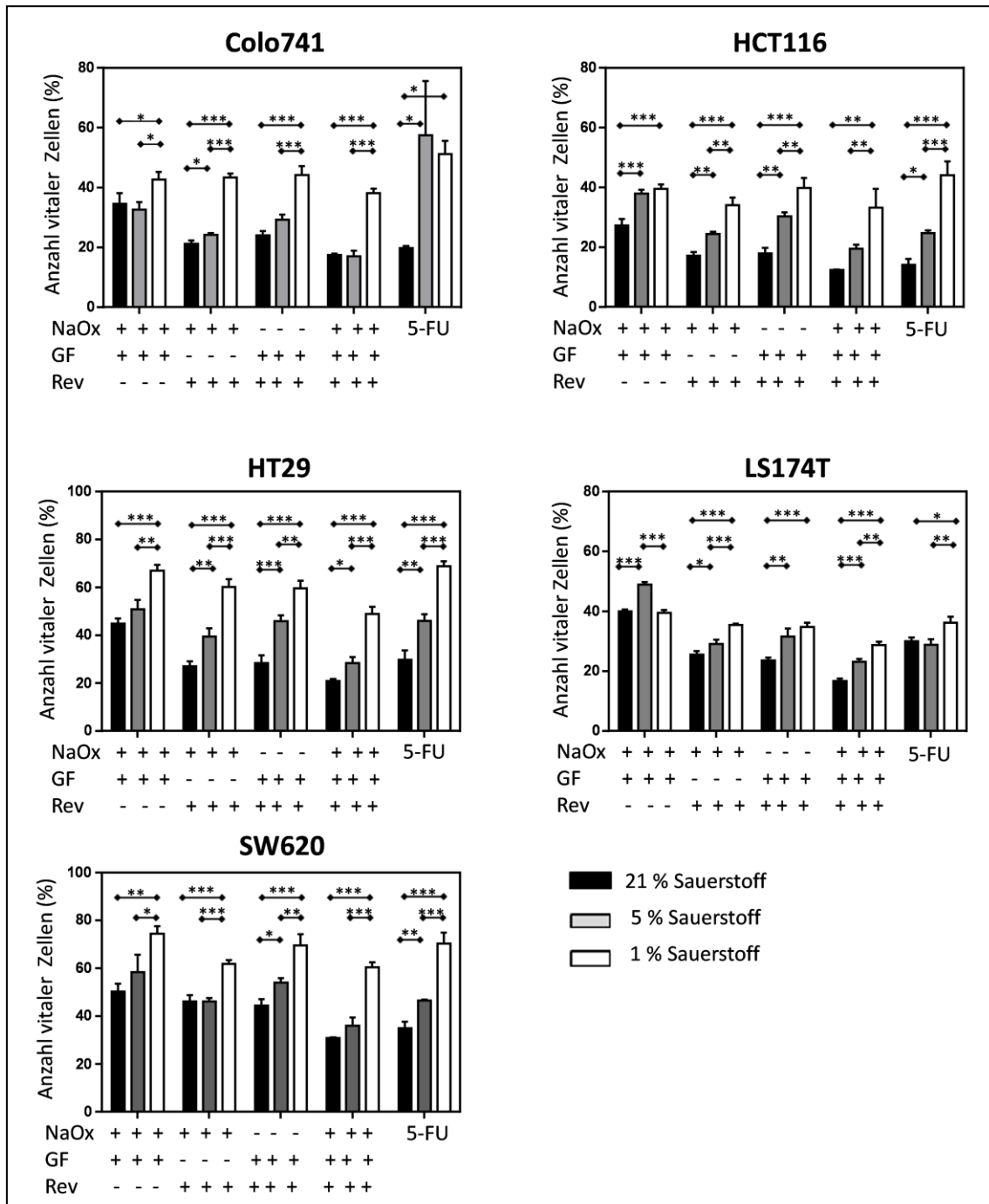
Unabhängig von der Sauerstoffkonzentration wies Natriumoxamat in aller Regel einen stärkeren antiproliferativen Effekt auf als Galloflavin (Abb. 4.6). Ausnahmen hiervon waren die beiden Zelllinien HT29 und SW620.

Die Kombination aus Natriumoxamat und Galloflavin verringerte bei 21 % Sauerstoff den Anteil vitaler Zellen bei den fünf kolorektalen Karzinomzellenlinien um durchschnittlich 60 % (Abb. 4.10). Für Colo741, HCT116 und LS174T war diese Stärke des antiproliferativen Effekts auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff zu beobachten gewesen (Abb. 4.10).

Die Zugabe von Reversan zu Natriumoxamat bzw. Galloflavin senkte den Anteil vitaler Zellen bei Colo741, HCT116, HT29 und LS174T insbesondere bei 21 % und 5 % Sauerstoff um mindestens 70 % (Abb. 4.10). Der antiproliferative Effekt der Kombination aus Natriumoxamat mit Reversan war bei 21 % Sauerstoff stärker als der antiproliferative Effekt der einzelnen Inhibitoren (Abb. 4.6 und Abb. 4.10). Während der antiproliferative Effekt von Reversan unabhängig von der Sauerstoffkonzentration war, war dies für die Kombination aus Natriumoxamat sowie Galloflavin zu beobachten gewesen (Abb. 4.10).

Den stärksten antiproliferativen Effekt wies die Dreifachkombination aus Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan auf: Bei 21 % Sauerstoff wurde der Anteil vitaler Zellen auf max. 12 % (und min. 20 %) verringert; bei 1 % Sauerstoff lag der Anteil

vitaler Zellen zwischen 28-48 %. Eine Ausnahme waren SW620 Zellen: Hier waren bei 21 % Sauerstoff noch 30 % und bei 1 % Sauerstoff noch 60 % der Zellen vital (Abb. 4.10).



**Abbildung 4.10: Der antiproliferative Effekt unterschiedlicher Kombinationen der drei Inhibitoren im Vergleich zum antiproliferativen Effekt von 5-FU bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen.** Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle (=100 %) berechnet. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Bei 21 % Sauerstoff war der antiproliferative Effekt der Kombinationen aus Natriumoxamat und Galloflavin sowie der beiden Kombination der LDH-Inhibitoren mit Reversan um durchschnittlich ca. 23 % geringer als für 5-FU. Dagegen war der antiproliferative Effekt der Dreifachkombination um durchschnittlich 26 % stärker als für 5-FU (Abb. 4.10).

Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil vitaler Zellen nach Inkubation mit 5-FU mit dem Anteil vitaler Zellen nach Inkubation mit den Inhibitoren ins Verhältnis gesetzt und der Wirksamkeitsindex angegeben. Weist dieser einen Wert von >1 auf, so deutet dies auf einen stärkeren antiproliferativen Effekt und ein Wert von <1 auf einen schwächeren antiproliferativen Effekt der Kombination im Vergleich zu 5-FU hin. Mit dieser Berechnung wird deutlich, dass die Wirksamkeit beider LDH-Inhibitoren bei 5 % und 1 % Sauerstoff stärker war als für 5-FU (Tabelle 4.7 und 4.8).

Die Dreifachkombination aus Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan wies für die fünf kolorektalen Karzinomzelllinien einen gleichstarken bzw. stärkeren antiproliferativen Effekt auf als das Chemotherapeutikum 5-FU (5 µmol/l). Dies war für alle drei Sauerstoffkonzentrationen zu beobachten (Tabellen 4.6, 4.7 und 4.8).

**Tabelle 4.6: Der antiproliferative Effekt der Kombinationen aus Natriumoxamat (NaOx), Galloflavin (GF) und Reversan (Rev) im Vergleich zu 5-FU bei 21 % Sauerstoff.** Hierzu wurde der Wirksamkeits-Index berechnet, der das Verhältnis aus Anzahl vitaler Zellen für 5-FU (5 µmol/l) und den Kombinationen angibt. Eine Zahl kleiner 1 bedeutet für die jeweilige Kombination, dass diese weniger antiproliferativ wirkt als 5-FU und eine Zahl größer 1, dass der antiproliferative Effekt der Kombination größer ist als der von 5-FU.

Zelllinie	NaOx+GF	NaOx+Rev	GF+Rev	NaOx+GF+Rev
Colo741	0,5	0,9	0,8	1,2
HCT116	0,4	0,7	0,7	1,0
HT29	0,8	1,1	1,1	1,5
LS174T	0,7	1,0	1,0	1,5
SW620	0,6	0,7	0,6	1,1

**Tabelle 4.7: Der antiproliferative Effekt der Kombinationen aus Natriumoxamt (NaOx), Galloflavin (GF) und Reversan (Rev) im Vergleich zu 5-FU bei 5 % Sauerstoff.** Der antiproliferative Effekt ist als Wirksamkeits-Index dargestellt. Zu seiner Berechnung siehe Text bei Tabelle 4.6.

Zelllinie	NaOx+GF	NaOx+Rev	GF+Rev	NaOx+GF+Rev
Colo741	0,9	1,1	0,9	1,4
HCT116	0,6	0,9	0,7	1,2
HT29	0,9	1,2	1,0	1,7
LS174T	0,6	1,0	0,9	1,3
SW620	0,8	1,1	0,8	1,3

**Tabelle 4.8: Der antiproliferative Effekt der Kombinationen aus Natriumoxamt (NaOx), Galloflavin (GF) und Reversan (Rev) im Vergleich zu 5-FU bei 1 % Sauerstoff.** Der antiproliferative Effekt ist als Wirksamkeits-Index dargestellt. Zu seiner Berechnung siehe Text bei Tabelle 4.6.

Zelllinie	NaOx+GF	NaOx+Rev	GF+Rev	NaOx+GF+Rev
Colo741	1,1	1,2	1,0	1,3
HCT116	1,1	1,2	1,0	1,4
HT29	1,0	1,2	1,1	1,4
LS174T	1,0	1,1	1,1	1,3
SW620	0,9	1,1	1,0	1,2

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

- (i) Der MRP1-Inhibitor Reversan weist einen antiproliferativen Effekt bei kolorektalen Karzinomzellen auf, der auch für tumorphysiologische Sauerstoffkonzentrationen nachzuweisen war (Abb. 4.7);
- (ii) Die beiden LDH-Inhibitoren Natriumoxamat und Galloflavin weisen einen antiproliferativen Effekt auf;
- (iii) Durch Kombination mit Natriumoxamat und Galloflavin war der antiproliferative Effekt von Reversan zu steigern;
- (iiii) Den stärksten antiproliferativen Effekt wies die Dreifachkombination aus Reversan, Natriumoxamat und Galloflavin auf, die sich im Vergleich zu 5 µmol/l 5-FU mindestens als gleichstark erwies – und dies auch in Hypoxie.

## 5 Beantwortung der Fragen

---

1. Weisen die beiden LDH-Inhibitoren Natriumoxamat und Galloflavin und der MRP1-Inhibitor Reversan einen antiproliferativen Effekt bei kolorektalen Karzinomzellen auf? Ist dieser auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % nachzuweisen?

Jeder der drei Inhibitoren weist einen antiproliferativen Effekt bei den fünf untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien bei 21 % Sauerstoff auf. Dieser antiproliferative Effekt wurde gezeigt als halbmaximale inhibitorische Konzentration oder  $IC_{50}$  (Tabelle 4.3), durch die Bestimmung der Stärke des Rückgangs vitaler Zellen um bis 50 % (Abb. 4.6 und 4.7) und der Qualität des antiproliferativen Effekts als Zytostase (Abb. 4.8 sowie Abb. 10.6-10.9). Bedeutsamer ist, dass die drei Inhibitoren auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 und 1 % wirksam waren. So verringerte sich der Anteil vitaler Zellen durch Natriumoxamat bzw. Galloflavin um bis zu 45 % (Abb. 4.6) und bei Reversan um bis zu 60 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 4.7).

2. Führen unterschiedliche Kombinationen der drei Inhibitoren Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan zu einem stärkeren antiproliferativen Effekt? Ist dieser auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % nachzuweisen?

Die Kombination aus Natriumoxamat und Galloflavin verringerte bei 21 % Sauerstoff den Anteil vitaler Zellen bei den fünf kolorektalen Karzinomzellenlinien um durchschnittlich 60 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 4.10). Für drei von fünf Zelllinien (Colo741, HCT116 und LS174T) war der antiproliferative Effekt in dieser Stärke auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff nachzuweisen (Abb. 4.10). Die Zugabe von Reversan zu Natriumoxamat bzw. Galloflavin verringerte den Anteil vitaler Zellen bei vier von fünf Zelllinien (Colo741, HCT116, HT29 und LS174T) bei 21 % und 5 % Sauerstoff um mindestens 70 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 4.10). Den stärksten antiproliferativen Effekt wies die Dreifachkombination aus Natriumoxamat,

Galloflavin und Reversan auf. Für das Konzept der Arbeit war wichtig zeigen zu können, dass der antiproliferative Effekt der drei Inhibitoren auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen nachzuweisen war. So verringerte sich der Anteil vitaler Zellen bei 1 % Sauerstoff durch diese Kombination auf bis zu 28 % (Abb. 4.10) bei vier von fünf Zelllinien (einzige Ausnahme waren SW620 Zellen).

3. Ist der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan bzw. ihre Kombination mit dem von 5-FU vergleichbar? Ist dieser auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % nachzuweisen?

Die Dreifachkombination aus Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan wies für die fünf kolorektalen Karzinomzelllinien einen gleichstarken bzw. stärkeren antiproliferativen Effekt auf als das Chemotherapeutikum 5-FU in einer Konzentration von 5  $\mu\text{mol/l}$ . Dies war für die drei Sauerstoffkonzentrationen nachzuweisen (Tabellen 4.6, 4.7 und 4.8).



## 6 Diskussion

---

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, inwieweit Laktatdehydrogenase (LDH) und *Multidrug resistance*-Protein 1 (MRP1) sich als Zielstrukturen für eine selektive Inhibition der Tumorzellproliferation eignen. Hierzu wurde der antiproliferative Effekt der beiden LDH-Hemmstoffe Natriumoxamat und Galloflavin und des MRP1-Hemmstoffs Reversan bei kolorektalen Karzinomzelllinien untersucht. Die Expression beider Proteine in den untersuchten Zelllinien wurde gezeigt (Abb. 4.1). Dass es sich bei beiden Zielstrukturen um spezifische Targets maligner Zellen handelt, wird durch ihre Funktion im Stoffwechsel und bei der Anpassung an Wachstumsbedingungen, die in einem soliden Tumor vorherrschen, verständlich. Hierauf wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

### 6.1 Die intratumorale Heterogenität von Tumoren

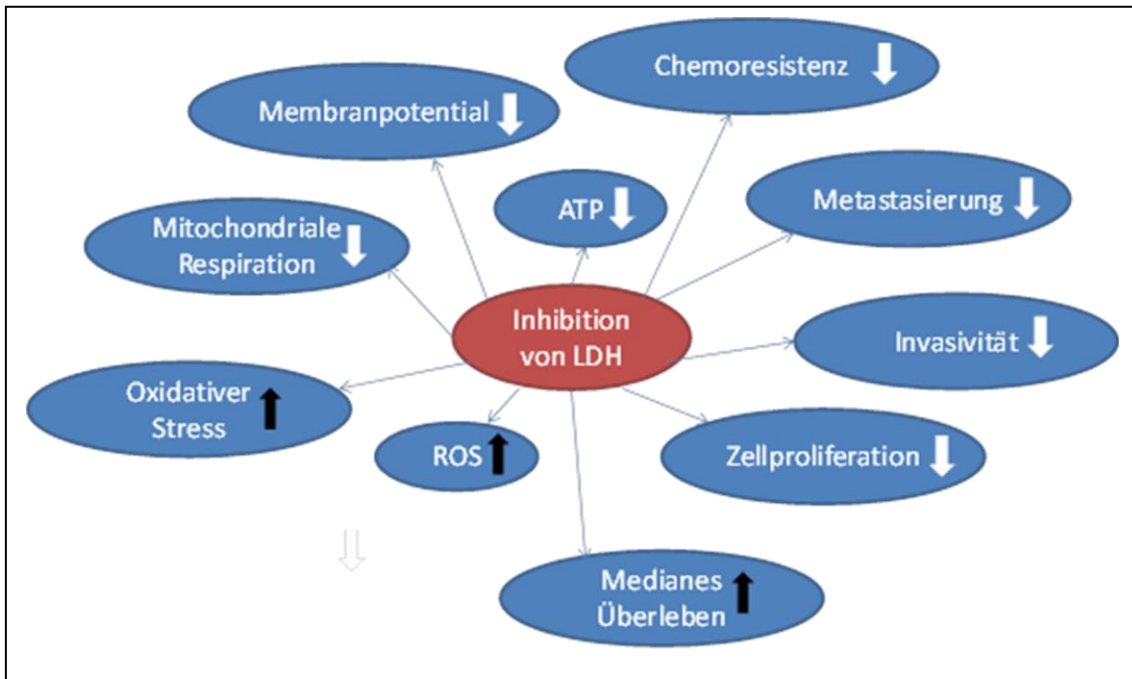
Die Zellen eines Tumors sind nicht identisch, sondern weisen heterogene Eigenschaften auf. So können sie sich unter anderem in der Aktivität einzelner Gene, in der Zusammensetzung ihrer Oberflächenrezeptoren sowie in der Stärke der Zellproliferation und dem Metastasierungsverhalten unterscheiden (Marusyk et al., 2010). Diese Diversität von Zellen innerhalb eines Tumors wird als intratumorale Heterogenität bezeichnet (Burrell et al., 2013). Gerlinger, der das Ausmaß der intratumoralen Heterogenität an Nierentumoren untersuchte, entnahm hierzu Biopsien aus unterschiedlichen Bereichen des Tumors. Dabei fand er unter anderem, dass von den insgesamt 128 nachweisbaren Mutationen sich 40 in allen untersuchten Biopsien innerhalb des Tumors befanden (»ubiquitous mutations«) und 29 Mutationen ausschließlich auf bestimmte Regionen im Tumor (»private mutations«) beschränkt waren. Die Daten von Gerlinger verdeutlichen, dass die intratumorale Heterogenität mit einer Monotherapie therapeutisch nicht adäquat zu behandeln ist und zu Resistenzbildung führen kann (Gerlinger et al., 2012).

Als Ursache der Variabilität von Zellen innerhalb eines Tumors wird das Prinzip der positiven Selektion nach der Darwinschen Evolutionstheorie gesehen. Danach werden nur solche Zellklone weiter expandiert, die den Wachstumsbedingungen im Tumor am besten angepasst sind (Nowell, 1967; Gerlinger und Swanton, 2010; Lloyd et al., 2016). Aus der malignen Zelle, die aus der neoplastischen Transformation (Einleitung) entsteht, bilden sich Tochterzellen mit unterschiedlichen Mutationen, die jeweils einen Zellklon bilden. Die Heterogenität der Zellklone innerhalb eines soliden Tumors liefert eine Erklärung dafür, warum die Behandlung von Tumoren mit einem Therapeutikum häufig nicht von dauerhaftem Erfolg ist. Der Nachteil einer Monotherapie, dass nicht sämtliche Klone eines Tumors auf den Wirkstoff adäquat ansprechen, kann durch Kombination mehrerer Wirkstoffkomponenten, die gegen verschiedene klonale Eigenschaften der Zellen gerichtet sind, zu einer Steigerung des therapeutischen Effekts führen. Dieser wird am höchsten sein, wenn es gelingt, eine entsprechend große Anzahl an Zellklonen durch die Komponenten der Kombinationstherapie zu erreichen. Zudem kann mit einer Kombinationstherapie das Risiko eines Therapieversagens durch Ausbildung von Resistenzen gesenkt werden (Gerlinger et al., 2012).

## **6.2 Beeinflussung des Tumorwachstums durch Inhibition der Laktatdehydrogenase**

Der maligne Stoffwechsel, der im Wesentlichen ATP und Metabolite für Synthesen über eine hyperaktive Glykolyse (Kapitel 1.2) bezieht, ist maßgeblich von der Aktivität der Laktatdehydrogenase abhängig (Kapitel 1.3). So führt die Inhibition von LDH-A bzw. der M-Untereinheit (Tabelle 1.1) zu zahlreichen, das maligne Wachstum hemmenden Effekten (Abb. 6.1). Charakteristisch für maligne Zellen mit hyperaktiver Glykolyse ist eine verminderte oxidative Phosphorylierung (Fantin und Leder, 2006). Die Inhibition der Laktatdehydrogenase-Aktivität auf Gen- bzw. Proteinebene dagegen führt in malignen Zellen zu einer Reaktivierung der oxidativen Phosphorylierung, was auch ihre Fähigkeit zum Wachstum in Hypoxie einschränkt; ein Hinweis dafür, dass die Laktatdehydrogenase als maßgeblich für den malignen Stoffwechsel anzusehen ist (Fantin et al., 2006). Eine weitere Auswirkung der Reaktivierung der mitochondrialen Atmung maligner Zellen ist die verstärkte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und

damit einhergehend ein durch oxidativen Stress induzierter Zelltod (Le et al., 2010). Der mechanistische Zusammenhang zwischen einer Hemmung der Laktatdehydrogenase und oxidativem Stress ist zurzeit nicht geklärt. Es wird vermutet, dass mit Inhibition der Glykolyse sich der Gehalt an (reduziertem) Gluthation, einem wichtigen zellulären Antioxidans, in der Zelle verringert (Colen et al., 2006).



**Abbildung 6.1: Übersicht über die biologischen Auswirkungen einer Inhibition der Laktatdehydrogenase-Aktivität.** Ihnen gemeinsam ist der wachstumshemmende Effekt auf maligne Zellen, der - zumindest im Tiermodell - zu einem Überlebensvorteil führt (Fantin et al., 2006). Zur Vereinfachung der Darstellung wurde nicht unterschieden, ob die Inhibition auf Gen- oder Proteinebene durchgeführt wurde. Pfeile nach oben und unten weisen auf die Zu- bzw. Abnahme biologischer Effekte hin. Eigene Zusammenstellung nach Literaturdaten (Fantin et al., 2006; Le et al., 2010; Zhou et al., 2010; Zhao et al., 2011; Miao et al., 2013).

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die LDH-Inhibitoren Natriumoxamat und Galloflavin einen antiproliferativen Effekt in kolorektalen Karzinomzellen induzieren (Tabelle 4.3). Natriumoxamat ist bereits seit Längerem als Inhibitor bekannt (Novoa et al., 1958) im Gegensatz zu Galloflavin, dessen inhibitorischen Eigenschaften erst seit Kurzem untersucht werden (Manerba et al., 2012). Für die vorliegende Arbeit wurde die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) beider Inhibitoren bei fünf kolorektalen Karzinomzelllinien bestimmt. So war der  $IC_{50}$  für Galloflavin ca. 100-1000fach niedriger als für Natriumoxamat, was für einen entsprechend stärkeren antiproliferati-

ven Effekt von Galloflavin spricht (Tabelle 4.3). Auch weist Galloflavin eine höhere Affinität zu LDH5 (Tabelle 1.1) auf als Natriumoxamat (Granchi et al., 2013b). Dass ein stärkerer antiproliferativer Effekt tatsächlich auf einer höheren Affinität basiert, lässt sich auch mathematisch nachweisen (Cheng und Prusoff, 1973). Unabhängig davon, dass der  $IC_{50}$  für Natriumoxamat deutlich höher war als für Galloflavin, war das Ansprechen der fünf untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien auf beide Inhibitoren vergleichbar. So war der antiproliferative Effekt beider Inhibitoren bei HCT116 am stärksten, gefolgt von Colo741, HT29, LS174T und am schwächsten bei SW620 (Tabelle 4.3).

In dieser Arbeit wurde für Natriumoxamat ein geringerer antiproliferativer Effekt bei (nicht-malignen) Fibroblasten als bei den fünf untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien nachgewiesen. Dieser Unterschied war für Galloflavin nicht so eindeutig, auch zeigte dieser Inhibitor unterschiedlich starke antiproliferative Effekte bei den kolorektalen Karzinomzellen (Tabelle 4.3). Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Möglicherweise ist dieses Ergebnis mit der geringeren Spezifität von Natriumoxamat für LDH im Vergleich zu Galloflavin zu erklären (Thornburg et al., 2008; Granchi et al., 2013b). So hemmt Natriumoxamat zusätzlich zur Laktatdehydrogenase auch die Aspartat-Aminotransferase (AAT), die die Umwandlung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat katalysiert. Ohne AAT ist der Malat-Aspartat-Shuttle nicht möglich, der  $NADH+H^+$  aus dem Cytosol in die Matrix der Mitochondrien transportiert. Eine Inhibition von AAT führt u. a. zu einer Verringerung des zellulären Sauerstoffverbrauchs und zu einer Abnahme der ATP-Konzentration (Thornburg et al., 2008).

Ein therapeutischer Effekt von Natriumoxamat ist auch *in vivo* nachzuweisen (Li et al., 2013), doch werden mit den therapeutisch notwendigen Dosen bereits irreversible toxische Effekte induziert (Goldberg et al., 1965), sodass eine klinische Anwendung als unwahrscheinlich gilt (Zhai et al., 2013; Granchi et al., 2013). Dagegen weist Galloflavin bis zu einer Dosis von 400 mg/kg Körpergewicht keine letalen Nebenwirkungen auf (Granchi et al., 2013). Untersuchungen an nicht malignen Zellen *in vitro* haben zudem

gezeigt, dass Galloflavin bis zu einer Konzentration von 250 µmol/l Zellvitalität und Zellproliferation nur unwesentlich beeinflusst (Valvona et al., 2016). Diese Konzentration an Galloflavin ist bis zu vierfach höher als die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration (Abb. 4.6). Da die Ausprägung von Nebenwirkungen dosisabhängig ist, ist bei den therapeutisch wirksamen (geringeren) Dosen für Galloflavin von weniger Nebenwirkungen auszugehen als für Natriumoxamt.

### **6.3 Effekte von MRP1 in normalen und malignen Zellen**

Der antiproliferative Effekt von Reversan wurde bisher ausschließlich in Zusammenhang mit einer verminderten zytostatischen Wirkung von Chemotherapeutika untersucht (Burkhart et al., 2009; Tivnan et al., 2015). Die klinisch relevante Funktion von MRP1 an der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Mehrfachchemoresistenzen (*Multidrug Resistance*, MDR) ist bekannt (Leslie et al., 2005; Munoz et al., 2007; Cole, 2014a; Lu et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde ein antiproliferativer Effekt von Reversan bei Zellen kolorektaler Karzinomzelllinien erstmalig nachgewiesen, ohne dass diese mit Chemotherapeutika inkubiert waren (Tabelle 4.3). Dieses Vorgehen basiert auf Daten aus der Literatur, dass MRP1 auch eine grundlegende Bedeutung für den Erhalt der Zellfunktion zukommt (Cole, 2014a). So ist MRP1 am Transport zahlreicher Xenobiotika und endogener Substrate (Opiate, antivirale Medikamente, Antibiotika, Leukotrien LCT<sub>4</sub>, Östrogen und Glutathion) beteiligt, ebenso an entzündlichen und/oder immunologischen Vorgängen wie der Makuladegeneration oder bei neurologischen Störungen (Cole, 2014a/b).

Weitere MRP1-spezifische Substrate stellen unter anderem Glutathionkonjugate wie Katecholaminmetabolite und Lipidderivate wie Prostaglandin A<sub>2</sub> und J<sub>2</sub> als auch der reaktive Aldehyd HNE (4-Hydroxynonenal) und der Neurotransmitter LPI (Lysophosphatidylinositol) dar (Cole, 2014). Durch Hemmung der MRP1-Funktion kommt es zu einer Anreicherung dieser Substanzen in der Zelle, von denen einige zytotoxische Effekte auslösen können. So induziert z. B. die intrazelluläre Anreicherung von HNE über oxidativen Stress Apoptose (Dalleau et al., 2013). Untersuchungen an humanen Prosta-

takarzinomzellen mit einem MRP1-Knockdown zeigen eine Verbindung zwischen dem reduzierten Export von LPI und einer verminderten Zellproliferation (Pineiro et al., 2011). Auch die Bedeutung von MRP1 für den Export der oxidierten Form von Glutathion (GSSG) wurde untersucht. Wird MRP1 gehemmt und GSSG verbleibt deshalb in der Zelle, so führt dessen intrazelluläre Anreicherung zum Zelltod (Gordillo et al., 2016). Eine Erklärung hierfür scheint zu sein, dass GSSG die Aktivierung der auch an der Regulation von Apoptose beteiligten Proteinkinasen JNK und p38 induziert (Franco und Cidlowski, 2012; Cai et al., 2006). Somit kann eine Vielzahl an Substanzen zytotoxisch wirken, wenn diese durch Hemmung von MRP1 in der Zelle verbleiben. Interessant in diesem Zusammenhang ist der Bezug zu Kapitel 6.2, dass auch bei der Hemmung der Laktatdehydrogenase eine gestörte Glutathion-Funktion an der Auslösung von Zelltod beteiligt ist.

#### **6.4 Antiproliferative Effekte der Kombinationen aus Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan**

Die Kombination der drei Inhibitoren Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan steigerte den antiproliferativen Effekt der Einzelsubstanz und war im Vergleich zum antiproliferativen Effekt von 5-FU gleichstark bzw. stärker (Abb. 4.10). Der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat plus Reversan und Galloflavin plus Reversan war bei 21 % Sauerstoff nahezu gleich und hatte sich im Vergleich zu den Einzelsubstanzen nahezu verdoppelt (Abb. 4.6 und 4.10).

Das therapeutische Ziel mit den beiden LDH-Inhibitoren Natriumoxamat und Galloflavin war, durch Hemmung der Laktatdehydrogenase die Bildung von ATP durch die hyperaktive Glykolyse (Kapitel 1.2) zu blockieren und durch Mangel an ATP die Aktivität ATP-abhängiger Transportsysteme indirekt zu hemmen. Dass in malignen Zellen eine Hemmung der Glykolyse zu einer Verringerung der Aktivität von ABC-Transportern führt, wurde von Nakano gezeigt. Durch Inhibition der Hexokinase wurde die Glykolyse nicht mehr (ausreichend) mit phosphorylierter Glukose versorgt und in der Zelle nahmen der Anteil an ATP sowie die Aktivität der ATP-abhängigen ABC-Transporter ABCG2

und ABCB1 ab (Nakano et al., 2011). Da auch MRP1 zur Familie der ATP-abhängigen ABC-Transporter gehört, kann von einem vergleichbaren Effekt durch Inhibition der Laktatdehydrogenase ausgegangen werden: Der Glukoseumsatz der Glykolyse verringert sich und ein abnehmender zellulärer ATP-Spiegel beeinflusst die Funktion von MRP1. Diese indirekte Inhibition der MRP1-Funktion durch LDH-Inhibitoren sollte durch den MRP1-Inhibitor Reversan noch zu verstärken sein. Tatsächlich wurde der stärkste antiproliferative Effekt mit der Dreifachkombination aus Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan erreicht und der Anteil vitaler Zellen bis auf 12 % reduziert (Abb. 4.10); lediglich SW620 bildete hierbei eine Ausnahme.

Nachdem in dieser Arbeit für unterschiedliche Kombinationen der Inhibitoren eine Steigerung des antiproliferativen Effekts nachgewiesen werden konnte, wurde auch die Wirkung der Inhibitoren in Kombination mit dem Chemotherapeutikum 5-FU untersucht. 5-FU ist Bestandteil der bei der Behandlung kolorektaler Karzinome eingesetzten Chemotherapeutika (Gustavsson et al., 2015). Für die Chemotherapeutika Vincristin (100 nmol/l) und Etoposid (2  $\mu$ mol/l) wurde bereits gezeigt, dass durch Inhibition der MRP1-Funktion ihre chemotherapeutische Wirkung gesteigert werden konnte. So zum Beispiel wurde der Anteil vitaler Zellen der Glioblastom-Zelllinie U251 durch Zugabe von 15  $\mu$ mol/l Reversan zu 100 nmol/l Vincristin von ca. 50 % auf 12 % verringert (Tivnan et al., 2015). Ein Zusammenhang zwischen einer Inhibition von MRP1 und Zunahme des antiproliferativen Effekts von 5-FU ist bisher experimentell nicht bestätigt; ebenso wenig, dass MRP1 den Export von 5-FU vermittelt. In dieser Arbeit wurde der antiproliferative Effekt unterschiedlicher 5-FU Konzentrationen mit der Kombination aus 5-FU und 60  $\mu$ mol/l Reversan verglichen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Reversan den antiproliferativen Effekt niedriger Konzentrationen an 5-FU um bis zu 60 % steigerte (Abb. 4.9). Auch die Berechnung des Wirksamkeits-Index ließ diesen durch Kombination gesteigerten antiproliferativen Effekt bei fünf der sechs kolorektalen Karzinomzelllinien erkennen und war bei zwei Zelllinien um mehr als das 1000fache erhöht (Tabelle 4.5). Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass ein Zusammenhang zwischen der Hemmung von MRP1 durch Reversan und einer Steige-

zung des antiproliferativen Effekts von 5-FU besteht. Dies impliziert ebenfalls, dass auch 5-FU ein Substrat von MRP1 sein könnte. Entsprechende Messungen zur Bestätigung dieser Annahme fehlen aber noch.

Li et al. konnten zeigen, dass durch eine microRNA-vermittelte Inhibition der Genaktivität von LDH-A der antiproliferative Effekt von 5-FU sich in kolorektalen Tumorzellen erhöht (Li et al., 2015). Basierend auf dieser Erkenntnis wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung einer Inhibition der Laktatdehydrogenase auf die Wirksamkeit von 5-FU untersucht. Tatsächlich ließ sich der antiproliferative Effekt von 5-FU durch Zugabe von Natriumoxamat oder Galloflavin um den Faktor 1000 steigern (Tabelle 4.5). Eine Ausnahme hiervon stellten die beiden Zelllinien SW620 und LS174T dar (Tabelle 4.5). Eine Erklärung hierfür könnten die für Galloflavin ermittelten  $IC_{50}$ -Werte für beide Zelllinien sein, die im Vergleich zu den drei anderen Zelllinien um den Faktor 3-4 höher liegen (Tabelle 4.3).

Die Kombination der drei Inhibitoren wies den stärksten antiproliferativen Effekt bei 21 % Sauerstoff auf, der durchschnittlich um 26 % stärker war als der von 5  $\mu$ mol/l 5-FU (Abb. 4.10). Für das Konzept der Arbeit wichtiger zu zeigen war, dass ein antiproliferativer Effekt der Kombinationen mit den drei Inhibitoren auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff nachzuweisen war (Abb 4.10).

Die geringere Wirksamkeit von Chemotherapeutika in Hypoxie, die in dieser Arbeit für das Zytostatikum 5-FU gezeigt wurde - so nahm der antiproliferative Effekt von 5-FU um das 2- bis 4-fache in Hypoxie ab (Abb. 4.4) - , ist vermutlich eine Konsequenz der verringerten Zellproliferation, die aber für die Wirksamkeit von 5-FU Voraussetzung ist (Muroso et al., 2012).



## **6.5 Der Einfluss von Tumorhypoxie auf die Funktion von LDH und MRP1**

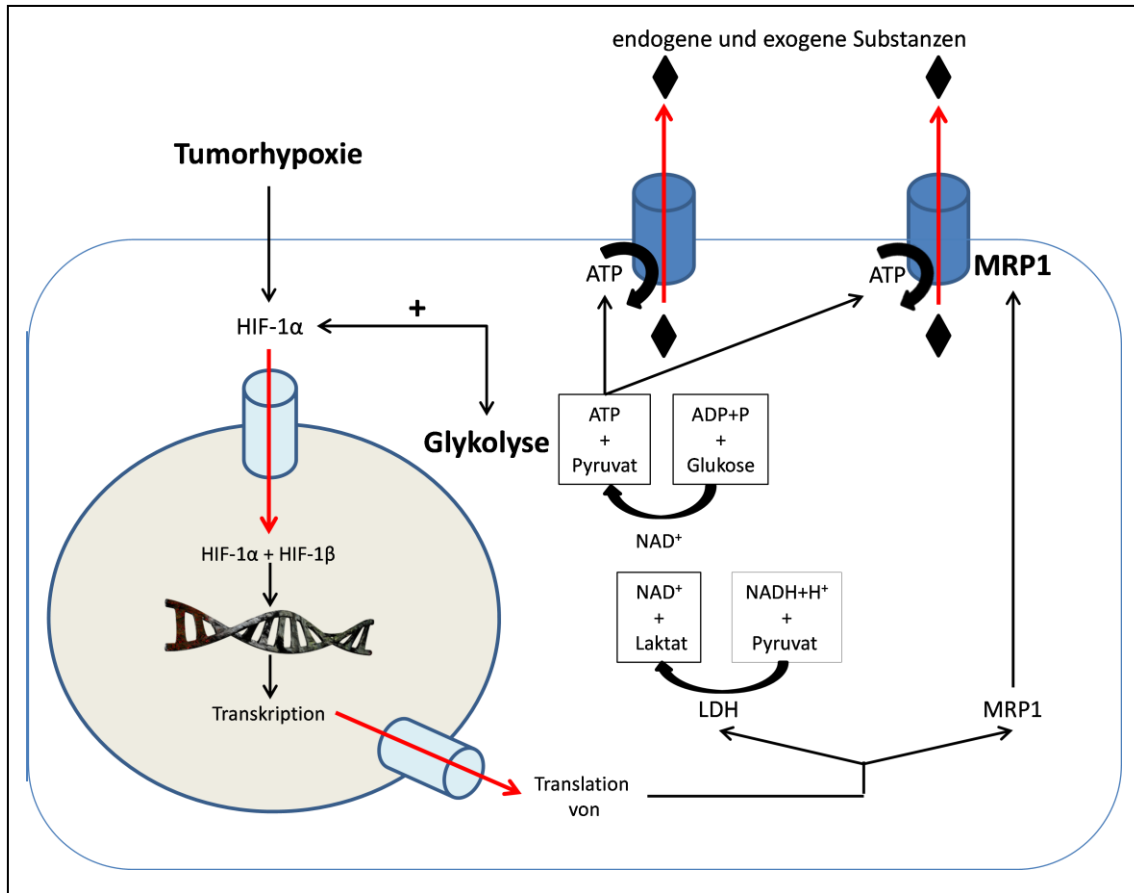
Die pharmakologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren nicht nur auf Versuche bei 21 % Sauerstoff, sondern auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff. Der Grund hierfür ist im Phänomen der Tumorhypoxie zu sehen. Während in gesunden Geweben eine durchschnittliche Sauerstoffkonzentration von 5 % physiologisch ist (Normoxie), bewegen sich die Sauerstoffkonzentrationen für Tumoren um ca. 2 %, meist noch unter 1,3 %, was in der Literatur als Hypoxie bezeichnet wird (Kallinowski et al., 1990; Vaupel und Mayer, 2005; McKeown, 2014). Der antiproliferative Effekt der drei Inhibitoren Natriumoxamat, Galloflavin (LDH-Inhibitoren) und Reversan (MRP1-Inhibitor) war auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff nachzuweisen. So verringerte sich der Anteil vitaler Zellen durch die beiden LDH-Inhibitoren um bis zu 45 % und durch den MRP1-Inhibitor sogar um bis zu 60 % (Abb. 4.6). Zudem konnte auch unter diesen Bedingungen der antiproliferative Effekt der Einzelsubstanzen durch Kombination gesteigert werden (Abb. 4.6 und 4.10).

Auf den Zusammenhang zwischen abnehmender Sauerstoffkonzentration und einer HIF1 $\alpha$ -induzierten Expression wurde bereits in der Einleitung hingewiesen (Kapitel 1.3). HIF1 $\alpha$  ist an der Genexpression glykolytischer Enzyme beteiligt wie Hexokinase 1 und 2, Phosphofruktokinase, aber auch von Glukosetransporter (GLUT-1 und GLUT-3) und Laktatdehydrogenase, sowie diverser, für die Ausbildung von Mehrfachchemoresistenzen wichtiger Proteine wie MDR1, VEGF und Matrixmetalloproteasen (Milane et al., 2011). Untersuchungen an HeLa Zellen haben gezeigt, dass der intrazelluläre Anteil an der induzierbaren HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit mit abnehmender Sauerstoffkonzentration (untersucht wurden Sauerstoffkonzentrationen bis 0,5 %) ansteigt (Jiang et al., 1996). HIF-1 $\alpha$  „kappt“ zudem die Schnittstelle zum Citratzyklus durch Expression der Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (PDK1), die ihrerseits die wichtige Funktion der Pyruvatdehydrogenase hemmt, die die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert (Kapitel 1.2). Dies führt dazu, dass der Glukosestoffwechsel der Zelle von oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien zur Teiloxidation in der Glykolyse verscho-

ben wird. Pyruvat verbleibt hierzu im Zytosol und wird dort von der Laktatdehydrogenase zu Laktat reduziert (Kapitel 1.2).

Der Zusammenhang zwischen Hypoxie und der HIF1- $\alpha$  vermittelten Expression von LDH und MRP1 (Abb. 6.2) lässt vermuten, dass der antiproliferative Effekt der Inhibitoren Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan bei Sauerstoffkonzentrationen von unter 1 % noch weiter zunehmen wird. Da ca. 60 % der soliden Tumoren mehr oder weniger ausgedehnte hypoxische bis anoxische Bereiche aufweisen, wären Inhibitoren, die auch in Hypoxie wirksam sind, zweifelsohne von Vorteil. So war der antiproliferative Effekt der Dreifachkombination aus Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan bei 5 % und 1 % Sauerstoff vergleichbar bzw. sogar stärker als der von 5-FU.

Die gezeigten Daten, dass eine Inhibition von LDH und MRP1 auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffbedingungen zu antiproliferativen Effekten führt, deuten darauf hin, dass es sich hierbei tatsächlich um für maligne Zellen zwei wichtige Zielstrukturen für Zellproliferation und Zellfunktion handelt.



**Abbildung 6.2: Übersicht über die Interaktion der beiden HIF-1 $\alpha$ -Targets Laktatdehydrogenase (LDH) und MRP1 in der malignen Zelle.** Das Konzept der Arbeit beruht darauf, die Funktion von MRP1 mit Reversan zu hemmen und die Wirkung dieser Hemmung durch LDH-Inhibitoren (Galloflavin, Natriumoxamat) zu verstärken. Hierdurch wird die hyperaktive Glykolyse als wichtiger Stoffwechselweg in der malignen Zelle für die Bildung von ATP gehemmt. Literaturdaten, die diesen Zusammenhang stützen, werden diskutiert (s. hierzu auch die Einleitung).

## 7 Ausblick

---

Die pharmakologischen Ergebnisse der Arbeit lassen weitere Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der gemeinsamen Hemmung der LDH- und MRP1-Funktion sinnvoll erscheinen. Hierzu ist es notwendig, entsprechende Transfektanten herzustellen, die entweder kein LDH und/oder MRP1 exprimieren bzw. überexprimieren. Hierzu stehen molekulare Tools wie siRNA oder CRISPR/cas zur Verfügung.

Auch sollte geklärt werden, ob beide Targets als tumorspezifisch zu klassifizieren sind, um bereits in dieser frühen Phase der Untersuchungen mögliche Nebenwirkungen abschätzen zu können. Die Ergebnisse der Arbeit verdeutlichen, dass die Untersuchungen auf jeden Fall bei physiologischen bzw. tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt werden sollten.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der durch diese Arbeit offensichtlich wurde, ist die Notwendigkeit von Transportmessungen zur Bestätigung der Spezifität von MRP1 für 5-FU. Die Daten der Arbeit lassen dies zwar vermuten, doch werden erst Transportmessungen die notwendigen experimentellen Daten liefern können, dass MRP1 (i) 5-FU aus der Zelle transportiert; (ii) dass die Inhibition der Funktion der Laktatdehydrogenase indirekt zu einer Verringerung der MRP1-Aktivität führt und damit der Export von 5-FU blockiert ist und (iii) dass die gemeinsame Hemmung von LDH und MRP1 den Export von 5-FU möglicherweise noch stärker hemmt.

Mittelfristig werden auch Untersuchungen *in vivo* notwendig sein. Im Prinzip stehen zwei „Tumormodelle“ zur Wahl: Entweder die Injektion von Tumorzellen in die Maus als Syn- bzw. Xenograft oder der Einsatz genetischer Mausmodelle. Beide »Modellformen« weisen entsprechende Vor- und Nachteile auf. Auf jeden Fall werden in einer fortgeschrittenen Phase weiterführende Untersuchungen in einem komplexen Organismus zur Bestätigung des Konzepts notwendig sein.

## 8.1 Zusammenfassung

---

Ziel der vorliegenden Arbeit waren pharmakologische Untersuchungen zum antiproliferativen Effekt der beiden Laktatdehydrogenase (LDH)-Inhibitoren Natriumoxamat und Galloflavin sowie des MRP1-Inhibitors Reversan einzeln und in Kombination bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen *in vitro* zu untersuchen. Zusätzlich wurde der antiproliferative Effekt der drei Inhibitoren mit dem von 5-FU verglichen.

Das Konzept zu dieser Arbeit basiert auf Gemeinsamkeiten zwischen LDH und MRP1 in malignen Zellen. Eine ist, dass beide Moleküle von zahlreichen Tumoren überexprimiert werden. Weiter sind beide an der Ausbildung von Chemoresistenz beteiligt und beide werden auch in Hypoxie exprimiert. Zudem wird das für die Funktion von MRP1 notwendige ATP in malignen Zellen hauptsächlich mit der hyperaktiven Glykolyse gebildet, deren Stoffumsatz auch von der LDH-Aktivität abhängig ist. Eine kombinierte Inhibition beider Zielstrukturen scheint somit geeignet zu sein, um die Proliferation maligner Zellen gezielt zu hemmen. Da in großen Teilen solider Tumoren hypoxische bzw. anoxische Bedingungen vorherrschen, wurde die Wirksamkeit der drei Inhibitoren auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff, die als tumorphysiologisch gelten, untersucht.

Die wichtigsten Ergebnisse aus dieser Arbeit sind, dass die beiden LDH-Inhibitoren Natriumoxamat und Galloflavin und der MRP1-Inhibitor Reversan einen antiproliferativen Effekt bei kolorektalen Karzinomzellen auslösen, der auch für tumorphysiologische Sauerstoffkonzentrationen nachzuweisen war. So verringerte sich durch Natriumoxamat bzw. Galloflavin der Anteil vitaler Zellen um bis zu 45 % und durch Reversan um bis zu 60 % bei 5 % und 1 % Sauerstoff im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Auch unterschiedliche Kombination aus Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan führten zu einer Steigerung des antiproliferativen Effektes, der auch immer bei tumorphysiologischen Konzentrationen nachzuweisen war. Den stärksten antiproliferativen Effekt wies die Dreifachkombination aus Galloflavin, Natriumoxamat und Reversan auf. So verringerte sich der Anteil vitaler Zellen bei 1 % Sauerstoff durch diese Kombination auf bis zu 28 % bei vier der fünf kolorektalen Karzinomzelllinien. Die Dreifachkombination wies einen gleichstarken bzw. stärkeren antiproliferativen Effekt auf als das Chemotherapeutikum 5-FU und zwar ebenfalls bei 5 % und 1 % Sauerstoff.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum antiproliferativen Effekt von Natriumoxamat, Galloflavin (beides LDH-Inhibitoren) und Reversan (MRP1-Inhibitor) *in vitro* lassen den Schluss zu, dass das Konzept der Arbeit, einen antiproliferativen Effekt auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen zu induzieren, grundsätzlich bestätigt wurde. Auch löste die gemeinsame Hemmung von LDH und MRP1 einen teilweise stärkeren antiproliferativen Effekt aus als 5-FU. Weitere Untersuchungen sind aber ohne Frage nötig, um die molekulare Interaktion zwischen LDH und MRP1 sowie ihrer Inhibition im Detail zu verstehen.

## 8.2 Summary

---

The aim of the present study was to investigate the antiproliferative effect of the two lactate dehydrogenase (LDH) inhibitors sodium oxamate and galloflavin and the MRP1 inhibitor reversan at different oxygen concentrations *in vitro*. The inhibitors were used individually and in combination. In addition, the antiproliferative effect of the three inhibitors was compared with the antiproliferative effect of 5-FU.

The concept of this study is based on similarities between LDH and MRP1 in malignant cells: their overexpression by numerous tumors; their contribution to chemoresistance and their expression in hypoxia. In addition, the ATP necessary for the function of MRP1 is mainly formed in malignant cells by an increased turnover of the hyperactive glycolysis, which also depends on the LDH activity. Thus, a combined inhibition of both targets appears to inhibit tumor cell proliferation effectively. Since hypoxic or anoxic conditions prevail in large parts of solid tumors, the efficacy of the three inhibitors was also investigated at 5% and 1% oxygen, which are considered to be physiological for solid tumors.

The most important results of the study are that both sodium oxamate and galloflavin, as well as reversan trigger an antiproliferative effect in colorectal carcinoma cells, even in the presence of tumor physiological oxygen concentrations. For example, the proportion of viable cells decreased up to 45% with sodium oxamate or galloflavin and up to 60% with reversan, even at 5% and 1% oxygen compared to untreated control cells.

Different combinations of sodium oxamate, galloflavin and reversan resulted in enhanced antiproliferative effects, which were also demonstrated at tumor physiological oxygen concentrations. The strongest antiproliferative effects were observed with the triple combination of galloflavin, sodium oxamate and reversan. In this combination, the proportion of viable cells decreased to 28% at 1% oxygenation in four of the five colorectal carcinoma cell lines. The triple combination caused an antiproliferative ef-

fect that was equal to or even more potent than the antiproliferative effect of the chemotherapeutic agent 5-FU also at 5% and 1% oxygen.

The results of this study on the antiproliferative effect of sodium oxamate, galloflavin (both LDH inhibitors) and reversan (MRP1 inhibitor) *in vitro* seems to confirm the aim of the study, which was to induce an antiproliferative effect even in tumor physiological oxygen concentrations. In part, the combined inhibition of LDH and MRP1 caused a stronger antiproliferative effect than 5-FU. However, further investigations are necessary to comprehend the molecular interaction between LDH and MRP1 as well as its inhibition in detail.



## 9 Literaturverzeichnis

---

- Allison SJ, Knight JR, Granchi C, Rani R, Minutolo F, Milner J, Phillips RM. Identification of LDH-A as a therapeutic target for cancer cell killing via (i) p53/NAD(H)-dependent and (ii) p53-independent pathways. *Oncogenesis* 2014; 3: e102.
- Anderson AR, Weaver AM, Cummings PT, Quaranta V. Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell* 2006; 127 (5): 905-15
- Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2012; 5 (1): 19–27.
- Bailey KM, Wojtkowiak JW, Hashim AI, Gillies RJ. Targeting the metabolic microenvironment of tumors. *Adv Pharmacol* 2012; 65: 63-107.
- Balinsky D, Platz CE, Lewis JW. Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues. *Cancer Res* 1983; 43 (12 Pt 1): 5895-5901.
- Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. Heterogeneity of malignant cells from human colonic carcinoma. *Cancer Res.* 1981;41 (5):1751-1756.
- Burkhardt CA, Watt F; Murray J, Pajic M, Prokovlit A, Xue C, Flemming C, Smith J, Purmal A, Isachenko N, Komarov P, Gurova KV, Sartorelli AC, Marshall GM, Norris MD, Gudkov AV, Haber M. Small Molecule MRP1 Inhibitor Reversan Increases the Therapeutic Index of Chemotherapy in Mouse Model of Neuroblastoma. *Cancer Res* 2009; 69 (16): 6573–6580.
- Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013; 501 (7467): 338-45.
- Cai B, Chang SH, Becker EB, Bonni A, Xia Z. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem* 2006; 281 (35): 25215-22.
- Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973 (23):3099-108.

- Cole SP. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "multitasking" ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem* 2014(a); 289 (45): 30880-30888.
- Cole SP. Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1): past, present, and future. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2014(b); 54: 95-117.
- Colen CB, Seraji-Bozorgzad N, Marples B, Galloway MP, Sloan AE, Mathupala SP. Metabolic remodeling of malignant gliomas for enhanced sensitization during radiotherapy: an *in vitro* study. *Neurosurgery* 2006; 59 (6): 1313–1323.
- Cui H, Zhang AJ, Chen M, Liu JJ. ABC Transporter Inhibitors in Reversing Multidrug Resistance to Chemotherapy. *Curr Drug Targets* 2015; 16 (12): 1356-71.
- Dalleau S, Baradat M, Guéraud F, Huc L. (2013). Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. *Cell Death Differ* 2013; 20 (12): 1615-30
- Dashty M. A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin Biochem.* 2013; 46 (15), 1339-1352.
- Draoui N, Feron O. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Dis Model Mech* 2011; 4 (6): 727-32.
- Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest.* 2013; 123 (9): 3685-3692.
- Fantin VR, Leder P. Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy. *Oncogene* 2006; 25 (34): 4787-4797.
- Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006; 9 (6): 425-34.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61 (5): 759-67.
- Fenton BM, Paoni SF, Beauchamp BK, Ding I. Zonal image analysis of tumour vascular perfusion, hypoxia, and necrosis. *Br J Cancer* 2002; 86 (11): 1831–1836.
- Fogh J, Trempe G. 1975. New human tumor cell lines. Plenum Publishing Corp., New York. 1975; 115-141.

Franco R, Cidlowski JA. Glutathione Efflux and Cell Death. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17 (12): 1694–1713.

Garber K. Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 2006; 312 (5777): 1158-9.

Gerlinger M, Swanton S. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer* 2010; 103 (8): 1139–1143.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366: 883-892.

Goldberg EB, Nitowsky HM, Colowick SE. The role of glycolysis in the growth of tumor cells. IV. The basis of glucose toxicity in oxamate-treated, cultured cells. *J Biol Chem* 1965; 240: 2791-6.

Gordillo GM, Biswas A, Khanna S, Spieldenner JM, Pan X, Sen CK. Multidrug Resistance-associated Protein-1 (MRP-1)-dependent Glutathione Disulfide (GSSG) Efflux as a Critical Survival Factor for Oxidant-enriched Tumorigenic Endothelial Cells. *J Biol Chem* 2016; 291 (19):10089-103.

Granchi C, Calvaresi EC, Tuccinardi T, Paterni I, Macchia M, Martinelli A, Hergenrother PJ, Minutolo F. Assessing the differential action on cancer cells of LDH-A inhibitors based on the N-hydroxyindole-2-carboxylate (NHI) and malonic (Mal) scaffolds. *Org Biomol Chem* 2013(a); 11 (38): 6588-96.

Granchi C, Paterni I, Rani R, Minutolo F. Small-molecule inhibitors of human LDH5. *Future Med Chem* 2013(b); 5 (16): 1967–1991.

Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, Roth A, Schmoll HJ, Tveit KM, Gibson F. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2015; 14 (1): 1-10.

Hagan S, Orr M, Doyle B. Targeted therapies in colorectal cancer—an integrative view by PPPM. *EPMA J* 2013; 4 (1): 3.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100 (1): 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144 (5): 646-74.

- Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Sschnitzer RJ, Plevin E, Scheiner J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 1957; 179 (4561): 663–666.
- Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461 (2): 359-76.
- Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R, Liska V, Pitule P, Novak P, Bruha J, Vycital O, Holubec L, Treska V, Vodicka P, Soucek P. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* 2012; 27 (2): 187-96.
- Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93 (4): 266-276.
- Ioannou M, Paraskeva E, Baxevanidou K, Simos G, Papamichali R, Papacharalambous C, Samara M, Koukoulis G. HIF-1 $\alpha$  in colorectal carcinoma: review of the literature. *J BUON* 2015; 20 (3): 680-9.
- Jang M, Kim SS, Lee J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Exp Mol Med* 2013; 45: e45.
- Jiang BH, Semenza GL, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol* 1996; 271 (4 Pt 1): C1172-1180.
- Kallinowski F, Zander R, Hoeckel M, Vaupel P. Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized-pO<sub>2</sub>-histography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19 (4): 953-961.
- Kanno T, Sudo K, Maekawa M, Nishimura Y, Ukita M, Fukutake K. Lactate dehydrogenase M-subunit deficiency: a new type of hereditary exertional myopathy. *Clin Chim Acta* 1988; 173 (1): 89-98.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis V, Gatter KC, Harris AL; Tumour and Angiogenesis Research Group. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 2003; 89 (5): 877-885.

- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: A metabolic survival role of tumor-associated stroma. *Cancer Res* 2006; 66 (2): 632-7.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Trarbach T, Folprecht G, Shi MM, Lebowitz D, Jalava T, Laurent D, Meinhardt G, Harris AL. Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17 (14): 4892-4900.
- Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107 (5): 2037-42
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204 (3): 216-37.
- 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): 1710-8.
- Li X, Zhao H, Zhou X, Song L. Inhibition of lactate dehydrogenase A by microRNA-34a resensitizes colon cancer cells to 5-fluorouracil. *Molecular Medicine Reports* 2015; 11 (1); 577-582.
- Lloyd MC, Cunningham JJ, Bui MM, Gillies RJ, Brown JS, Gatenby RA. Darwinian Dynamics of Intratumoral Heterogeneity: Not Solely Random Mutations but Also Variable Environmental Selection Forces. *Cancer Res* 2016; 76 (11): 3136-44
- Locasale JW, Cantley LC. Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab.* 2011; 14 (4), 443-451.
- Lopci E, Grassi I, Chiti A, Nanni C, Cicoria G, Toschi L, Fonti C, Lodi F, Mattioli S, Fanti S. PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2014; 4 (4): 365-84

- Lu JF, Pokharel D, Bebawy M. MRP1 and its role in anticancer drug resistance. *Drug Metab Rev* 2015; 47 (4): 406-19
- Lv Y, Zhao S, Han J, Zheng L, Yang Z, Zhao L. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induces multi-drug resistance protein in colon cancer. *Onco Targets Ther* 2015; 8: 1941-8
- Manerba M, Vettraino M, Fiume L, Di Stefano G, Sartini A, Giacomini E, Buonfiglio R, Roberti M, Recanatini M. Galloflavin (CAS 568-80-9): a novel inhibitor of lactate dehydrogenase. *ChemMedChem* 2012; 7 (2): 311-7
- Mankoff DA, Eary JF, Link JM, Muzi M, Rajendran JG, Spence AM, Krohn KA. Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F] fluorodeoxyglucose and beyond. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (12): 3460-9.
- Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1805 (1): 105-17.
- McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *Br J Radiol* 2014; 87 (1035): 20130676.
- Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* 2013; 65 (11): 904-10.
- Milane L, Duan Z, Amiji M. Role of hypoxia and glycolysis in the development of multi-drug resistance in human tumor cells and the establishment of an orthotopic multi-drug resistant tumor model in nude mice using hypoxic pre-conditioning. *Cancer Cell Int* 2011; 11: 3.
- Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life* 2007; 59 (12): 752-7.
- Murono K, Tsuno NH, Kawai K, Sasaki K, Hongo K, Kaneko M, Hiyoshi M, Tada N, Nirei T, Sunami E, Takahashi K, Kitayama J. SN-38 overcomes chemoresistance of colorectal cancer cells induced by hypoxia, through HIF1 $\alpha$ . *Anticancer Res* 2012; 32 (3): 865-72.
- Nakano A, Tsuji D, Miki H, Cui Q, Sayed SME, Ikegame A. Glycolysis Inhibition Inactivates ABC Transporters to Restore Drug Sensitivity in Malignant Cells. *PLoS ONE* 2011; 6 (11): e27222.

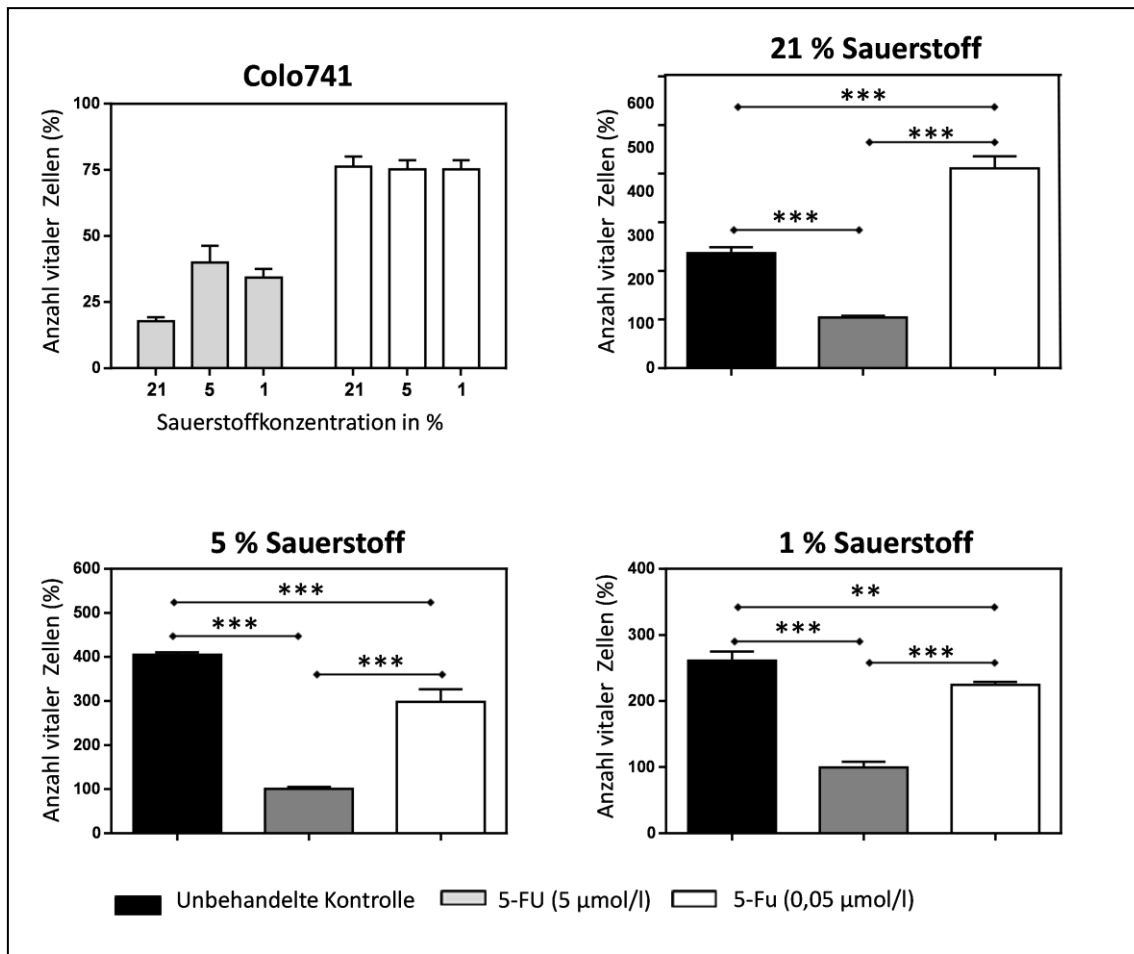
- Novoa WB, Winer AD, Glaid AJ, Schwert GW. Lactic dehydrogenase. V. Inhibition by oxamate and by oxalate. *J Biol Chem* 1959; 234 (5): 1143-8.
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23–28.
- Pasteur L. Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygene libre et determinant des fermentations. *Compt Rend Acad Sci* 1861; 52: 344-347.
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25 (34): 4633-46.
- Piñeiro R, Maffucci T, Falasca M. The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene* 2011; 30 (2): 142-52.
- Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P. Anticancer Targets in the Glycolytic Metabolism of Tumors: A Comprehensive Review. *Front Pharmacol* 2011; 2: 49.
- Pox C, Aretz S, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heußner P, Hohenberger W. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0 – Juni 2013 AWMF-Registernummer: 021/007OL. *Gastroenterol* 2013; 51 (8): 753-854
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2011/2012*, 10. Ausgabe. Berlin, 2015.
- Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem* 2009; 107 (6): 1053-62.
- Strese S, Fryknas M, Larsson R, Gullbo J. Effects of hypoxia on human cancer cell line chemosensitivity. *BMC Cancer* 2013; 13 (331).
- Teicher BA, Holden SA, al-Achi A, Herman TS. Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSaIIc murine fibrosarcoma. *Cancer Res* 1990; 50 (11): 3339-3344.
- Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10(4), 267-277.

- Thornburg JM, Nelson KK, Clem BF, Lane AN, Arumugam S, Simmons A, Eaton JW, Telang S, Chesney J. Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008; 10 (5): R84
- Tivnan A, Zakaria Z, O'Leary C, Kögel D, Pokorny JL, Sarkaria JN, Prehn JH. Inhibition of multidrug resistance protein 1 (MRP1) improves chemotherapy drug response in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *Front Neurosci* 2015; 9:218
- Tom BH, Rutzky LP, Jakstys MM, Oyasu, Kaye CI, Kahan BD. Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In vitro* 1976; 12 (3): 180-191.
- Valvona CJ, Fillmore HL, Nunn PB, Pilkington GJ. The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathol* 2015; 26 (1): 3-17
- 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 and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus Clin Biol* 2005; 12 (1): 5-10.
- Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26 (2): 225-239.
- Warburg O, Minami S. Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. *Klin Wochenschr* 1923; 2 (17): 776-777.
- Wittekind C, Meyer HJ. *TNM Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage.* Wiley-VCH, Weinheim, 2010.
- 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): 2983-91.
- Zhao Y, Liu H, Liu Z, Ding Y, Ledoux SP, Wilson GL, Voellmy R, Lin Y, Lin W, Nahta R, Liu B, Fodstad O, Chen J, Wu Y, Price JE, Tan M. Overcoming trastuzumab resistance in breast cancer by targeting dysregulated glucose metabolism. *Cancer Res* 2011; 71 (13): 4585-97.

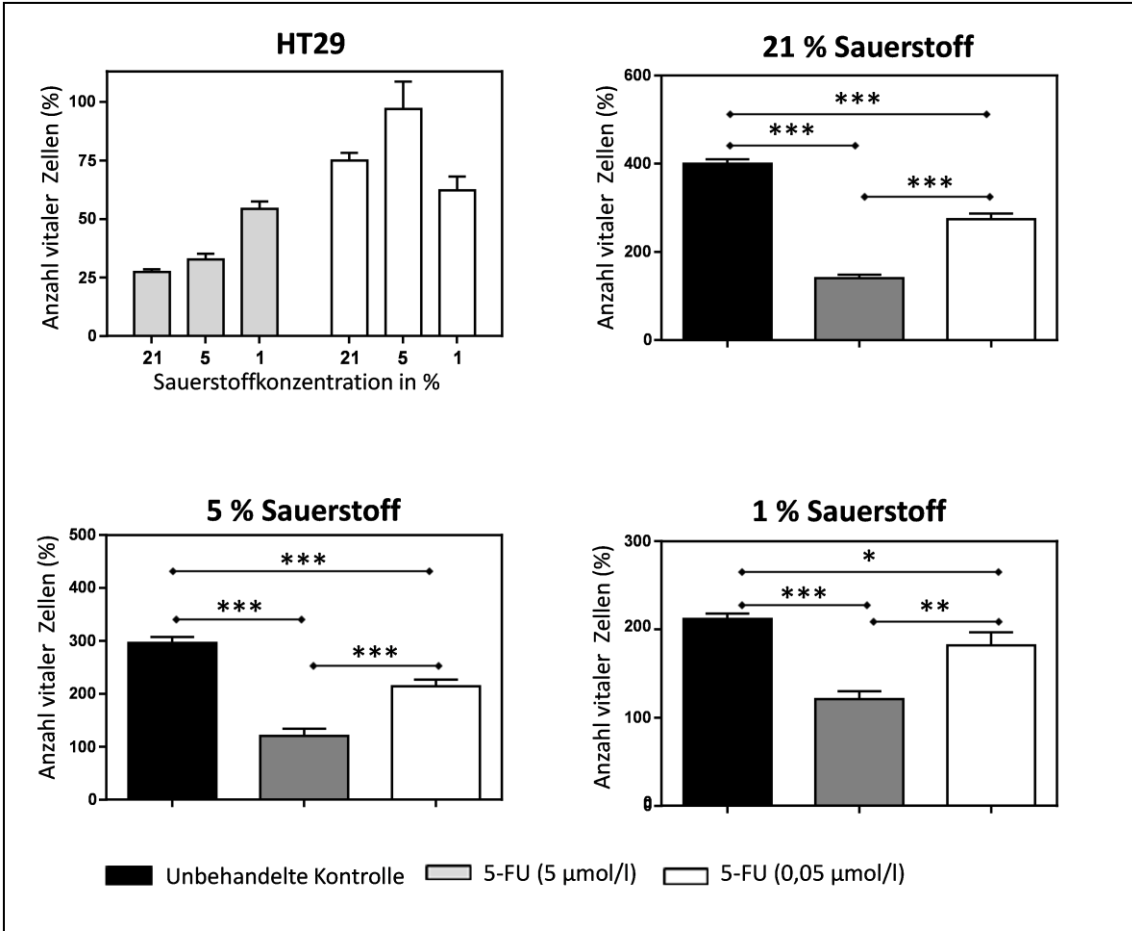


Zhou M, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Liu Z, Fodstad O, Riker AI, Kamarajugadda S, Lu J, Owen LB, Ledoux SP, Tan M. Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Mol Cancer* 2010; 9: 33.

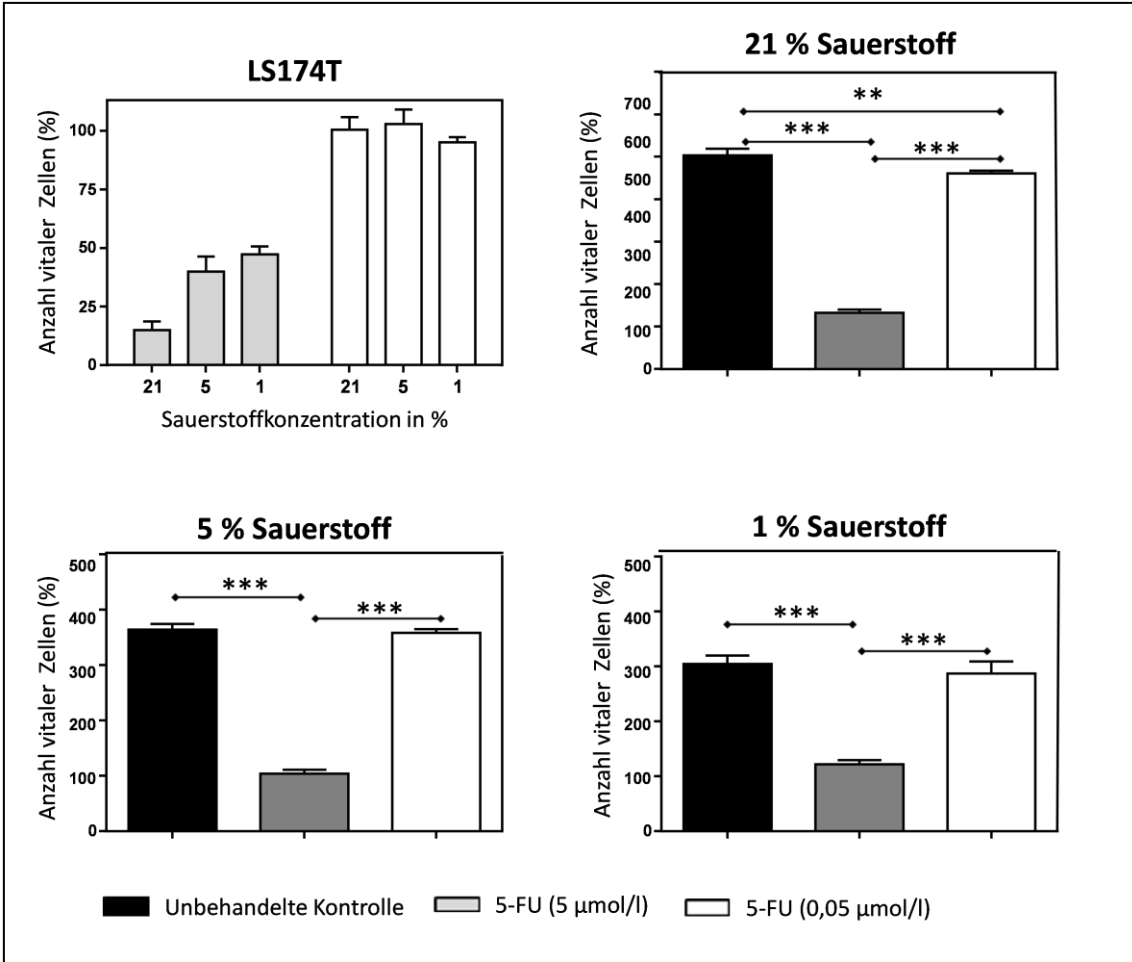
## 10 Appendix



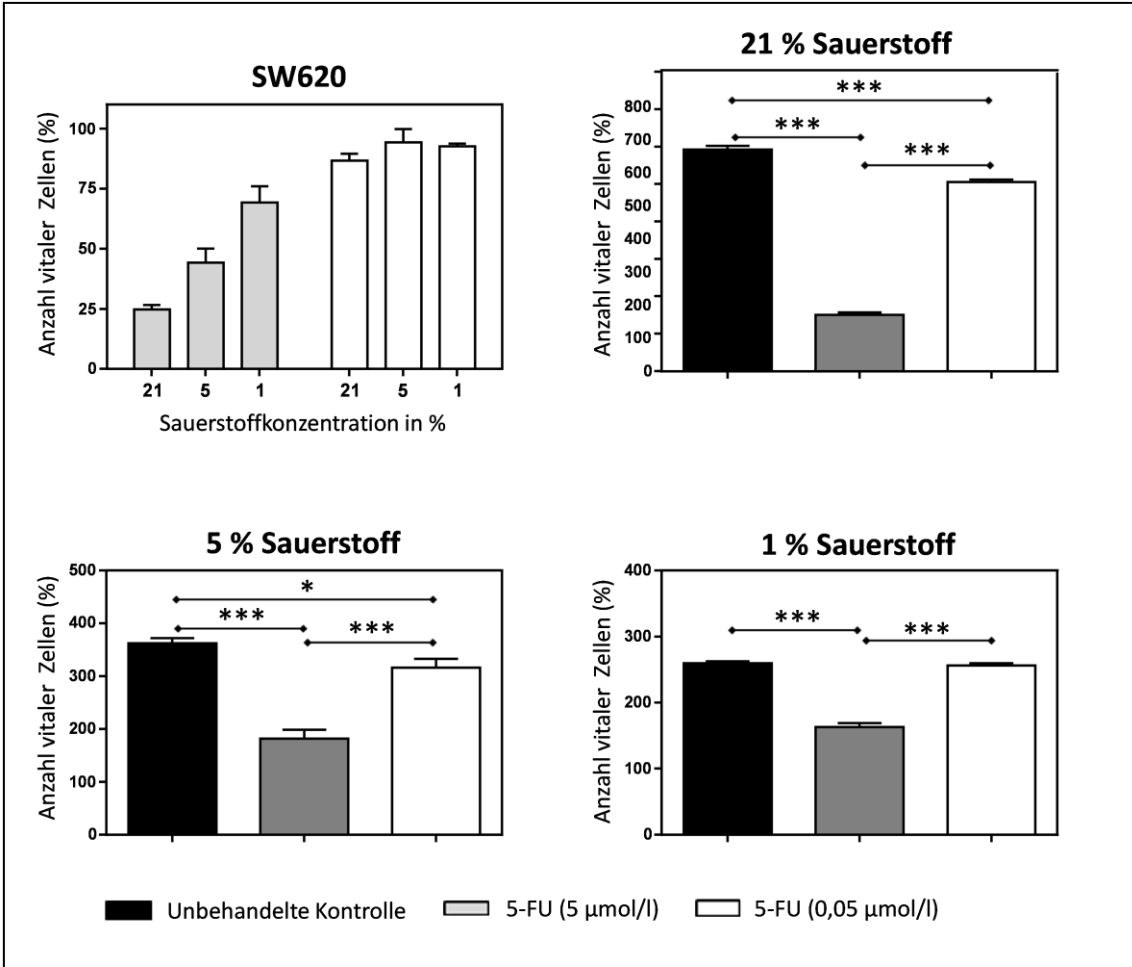
**Abbildung 10.1: Der antiproliferative Effekt von 5-FU bei Colo741 Zellen basiert auf Zytostase (in Ergänzung zu Abb. 4.5).** Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat (=100 %) normalisiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .



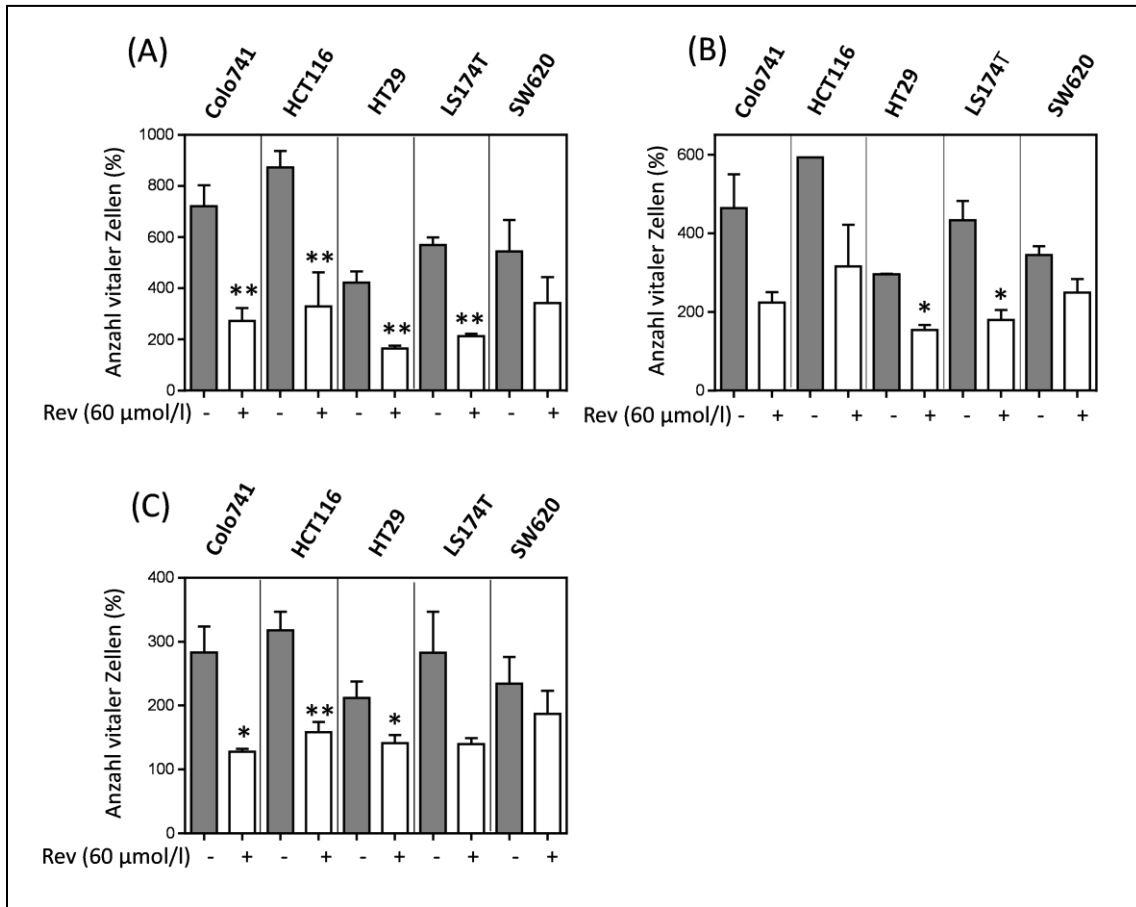
**Abbildung 10.2: Der antiproliferative Effekt von 5-FU bei HT29 Zellen basiert auf Zytostase (in Ergänzung zu Abb. 4.5).** Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat (=100 %) normalisiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .



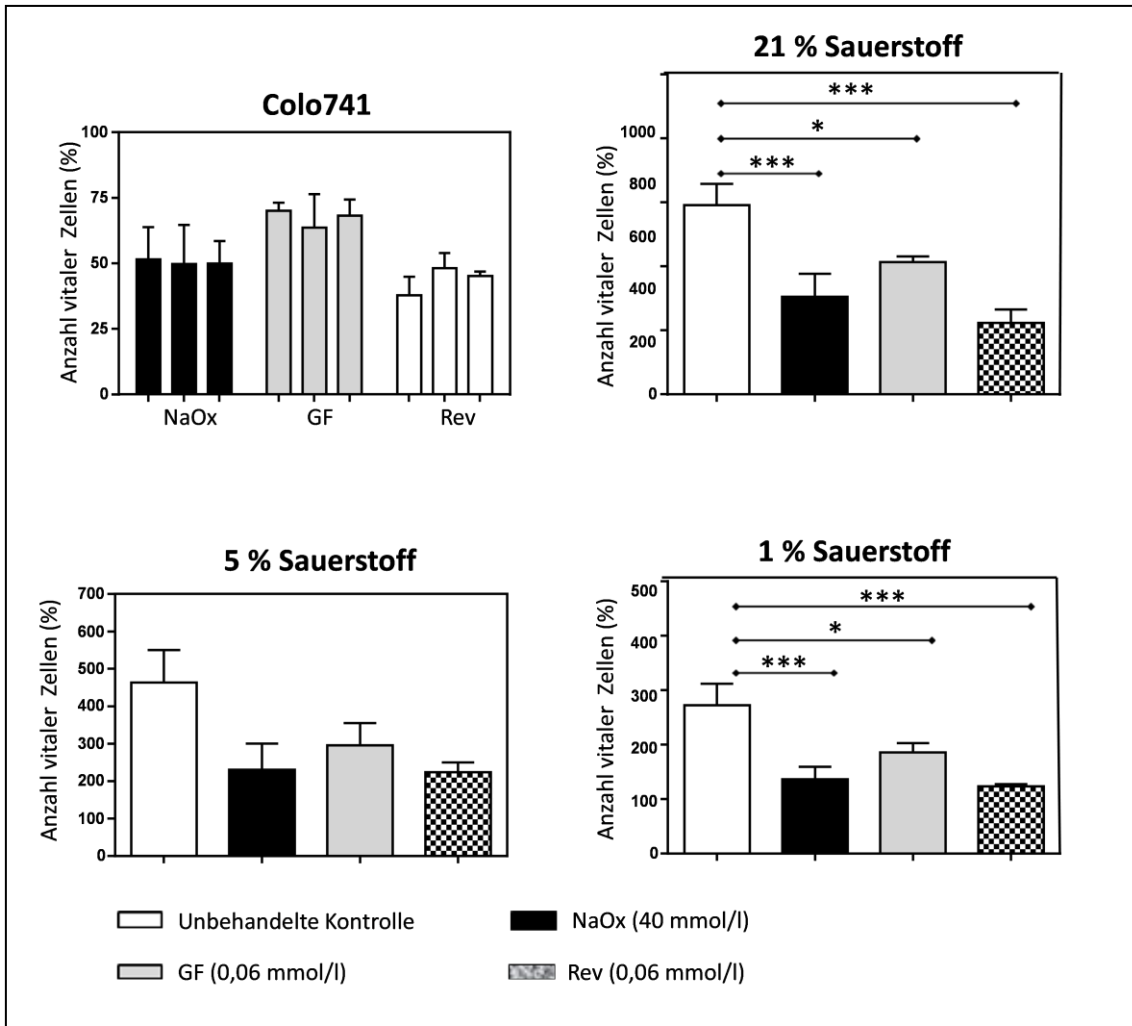
**Abbildung 10.3: Der antiproliferative Effekt von 5-FU bei LS174T Zellen basiert auf Zytostase (in Ergänzung zu Abb. 4.5).** Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat (=100 %) normalisiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .



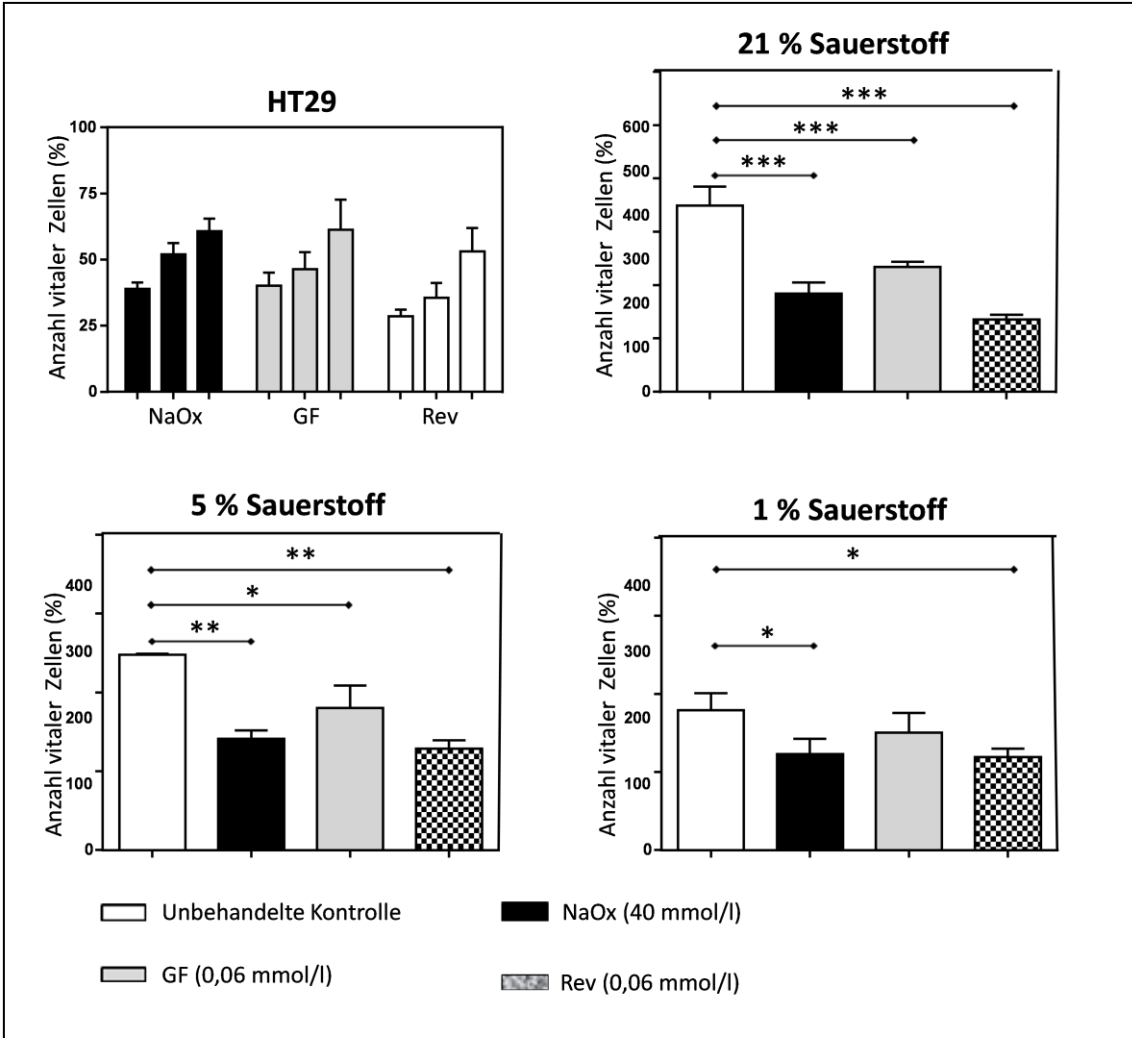
**Abbildung 10.4: Der antiproliferative Effekt von 5-FU bei SW620 Zellen basiert auf Zytostase (in Ergänzung zu Abb. 4.5).** Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat (=100 %) normalisiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .



**Abbildung 10.5: Der antiproliferative Effekt von Reversan bei 21 % (A), 5 % (B) und 1 % (C) Sauerstoff (in Ergänzung Abb. 4.7).** In dieser Darstellung ist der antiproliferative Effekt von Reversan auf die Ausaat (=100 %) normiert worden. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

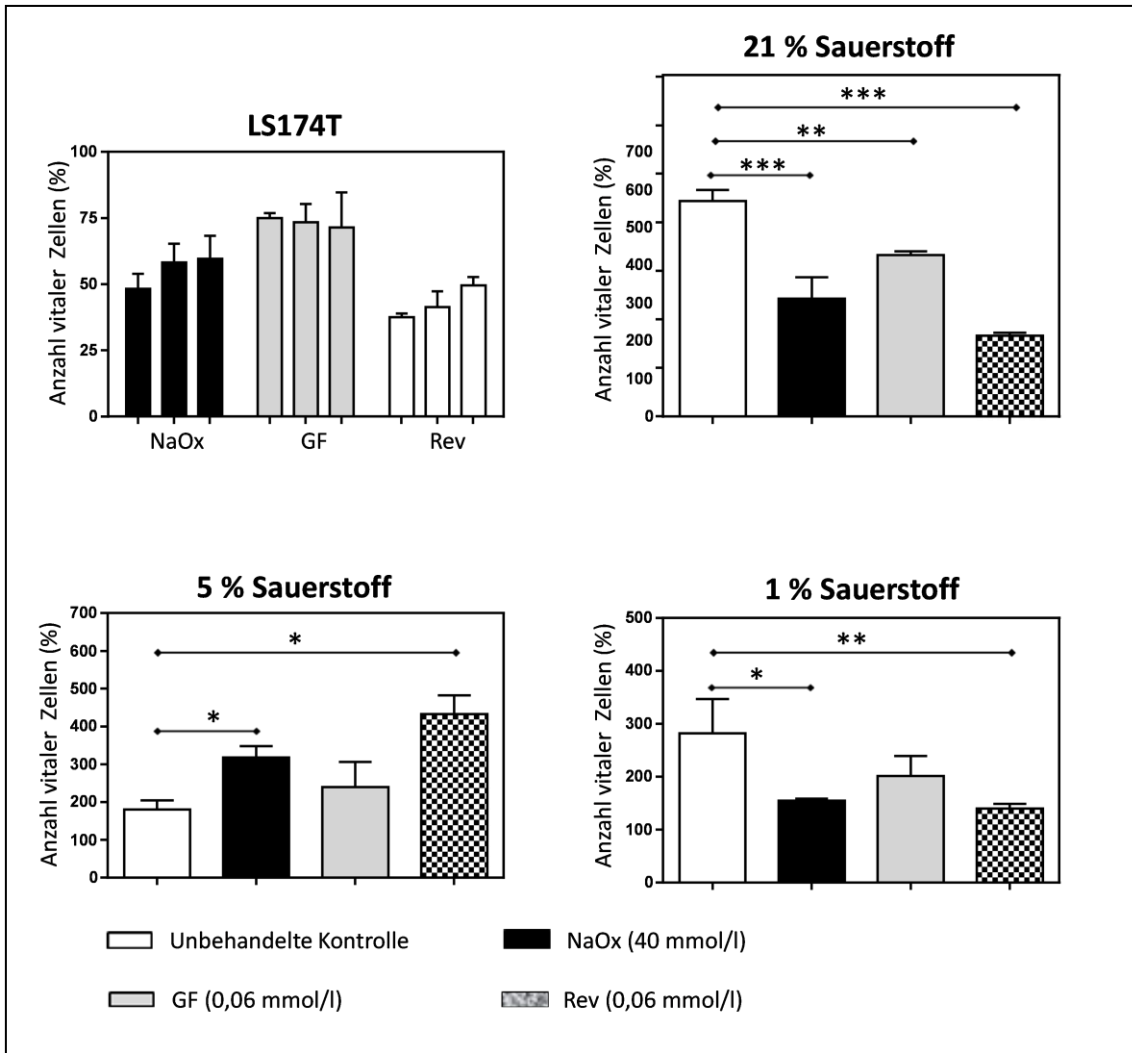


**Abbildung 10.6:** Der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat (NaOx), Galloflavin (GF) und Reversan (Rev) basiert bei Colo741 Zellen auf Zytostase (in Ergänzung zu Abb. 4.8). Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat (=100 %) normiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

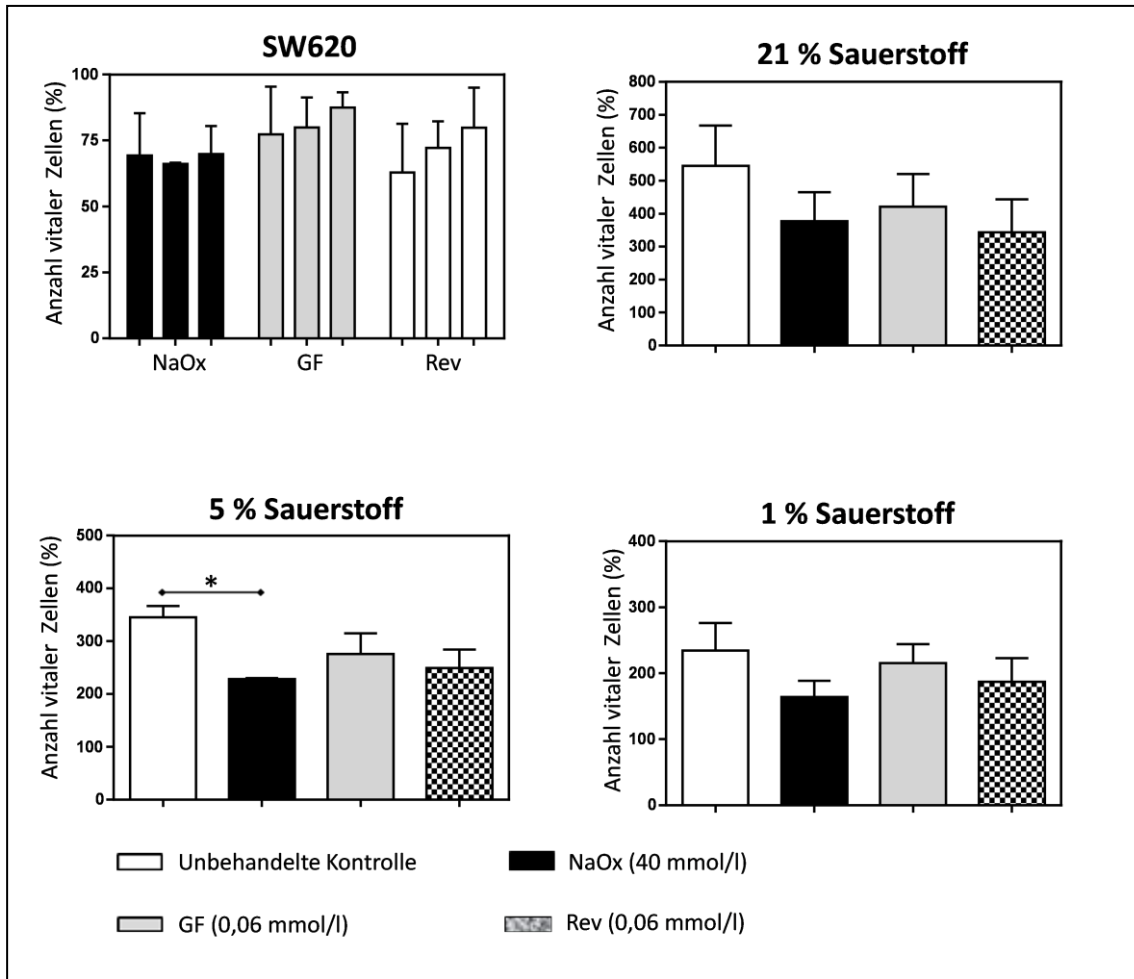


**Abbildung 10.7:** Der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat (NaOx), Galloflavin (GF) und Reversan (Rev) basiert bei HT29 Zellen auf Zytostase (in Ergänzung zu Abb. 4.8). Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat (=100 %) normiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

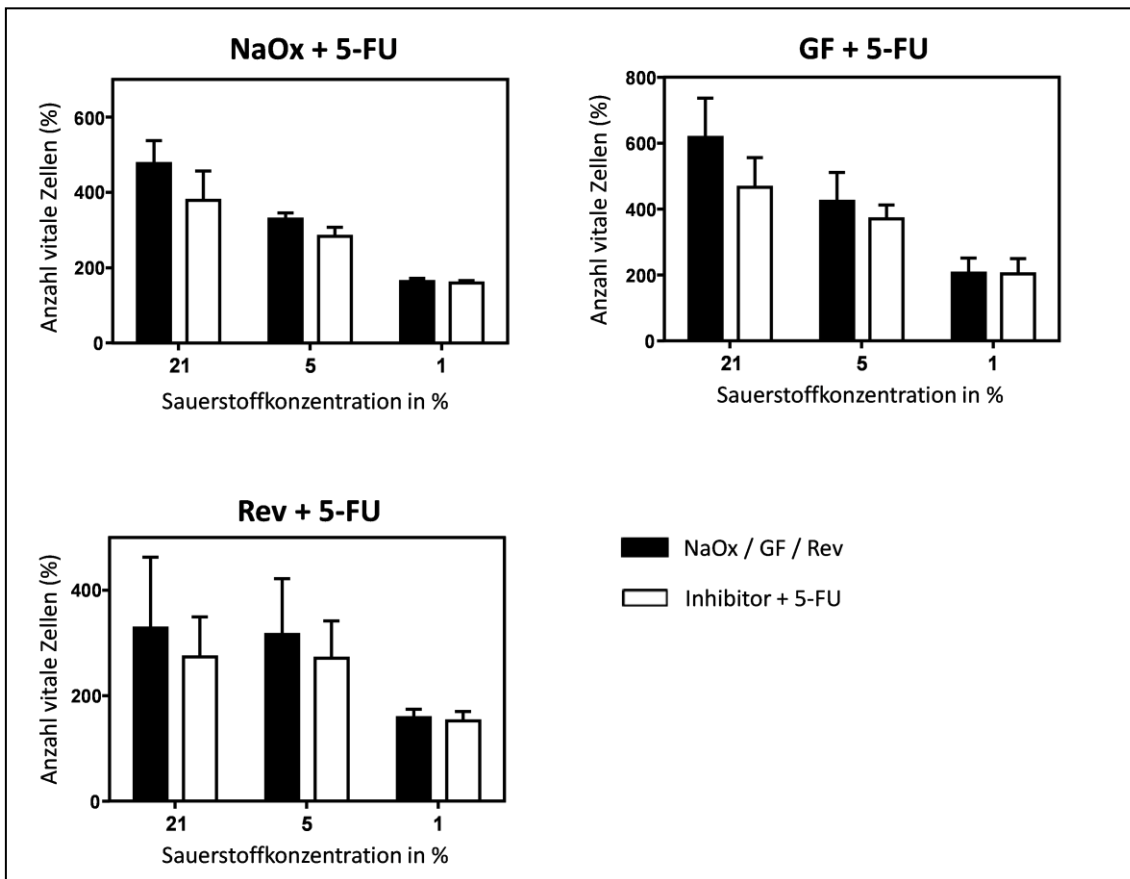




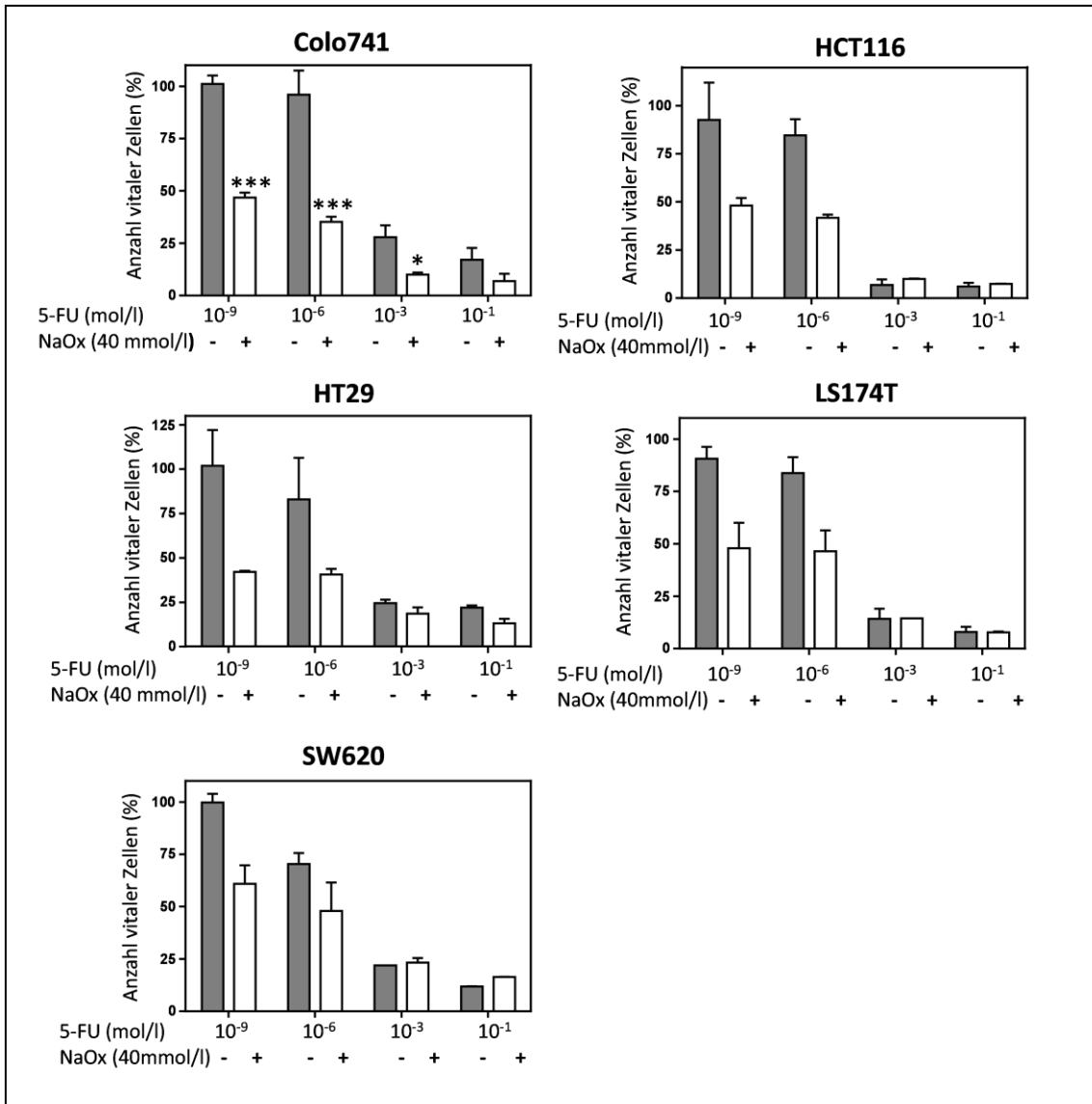
**Abbildung 10.8: Der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat (NaOx), Galloflavin (GF) und Reversan (Rev) basiert bei LS174T Zellen auf Zytostase (in Ergänzung zu Abb. 4.8). Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat (=100 %) normiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .**



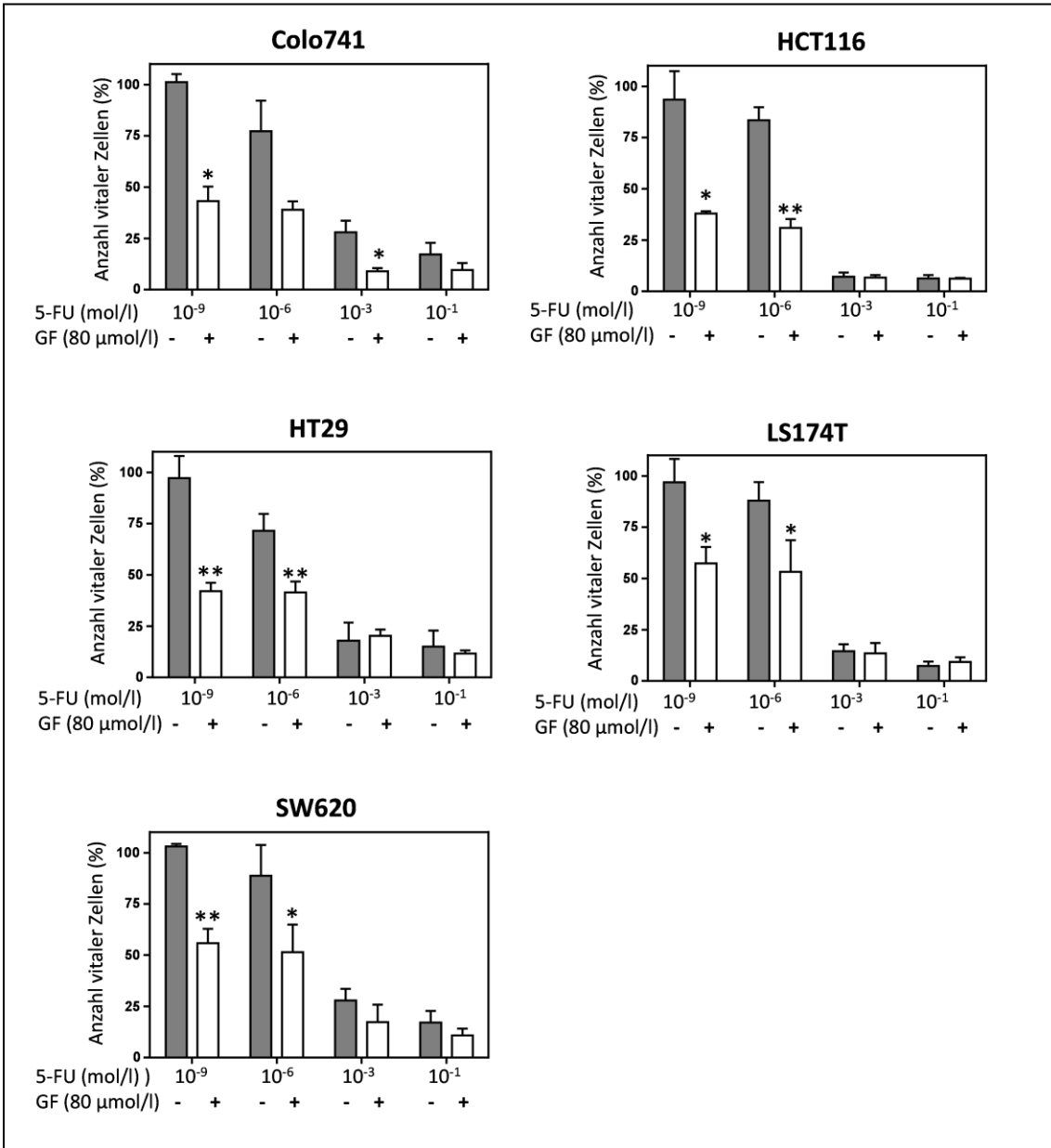
**Abbildung 10.9:** Der antiproliferative Effekt von Natriumoxamat (NaOx), Galloflavin (GF) und Reversan (Rev) basiert bei SW620 Zellen auf Zytostase (in Ergänzung zu Abb. 4.8). Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat (=100 %) normiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \*  $p \leq 0,05$ .



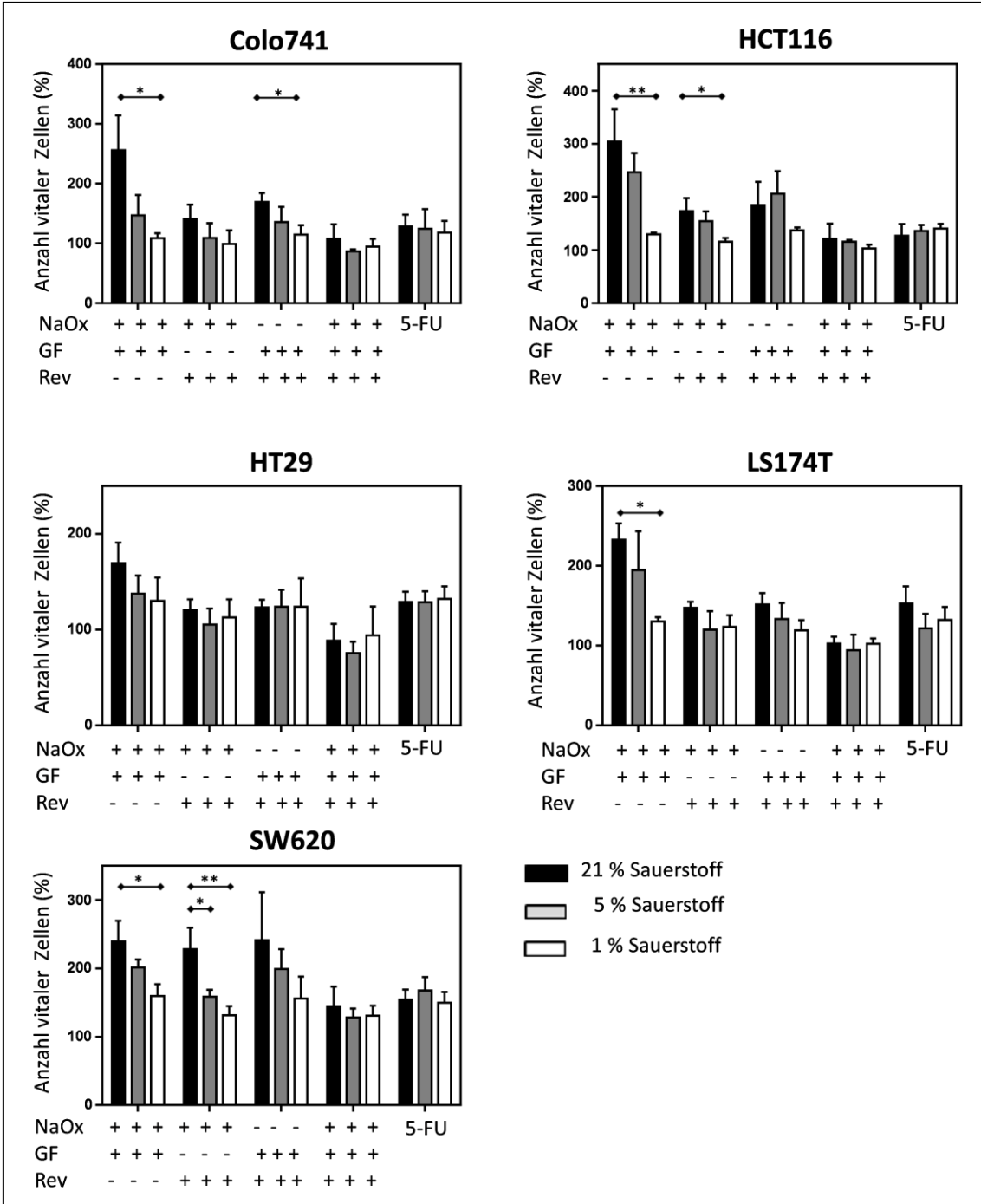
**Abbildung 10.10: Der antiproliferative Effekt der Inhibitoren Natriumoxamat, Galloflavin und Reversan wird nicht durch 0,05  $\mu\text{mol/l}$  5-FU verstärkt.** Folgende Konzentrationen an Inhibitor wurden eingesetzt: 40 mmol/l Natriumoxamat (NaOx), 60  $\mu\text{mol/l}$  Galloflavin (GF), 60  $\mu\text{mol/l}$  Reversan (Rev) und 0,05  $\mu\text{mol/l}$  5-FU. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat berechnet (=100 %). Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben.



**Abbildung 10.11: Natriumoxamat (NaOx) verstärkt den antiproliferativen Effekt von 5-FU (in Ergänzung zu Abb. 4.9).** Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 21 % Sauerstoff mit den angegebenen Konzentrationen an 5-FU und NaOx inkubiert. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle (=100 %) berechnet. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \* p≤0,05; \*\*\* p≤0,001 im Vergleich zu 5-FU.



**Abbildung 10.12: Galloflavin (GF) verstärkt den antiproliferativen Effekt von 5-FU (in Ergänzung zu Abb. 4.9).** Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 21 % Sauerstoff inkubiert. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle (=100 %) berechnet. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \* p<0,05; \*\* p<0,01 im Vergleich zu 5-FU.



**Abbildung 10.13: Der antiproliferative Effekt unterschiedlicher Kombinationen der drei Inhibitoren im Vergleich zum antiproliferativen Effekt von 5-FU bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen.** Konzentrationen an Inhibitor waren: 40 mmol/l Natriumoxamat (NaOx), 60 µmol/l Galloflavin (GF) und 60 µmol/l Reversan (Rev). Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die Aussaat (=100 %) prozentual berechnet. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung für mindestens drei unabhängige Versuche angegeben. \* p≤0,05; \*\* p≤0,01

**Tabelle 10.1: Natriumoxamat (NaOx) verstärkt den antiproliferativen Effekt (angegeben als IC<sub>50</sub> in nmol/l) von 5-FU (in Ergänzung zu Tabelle 4.4).** Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 21 % Sauerstoff inkubiert. Zu jeder Konzentrationsstufe an 5-FU (von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-9</sup> mol/l) wurden 20, 40, 60 oder 80 mmol/l NaOx zugegeben und hierfür der IC<sub>50</sub> mit dem Biostatistikprogramm GraphPad Prism berechnet. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle (=100 %) berechnet. Die IC<sub>50</sub> Werte sind als Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall [in Klammern] für jeweils drei unabhängige Versuche angeben. (---) nicht durchgeführt. Die Ergebnisse mit 40 mmol/l NaOx sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

5-FU (10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-9</sup> mol/l) plus	Colo741	HCT116	HT29	LS174T	SW620
20 mmol/l NaOx	1,5 [0,5-38]	2,0 [0,9-4,4]	2,6 [0,6-11]	8,3 [3,6-19]	12,0 [6-25]
60 mmol/l NaOx	3,5 [0,6-21]	8,2 [1,1-62]	7,0 [0,8-60]	10 [1,4-72]	---
80 mmol/l NaOx	2,2 [0,4-11]	2,7 [0,4-16]	4,7 [0,5-46]	4,2 [0,7-28]	5,9 [0,6-54]

**Tabelle 10.2: Galloflavin (GF) verstärkt den antiproliferativen Effekt (angegeben als IC<sub>50</sub> in nmol/l) von 5-FU (in Ergänzung zu Tabelle 4.5).** Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 21 % Sauerstoff inkubiert. Zu jeder Konzentrationsstufe an 5-FU (von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-9</sup> mol/l) wurden 20, 40 oder 60 µmol/l GF zugegeben und hierfür der IC<sub>50</sub> mit dem Biostatistikprogramm GraphPad Prism berechnet. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle (=100 %) berechnet. Die IC<sub>50</sub> Werte sind als Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall [in Klammern] für jeweils drei unabhängige Versuche angeben.

5-FU (10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-9</sup> mol/l) plus	Colo741	HCT116	HT29	LS174T	SW620
20 µmol/l GF	2,7 [0,7-10]	1,1 [0,5-2,8]	8,2 [4,3-16]	2,4 [1,2-5]	3,5 [1,3-10]
40 µmol/l GF	0,5 [0,1-1,9]	0,9 [0,3-2,4]	4,8 [1,9-12]	2,8 [1,2-6,6]	2,3 [0,9-6]

**Tabelle 10.3: Reversan (Rev) verstärkt den antiproliferativen Effekt (angegeben als IC<sub>50</sub> in nmol/l) von 5-FU (in Ergänzung zu Tabelle 4.5).** Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 21 % Sauerstoff inkubiert. Zu jeder Konzentrationsstufe an 5-FU (von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-9</sup> mol/l) wurden 20, 40 oder 60 µmol/l Rev zugegeben und hierfür der IC<sub>50</sub> mit dem Biostatistikprogramm GraphPad Prism berechnet. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle (=100 %) berechnet. Die IC<sub>50</sub> Werte sind als Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall [in Klammern] für jeweils drei unabhängige Versuche angeben.

5-FU (10 <sup>-1</sup> bis 10 <sup>-9</sup> mol/l) plus	Colo741	HCT116	HT29	LS174T	SW620
20 µmol/l Rev	0,4 [0,2-0,7]	1,3 [0,8-2,3]	1,6 [0,7-3,7]	1,4 [0,7-3,1]	5,5 [0,8-38]
40 µmol/l Rev	0,006 [0,003-0,01]	0,009 [4,3-17]	0,5 [176-1284]	0,6 [245-1239]	25 [1,7-358]
60 µmol/l Rev	0,001 [0,0001-0,002]	0,001 [0,5-2,0]	0,01 [4,5-29,0]	0,024 [7,1-43,0]	2,4 [0,3-22]

**Tabelle 10.4: Reversan verstärkt den antiproliferativen Effekt von 5-FU bei 21 % Sauerstoff (in Ergänzung zu Abb. 10.10).** Hierzu wurde der Wirksamkeits-Index berechnet, der das Verhältnis aus Anzahl vitaler Zellen für 5-FU (10<sup>-9</sup>; 10<sup>-6</sup>; 10<sup>-3</sup> und 10<sup>-1</sup> mol/l) und 5-FU plus Reversan (60 µmol/l) angibt. Eine Zahl kleiner 1 bedeutet für, dass die Zugabe von Reversan zu 5-FU keinen zusätzlichen antiproliferativen Effekt induziert. Eine Zahl größer 1 bedeutet, dass der antiproliferative Effekt von 5-FU durch Zugabe des Inhibitors größer wird.

Zelllinie	5-FU (10 <sup>-9</sup> mol/l) plus Reversan	5-FU (10 <sup>-6</sup> mol/l) plus Reversan	5-FU (10 <sup>-3</sup> mol/l) plus Reversan	5-FU (10 <sup>-1</sup> mol/l) plus Reversan
Colo741	2,5	2,7	1,2	1,0
HCT116	2,5	3,1	0,6	0,5
HT29	1,7	1,6	0,8	0,8
LS174T	1,9	1,8	0,9	0,8
SW620	1,6	1,2	1,0	0,9



**Tabelle 10.5: Natriumoxamat (NaOx) verstärkt den antiproliferativen Effekt von 5-FU bei 21 % Sauerstoff (in Ergänzung zu Abb. 10.2)** Hierzu wurde der Wirksamkeits-Index berechnet, der das Verhältnis aus Anzahl vitaler Zellen für 5-FU ( $10^{-9}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  mol/l) und 5-FU plus Natriumoxamat (40 mmol/l) angibt. Eine Zahl kleiner 1 bedeutet für, dass die Zugabe von NaOx zu 5-FU keinen zusätzlichen antiproliferativen Effekt induziert. Eine Zahl größer 1 bedeutet, dass der antiproliferative Effekt von 5-FU durch Zugabe des Inhibitors größer wird.

Zelllinie	5-FU ( $10^{-9}$ mol/l) plus NaOx	5-FU ( $10^{-6}$ mol/l) plus NaOx	5-FU ( $10^{-3}$ mol/l) plus NaOx	5-FU ( $10^{-1}$ mol/l) plus NaOx
Colo741	2,1	2,7	2,8	2,4
HCT116	2,0	2,0	0,7	0,9
HT29	2,4	2,0	1,3	1,7
LS174T	1,9	1,8	1,0	1,0
SW620	1,6	1,5	1,0	0,8

**Tabelle 10.6: Galloflavin verstärkt den antiproliferativen Effekt von 5-FU bei 21 % Sauerstoff.** Hierzu wurde der Wirksamkeits-Index berechnet, der das Verhältnis aus Anzahl vitaler Zellen für 5-FU ( $10^{-9}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-3}$  und  $10^{-1}$  mol/l) und 5-FU plus Galloflavin (80  $\mu$ mol/l) angibt. Eine Zahl kleiner 1 bedeutet, dass die Zugabe von Galloflavin zu 5-FU keinen zusätzlichen antiproliferativen Effekt induziert. Eine Zahl größer 1 bedeutet, dass der antiproliferative Effekt von 5-FU durch Zugabe des Inhibitors größer wird.

Zelllinie	5-FU ( $10^{-9}$ mol/l) plus Galloflavin	5-FU ( $10^{-6}$ mol/l) plus Galloflavin	5-FU ( $10^{-3}$ mol/l) plus Galloflavin	5-FU ( $10^{-1}$ mol/l) plus Galloflavin
Colo741	2,3	2,0	3,1	1,7
HCT116	2,5	2,7	1,0	1,0
HT29	2,3	1,7	0,9	1,3
LS174T	1,7	1,7	1,0	0,8
SW620	1,8	1,7	1,6	1,5

#### **Berechnung der Verdopplungszeit zu Tabelle 4.1.**

Die Verdopplungszeit wurde wie folgt berechnet:  $(\log(2) \cdot \Delta t) / (\log(N_1) - \log(N_0))$ .  $\Delta t$  entspricht der zeitlichen Differenz (in Tagen) zwischen Beginn ( $t_0$ ) und Ende ( $t_1$ ) der Wachstumsversuche (sie betrug drei Tage);  $N_0$  entspricht der photometrisch bestimmten OD (optical density) bei  $t_0$  (=Aussaat);  $N_1$  entspricht der photometrisch bestimmten OD bei  $t_1$ .

## Eidesstattliche Erklärung

---

### Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Antiproliferative effects of multidrug resistance protein 1 (MRP1) inhibitor Reversan and lactate dehydrogenase (LDH) inhibitors Natriumoxamat and Galloflavin in human colorectal cells exposed to oxygen levels characteristic for tumor oxygenation” 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

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Der antiproliferative Effekt des *Multidrug resistance*-Protein 1 (MRP1)-Inhibitors Reversan und der Laktatdehydrogenase (LDH)-Inhibitoren Natriumoxamat und Galloflavin an kolorektalen Karzinomzellen bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig 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 vorgelegt hat.

Ort, Datum

Unterschrift

## Danksagung

---

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph-Thomas Germer, Direktor der Chirurgischen Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die finanzielle Unterstützung der Promotionsarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat Christoph Otto, Leiter der Experimentellen Chirurgie der Chirurgischen Klinik I und Projektleiter der Arbeitsgruppe „Tumorstoffwechsel, - wachstum und –ernährung“, für die Überlassung des Themas und für die umfassende und unermüdliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft in den letzten Jahren. Dank seiner Erfahrung, der vielen interessanten Diskussionen und der Motivation zu Eigeninitiative und Verantwortung habe ich viele wertvolle Erfahrungen in Bezug auf das wissenschaftliche Arbeiten sammeln dürfen. Dafür bin ich ihm und seinem Team besonders dankbar.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer und Frau Michaela Kapp, die mich mit ihrem Wissen, ihren Geräten und Materialien unterstützt haben und eine freundliche und problemlose Zusammenarbeit ermöglichten.

Den Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie Frau Manuela Hofmann, Frau Bettina Mühling, Frau Monika Koospal, Frau Sabine Gahn, Frau Dr. Irina Chodnevskaia und Frau Stevenson-Knebel danke ich für die freundliche Unterstützung und die geduldige Einarbeitung in die notwendigen Labortechniken und den Laboralltag.

Ein großer Dank auch die Graduate School of Life Sciences für die finanzielle und ideelle Förderung sowie meiner weiteren Betreuerin Frau Dr. Monika Camara.

Meinen Eltern Wolfgang Quenzer und Eva-Anita Iversen-Quenzer und meiner Großmutter Solveig Iversen danke ich dafür, dass sie mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht und mich stets mit Liebe und Geduld unterstützt haben. Sowie Nithya und Narendrasingham Yokendren für die unermüdliche Aufmunterung und Zuversicht!

## Lebenslauf

---



## Veröffentlichungen

---

Posterpräsentation bei den 19. Chirurgischen Forschungstagen, 08.-10. Oktober 2015, Würzburg:

Quenzer A, Camara M, Hofmann M, Mühling B, Kapp M, Germer C-T, Otto C. Antiproliferative Effekte von Multidrug Resistance-Related Protein 1 (MRP1) und Laktatdehydrogenase (LDH) Inhibitor bei humanen kolorektalen Karzinomzelllinien (Themenbereich Onkologie, Poster 2.5).

### **Publiziertes Abstract:**

Quenzer A, Camara M, Hofmann M, Mühling B, Kapp M, Germer C-T, Otto C. Antiproliferative effects of multidrug resistance related protein 1 (MRP1) and lactate dehydrogenase (LDH) inhibitors on human colorectal cells. European Surgical Research. 2015;55:206.

### **Publikation:**

Wiegering A, Matthes N, Mühling B, Koospal K, Quenzer A, Peter S, Germer C-T, Linnebacher M, Otto C. RITA (reactivating p53 and inducing tumor apoptosis) enhances the response of RITA-sensitive colorectal cancer cells to chemotherapeutic agents 5-fluorouracil and oxaliplatin. Neoplasia. 2017;19(4):301-309.