

Aus der
Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Dietl

Entwicklung eines Modells
zur mikrokalorimetrischen Analyse der Wirkung pharmakologischer Substanzen auf
den Energiestoffwechsel benigner und maligner Zelllinien
am Beispiel von 2,4-Dinitrophenol

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Falk Alexander Gonnert
aus Würzburg

Würzburg, September 2005

Referent: Priv.-Doz. Dr.rer.hum.biol. Ulrike Kämmerer

Koreferent: Univ.-Prof. Dr.med. Michael Gekle

Dekan: Univ.-Prof. Dr.med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2007

Der Promovend ist Arzt.

<u>1. Einleitung</u>	1
<u>2. Einführung in die Methode der isothermen Mikrokalorimetrie</u>	5
2.1. Funktionsprinzip des Mikrokalorimeter (Batchkalorimetriesystem)	5
2.2. Die Mikrokalorimetrie im Kontext von Stoffwechseluntersuchungen an Zellen	8
2.3. Einsatzmöglichkeiten der Mikrokalorimetrie in der medizinischen Forschung	8
<u>3. Biochemische Grundlagen</u>	11
3.1. Zelluläre Energiegewinnung	11
3.2. Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung	13
3.2.1 Begriffsdefinition	13
3.2.2. Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung	14
3.2.3. Allgemeiner Wirkungsmechanismus ausgewählter Entkoppler	14
3.2.4. Physiologische Funktionen einer Entkopplung	16
<u>4. Der Entkoppler 2,4-Dinitrophenol</u>	17
4.1. Historische Aspekte	17
4.2. Toxikologische Daten	17
4.3. Spezieller Wirkungsmechanismus und Wirkungsprofil	18
4.4. Einsatz von 2,4-Dinitrophenol in vitro und in vivo	20
<u>5. Aspekte des Energiestoffwechsels von Tumorzellen</u>	23
5.1. Energiegewinnung von Tumorzellen	23
5.2. Substrate eines veränderten Energiestoffwechsels	27
5.3. Bedeutung der oxidativen Phosphorylierung für die Tumorzelle	28
<u>6. Alternative Therapieansätze der Krebsforschung</u>	29
6.1. Therapieansätze am Mitochondrium, insbesondere am Energiestoffwechsel	29
6.2. Möglichkeiten und Grenzen der Hyperthermie	32

<u>7. Ziel der Arbeit</u>	33
<u>8. Material und Methoden</u>	34
8.1. Material	34
8.1.1. Geräte	34
8.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	34
8.1.3. Zellen und Zellkulturmedien	35
8.2. Methoden	35
8.2.1. Zellkultur und Monolayer-Anzucht	35
8.2.2. Ansatz der 2,4-Dinitrophenol-Lösung	36
8.2.3. Mikrokalorimetrie	36
8.2.4. Ermittlung der Plättchendichten	38
8.2.5. Wärmebad	41
8.3. Statistik: Überblick über die verwendeten Verfahren	41
<u>9. Entwicklung eines Modells zur mikrokalorimetrischen Analyse mehrerer Zelllinien</u>	44
9.1. Etablierung eines geeigneten Messsystems	44
9.1.1. Methodischer Ansatz	45
9.1.2. Ergebnisse	45
9.1.3. Diskussion	55
9.2. Etablierung eines geeigneten Verfahrens zur Ermittlung der Plättchendichte	57
9.2.1. Ermittlung der Plättchendichte durch Auszählung eines ‚repräsentativen‘ Plättchens	57
9.2.2. Ermittlung der Plättchendichte mittels Neubauer Zählkammer	58
9.2.3. Ermittlung der Plättchendichte mittels LDH-Test	60

10. Datenanalyse	61
10.1. Ansatz I: Vergleich der absoluten Wärmeproduktion	63
10.1.1. Methodische Überlegungen	63
10.1.2. Methodik	64
10.1.3. Ergebnisse	66
10.1.4. Diskussion	67
10.2. Ansatz II: Vergleich der spezifischen Wärmefreisetzung	70
10.2.1. Methodische Überlegungen	70
10.2.2. Methodik	70
10.2.3. Ergebnisse	71
10.2.4. Diskussion	72
10.3. Der crowding-Effekt	73
10.3.1. Methodische Überlegungen	73
10.3.2. Ergebnisse	74
10.3.3. Diskussion	78
10.4. Ansatz III: Datenanalyse mittels Regressionsanalyse	81
10.4.1. Methodische Überlegungen	81
10.4.2. Methodik	81
10.4.3. Ergebnisse	82
10.4.4. Diskussion	84
10.5. Ansatz IV: Datenanalyse mittels hocheffizienter Testverfahren	85
10.5.1. Methodische Überlegungen	85
10.5.2. Methodik	86
10.5.3. Analyse der Wärmeflusseffekte von vier Zelllinien, jeweils getestet mit 4 Dosisstufen 2,4-DNP (zzgl. der Nulldosis)	87
10.5.3.1. Analyse der Wärmeflusseffekte von 2,4-DNP auf pA1: Ergebnisse und Diskussion	88
10.5.3.2. Analyse der Wärmeflusseffekte von 2,4-DNP auf BT20: Ergebnisse und Diskussion	93
10.5.3.3. Analyse der Wärmeflusseffekte von 2,4-DNP auf HUVEC: Ergebnisse und Diskussion	98

10. Datenanalyse (Fortsetzung)

10.5.3.4. Analyse der Wärmeflusseffekte von 2,4-DNP auf KERA: Ergebnisse und Diskussion	101
10.5.3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse (Kapitel 10.5.3)	103
10.5.4. Nulldosis-normierter Vergleich der untersuchten Zelllinien hinsichtlich der vier getesteten Dosisstufen 2,4-DNP	104
10.5.4.1. Analyse der Dosisstufe 12.5 μM 2,4-DNP: Ergebnisse und Diskussion	105
10.5.4.2. Analyse der Dosisstufe 25 μM 2,4-DNP: Ergebnisse und Diskussion	107
10.5.4.3. Analyse der Dosisstufe 50 μM 2,4-DNP: Ergebnisse und Diskussion	110
10.5.4.4. Analyse der Dosisstufe 100 μM 2,4-DNP Ergebnisse und Diskussion	115
10.5.4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse (Kapitel 10.5.4)	118
10.6. Abschließende Diskussion zu Kapitel 10	119

11. Ergänzende Datenanalysen **121**

11.1. Methodische Überlegungen	122
11.2. Analyse des initialen Wärmefluss	123
11.2.1. Ergebnisse	123
11.2.2. Diskussion	123
11.3. Analyse der prozentualen Steigerung des Wärmefluss in den ersten 3 Stunden	124
11.3.1. Ergebnisse	124
11.3.2. Diskussion	124
11.4. Analyse der Zeit bis zum Erreichen des maximalen Wärmefluss	125
11.4.1. Ergebnisse	125
11.4.2. Diskussion	125
11.5. Abschließende Diskussion zu Kapitel 11	127

<u>12. Ausgewählte ergänzende Untersuchungen von Stoffwechelparametern</u>	128
12.1. Methodische Überlegungen	129
12.2. Ergebnisse	130
12.3. Diskussion	133
<u>13. Zusammenfassung</u>	134
<u>14. Literaturverzeichnis</u>	137

Anhang

Lebenslauf

1. Einleitung

Die Mitochondrien, oft als Kraftwerke der Zelle bezeichnet, sind nicht nur für den Energiehaushalt der Zelle maßgeblich verantwortlich, sondern spielen auch eine Schlüsselrolle in vielen lebenswichtigen Funktionen, wie beispielsweise in zahlreichen Stoffwechselwegen, der Aufrechterhaltung des Calciumhaushalts oder der Steuerung des programmierten Zelltods^{1,2}. Auf Grund immer differenzierterer Erkenntnisse über die Bedeutung und Funktionen der Mitochondrien werden diese zunehmend auch als Reservoir für potentielle Ziele neuer Methoden in der Krebstherapie diskutiert. Nachdem jahrzehntelang nur vereinzelt Forschung auf diesem Gebiet stattfand, finden sich nun vielversprechende Ansätze für neue Tumortherapien³⁻⁸. Einen möglichen Ansatzpunkt, der in diesem Zusammenhang in den Fokus des Interesses gerückt ist, stellen Störungen des Energiehaushaltes dar^{3,9-13}.

Genau hier knüpft das Forschungsprojekt *„Investigation of representative tumor- and normal cell lines to estimate the influence of an uncoupling agent for the oxidative phosphorylation“* an, ein Drittmittelprojekt am Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Würzburg (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Dietl) unter der wissenschaftlichen Leitung von Frau Priv.-Doz. Dr. rer.hum.biol. U. Kämmerer (Universitätsfrauenklinik Würzburg) und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. D. Singer (Universitätskinderklinik Würzburg). Das Projekt basiert auf der Arbeitshypothese, dass 2,4-Dinitrophenol, ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, in Tumorzellen zu einer stärkeren Stoffwechselaktivierung und damit Wärmeproduktion als in benignen Zellen führt. Als Folge wird angenommen, dass Tumorzellen eher durch thermischen und / oder metabolischen Stress zu schädigen sind.

2,4-Dinitrophenol stört die ATP-Synthese und somit die Energiekonservierung in Mitochondrien. Folglich wird die über die Substratoxidation freigesetzte Energie als Wärme frei. Durch den Verlust der Atmungskontrolle wird zudem der Stoffwechsel aktiviert^{14,15}. Es wird davon ausgegangen, dass Tumorzellen mit ihrem ohnehin gesteigerten Grundumsatz eher auf eine Behandlung mit 2,4-Dinitrophenol ansprechen als benigne Zellen. Als Ursache für die höhere Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Entkopplern wird ein erhöhtes Membranpotential von Tumorzellen gegenüber benignen Zellen diskutiert^{6,15}. Ziel des Projektes ist es zu klären, ob 2,4-Dinitrophenol durch seine spezifischen Wirkungen und/oder durch die postulierte höhere Wärmeproduktion in Tumorzellen antitumoröse Eigenschaften aufweist.

2,4-Dinitrophenol zeigte in vitro und in vivo verschiedene Effekte, die auf ein Potential als Chemotherapeutikum hinweisen: Durch Störung der ATP-Produktion sind alle energieabhängigen Funktionen im Mitochondrium betroffen. Zudem ist die Überlebensfähigkeit der Zelle von der mitochondrialen Bioenergetik abhängig ¹⁶. In in vitro Tests konnte gezeigt werden, dass sich 2,4-Dinitrophenol zudem hemmend auf die Zellproliferation auswirkt. Außerdem weist vieles daraufhin, dass 2,4-Dinitrophenol in der Lage ist Apoptosen zu induzieren ^{17,18}.

Neben den unterschiedlichen beschriebenen Wirkungen von 2,4-Dinitrophenol verursacht der Entkoppler auch eine gesteigerte Wärmeproduktion, also eine Art Hyperthermie. Zahlreiche experimentelle Untersuchungen weisen auf das antitumoröse Potential der Hyperthermie hin ¹⁹. Zudem stellt die Hyperthermie mit ihren verschiedenen Anwendungsformen ein etabliertes Verfahren dar, das unterstützend in der Krebstherapie, meist in Kombination mit Bestrahlung, erfolgreich angewendet wird ^{20,21}.

Ein Eckpfeiler des Projektes war eine Analyse von 2,4-Dinitrophenol mit der Methode der Mikrokolorimetrie, einem Verfahren zur Detektion thermischer Effekte. Repräsentative benigne und maligne Zelllinien sollten mittels Mikrokolorimetrie untersucht werden, um das basale Umsatzniveau des Stoffwechsels und dessen Stimulierbarkeit durch 2,4-Dinitrophenol zu messen. Darüber hinaus sollte eine Dosis-Wirkungsbeziehung für 2,4-Dinitrophenol beschrieben werden.

Die Mikrokolorimetrie mit ihren verschiedenen Messtechniken ist ein etabliertes Verfahren, das die Bestimmung kleinster Wärmefreisetzung bis in den Nanobereich erlaubt. In vielen Bereichen der Naturwissenschaften, insbesondere in der Physik und Chemie, kommt die Mikrokolorimetrie zum Einsatz. Auch im Kontext von Stoffwechseluntersuchungen an Zellen wurde die Mikrokolorimetrie bereits erfolgreich verwendet ²². Die Arbeiten auf diesem Gebiet sind jedoch sehr begrenzt und sind zudem von kleinem Stichprobenumfang. Folglich liegen keine groß angelegten Studien mit hohen Durchsätzen an mikrokolorimetrischen Untersuchungen vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, ein Modell für eine mikrokolorimetrische Analyse zu entwickeln, das dafür geeignet ist, eine Vielzahl an Zelllinien auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung mit 2,4-Dinitrophenol hin zu untersuchen. Nachdem ein adäquates Messsystem etabliert werden konnte, wurde dieses im Rahmen eines Testdurchlaufs mit vier Zelllinien erprobt. Auf diese Weise konnten Störfaktoren identifiziert werden und zudem eine geeignete Methodik für eine aussagekräftige Datenanalyse ermittelt werden. Auf Grund des großen Stichprobenumfangs sowie der zusätzlich multivariaten Beschaffenheit der Daten stellte die Datenanalyse eine große Herausforderung dar. Mehrere Ansätze zur

Auswertung der Daten wurden erprobt, bis schließlich ein adäquates Verfahren bestimmt werden konnte, das den Anforderungen der Daten gerecht wurde: mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert sowie dem generalisierten Wilcoxon-Test nach Wei und Lachin, zwei hocheffizienten Testverfahren der modernen Biometrie, wurden die Daten aller bisher durchgeführten Versuche schließlich analysiert.

Insgesamt konnte das Ziel der Arbeit, die Entwicklung eines Modells für eine mikrokolorimetrische Analyse von malignen und benignen Zelllinien unter dem Einfluss von 2,4-Dinitrophenol, realisiert werden, womit eine Grundlage für eine Weiterführung des Projektes geschaffen ist. Darüber hinaus eignet sich das entwickelte Modell grundsätzlich auch für eine Untersuchung der Wirkung anderer pharmakologischer Substanzen auf den Energiestoffwechsel von Zellen.

Im Rahmen der Arbeit ergaben sich zudem Fragen, die mit den durchgeführten Datenanalysen bzw. Untersuchungen nicht beantwortet werden konnten, so dass ergänzende Analysen bzw. Untersuchungen durchgeführt wurden.

Auf Grund des erheblichen Umfangs der vorliegenden Arbeit, der bedingt ist durch die hohe Anzahl an Stichproben und den damit verbundenen aufwändigen Datenanalysen sowie durch die notwendig gewordenen ergänzenden Untersuchungen, soll im folgenden die Struktur der Arbeit kurz erläutert werden:

Kapitel 2 bis 6 wurden nach einer umfangreichen Literaturrecherche erstellt und dienen als Grundlage für das Projekt und als Einführung in diese Arbeit. In *Kapitel 2* werden das Funktionsprinzip der Mikrokolorimetrie sowie Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode vorgestellt. *Kapitel 3* fasst wesentliche biochemische Grundlagen zum Energiestoffwechsel und zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zusammen. *Kapitel 4* stellt den verwendeten Entkoppler 2,4-Dinitrophenol vor, von historischen Aspekten bis zum Einsatz in vivo und in vitro. *Kapitel 5* beleuchtet verschiedene Aspekte des Energiestoffwechsels von Tumorzellen. *Kapitel 6* stellt schließlich alternative Therapieansätze der Krebsforschung am Energiestoffwechsel vor und fasst Möglichkeiten und Grenzen der Hyperthermie zusammen.

Kapitel 7 definiert das Ziel der Arbeit.

Kapitel 8 beinhaltet Material und Methoden. Der Übersicht wegen sind hier jedoch nur grundlegende Methoden sowie ein Überblick über die verwendeten statistischen Verfahren

aufgeführt. Detaillierte methodische Überlegungen, insbesondere die Etablierung des Modells und die Datenanalysen betreffend, finden sich in den jeweiligen Kapiteln wieder.

Kapitel 9 fasst den methodischen Ansatz zur Entwicklung des Modells zur mikrokalorimetrischen Analyse mehrerer Zelllinien zusammen und erläutert das entwickelte Messsystem. Außerdem werden drei unterschiedliche getestete Methoden zur Ermittlung der Plättchendichte vorgestellt und auf ihre Eignung hin diskutiert. Dies war erforderlich, da die Plättchendichte im Rahmen der Vorversuche als Störfaktor identifiziert wurde.

Kapitel 10 beinhaltet die Datenanalyse des Testdurchlaufs. Die verschiedenen Ansätze zur Auswertung der ermittelten Wärmefreisetzungen unter verschiedenen Dosisstufen werden am Beispiel einer Zelllinie beschrieben und diskutiert. Zudem wird ein weiterer Störfaktor identifiziert und ausführlich untersucht. Mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert sowie dem generalisierten Wilcoxon-Test nach Wei und Lachin werden schließlich die Daten aller bisher getesteten Zelllinien analysiert.

Kapitel 11 fasst ergänzende Datenanalysen zusammen, die auf Grund von Fragen durchgeführt wurden, die sich im Rahmen der Arbeit ergeben haben.

Kapitel 12 führt die durchgeführten Untersuchungen von Stoffwechselfparametern im Rahmen der mikrokalorimetrischen Versuche auf. Mit diesen sollten potentielle Störfaktoren identifiziert und im Rahmen der Arbeit auftretende Fragen zur Wirkung von 2,4-Dinitrophenol beantworten werden.

Kapitel 13 fasst die Arbeit zusammen.

Kapitel 14 beinhaltet das Literaturverzeichnis.

2. Einführung in die Methode der isothermen Mikrokalorimetrie

Die isotherme Mikrokalorimetrie und ihre Messtechniken Batchkalorimetrie, Titrationskalorimetrie (ITC), Durchflusskalorimetrie (Perfusion) und Lösungskalorimetrie ermöglichen die Bestimmung kleinster Wärmeströme im μW - und nW -Bereich bzw. die Ermittlung kleinster Wärmemengen im μJ - und mJ -Bereich. Da alle physikalischen, chemischen und biologischen Prozesse mit der Abgabe oder Aufnahme von Wärme einhergehen, besitzt die hochempfindliche Mikrokalorimetrie als quantitative Methode nahezu unbeschränkte Einsatzmöglichkeiten. So wird diese beispielsweise verwendet zur schnellen Charakterisierung von Stabilitäten und Kompatibilitäten chemischer oder pharmazeutischer Produkte, zur Bestimmung der Zersetzungskinetik von exothermen Stoffen, zur Ermittlung thermodynamischer Kenngrößen oder zu Stoffwechseluntersuchungen an biologischen Systemen.

2.1. Funktionsprinzip des Mikrokalorimeters (Batchkalorimetriesystem)

Das von uns verwendete Batchkalorimetriesystem *TAM 2277* der Firma *Thermometric*, Schweden, arbeitet als Mehrplatzgerät mit vier simultan unabhängig voneinander zu betreibenden Kalorimereinsätzen im Temperaturbereich von 15°C bis 90°C bzw. von 15°C bis 150°C . Die Probenvolumina liegen je nach Messzelle zwischen 1ml und 20ml.



Abbildung 1: Mikrokalorimeter TAM 2277 der Firma Thermometric, Schweden

Das Mikrokalorimetriesystem TAM 2277 kam als Mehrplatzgerät mit vier simultan unabhängig voneinander betreibbaren Kalorimereinsätzen bei einer Temperatur von 37°C zum Einsatz.

Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 2 dargestellt: ein Kalorimereinsatz (Messzylinder) mit zwei Ampullen unterteilt sich in eine Vorheiz- und eine Messposition. Letztere ist von einem exakt (konstant) temperierten, gegen außen isolierten Wärmebad umgeben. Die

Stabilität der eingestellten Temperatur des Wasserbades ist mit $\pm 0,0001^{\circ}\text{C}$ angegeben. In der einen Ampulle findet der zu untersuchende kalorimetrische Prozeß statt (Messampulle), die andere Ampulle ist mit inertem Material gefüllt und dient als Referenzampulle. Exotherme oder endotherme Prozesse in der Messampulle verursachen einen Wärmefluß zwischen äußerem Wärmebad und Ampulleninhalt. Diesem Wärmefluß entspricht eine Temperaturdifferenz zwischen Wärmebad und Ampulleninhalt. Diese Temperaturdifferenz an der Ampullenwand wird mit hoher Empfindlichkeit als elektrische Spannung mit Hilfe von Peltier-Elementen gemessen (siehe Abbildung 3)^{22,23}.

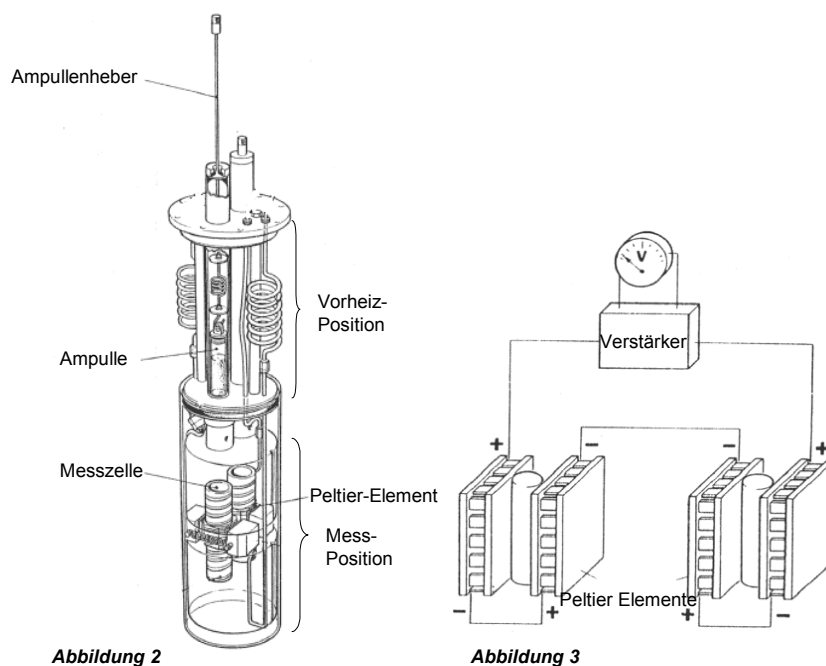


Abbildung 2: Funktionsprinzip des Mikrokalorimeters TAM 2277: Messzylinder

Jeder Messzylinder unterteilt sich in eine Vorheiz- und eine Messposition. Letztere ist von dem exakt temperiertem Wasserbad umgeben (nicht dargestellt). Der Messzylinder enthält zwei Ampullen, wovon die eine der Messung des zu untersuchenden kalorimetrischen Prozesses dient, die andere dient als Referenzgefäß. Der Wärmefluss wird mit Hilfe von Peltier-Elementen gemessen.

Abbildung 3: Prinzip der Wärmeflussmessung mit Peltier-Elementen

Ein Peltier-Element ist ein elektrisches Bauelement, basierend auf dem nach Jean Peltier benannten Peltier-Effekt. Dieser besagt, dass sich die von einem Strom durchflossene Lötstelle zweier Metalle je nach Stromrichtung entweder erwärmt oder abkühlt. Die sogenannten Peltier-Elemente werden für Kühlprozesse verwendet. Man kann die Elemente aber auch wie im Mikrokalorimeter dazu verwenden, um aus einer Temperaturdifferenz Strom zu gewinnen und diesen zu messen.

Die im Mikrokalorimeter durch die Proben verursachten Wärmeströme können als Wärmefluss online verfolgt werden, ein entsprechendes Programm berechnet parallel hierzu die freigesetzten Wärmemengen und speichert die Daten ab, so dass diese nach der Messung weiterverarbeitet werden können. Ein typisches Beispiel für die Darstellung des gemessenen Wärmeflusses ist in Abbildung 4 gezeigt.

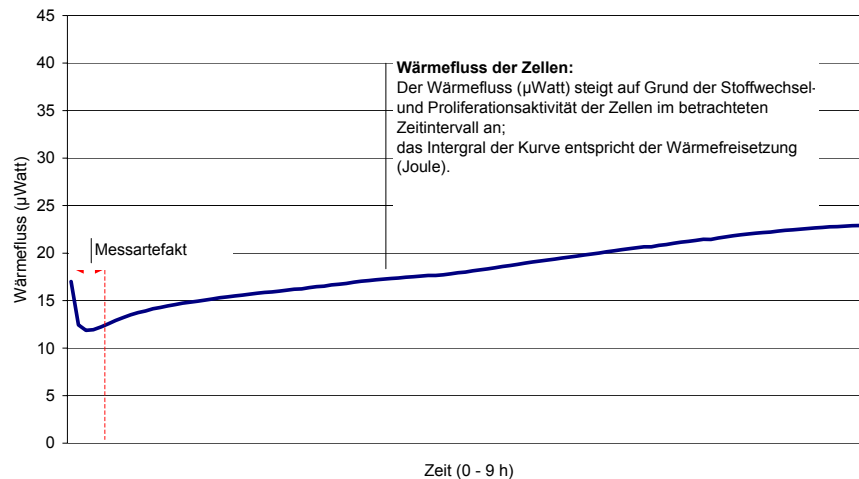


Abbildung 4: Beispiel einer mikrokalorimetrischen Analyse von pA1 Zellen (Monolayer)

Dargestellt ist der gemessene Wärmefluss (μWatt) eines pA1-Monolayers in Abhängigkeit der Zeit (Messdauer: 9 Stunden). Zu Beginn der Messung zeigten sich regelmäßig (technisch-bedingte) Messartefakte, folglich wurden die Daten erst ab der 20. Minute verwendet.

Das Integral des Wärmeflusses entspricht der Wärmefreisetzung oder Wärmeproduktion (Joule). Diese wird von der Software des verwendeten Mikrokalorimeters automatisch berechnet: für den hier gemessenen Monolayer (1024000 Zellen) ergab sich eine Wärmefreisetzung im Zeitintervall 20. Minute bis 9. Stunde von 591 mJ/Monolayer bzw. 140 nJ/Zelle.

Für die Batchkalorimetrie stehen zwei unterschiedliche Messsysteme zur Verfügung:

- „offene“ Systeme– d.h. die Messampullen sind nicht komplett verschlossen und somit können während der mikrokalorimetrischen Messung weitere Untersuchungen durchgeführt werden, wie z.B. Messung der Sauerstoffsättigung des Mediums mittels entsprechender Elektroden. Außerdem können über spezielle Vorrichtungen an den Ampullen Substanzen zugeführt oder das Medium ausgewechselt werden.

Ein Beispiel eines häufig verwendeten offenen Systems ist die sogenannte „Rührampulle“: in der Ampulle ist ein kleiner Rührer eingebaut, der bei Messung von Zellsuspensionen ein Absinken der Zellen verhindert.

Nachteil eines offenen Systems ist die komplizierte, langwierige Handhabung sowie eine extrem hohe Störanfälligkeit.²²

- „geschlossene“ Systeme – d.h. die Messampullen sind hermetisch verschlossen und somit ist kein Gas- und Stoffaustausch möglich. Der große Vorteil dieses Verfahrens ist die einfache und schnelle Handhabung sowie eine sehr niedrige Störanfälligkeit.²² Der Nachteil ist, dass im Gegensatz zum offenen System keine weiteren Untersuchungen parallel zur Messung durchgeführt werden können. Ebenso stehen keine Rührer zur Verfügung, da die Ampullen kleiner sind.

2.2. Mikrokalorimetrie im Kontext von Stoffwechseluntersuchungen an Zellen

Die Energiegewinnung von Zellen wird über Substratoxidation und die entsprechenden biochemischen Reaktionen gedeckt: im Citratzyklus treffen alle Abbaupfade der verschiedenen Nährstoffe zusammen. Die Hauptaufgabe des Citratzyklus besteht darin, in Kooperation mit der Atmungskette die Versorgung des Organismus mit energiereichen Verbindungen sicherzustellen. Bei jeder dieser Reaktionen wird ungefähr ein Drittel der chemischen gebundenen Energie in Form energiereicher Phosphatbindungen (v.a. ATP) konserviert, der Rest wird als Wärme frei. Alle energieabhängigen Prozesse (wie beispielsweise biosynthetische Prozesse oder die Aufrechterhaltung von elektrochemischen Gradienten) verbrauchen in etwa ein Drittel der durch die hydrolytische Spaltung von ATP freigesetzten Energie, der Rest wird ebenfalls als Wärme frei^{22,24}.

Der beschriebene Zusammenhang zwischen Wärmefreisetzung und Stoffwechselrate bzw. Substratverbrauch erlaubt es also, mit Hilfe der Mikrokalorimetrie eine Aussage über den Gesamtmetabolismus von Zellen zu treffen, sowie zellbiologische Prozesse und Phänomene zu beobachten. Und dies nicht nur unter physiologischen, sondern auch unter pathologischen Bedingungen und darüber hinaus natürlich auch unter dem Einfluss ausgewählter Wirkstoffe.

2.3. Einsatzmöglichkeiten der Mikrokalorimetrie in der medizinischen Forschung

Obwohl für die Methode der Mikrokalorimetrie auch in der medizinischen Forschung interessante und vielversprechende Einsatzmöglichkeiten denkbar sind, stellen Böttcher et al. in ihrer Übersichtsarbeit fest, dass bisher nur wenig Forschung auf diesem Gebiet stattgefunden hat²². Die meisten mikrokalorimetrischen Untersuchungen fanden bisher mit unterschiedlichen Blutzellen wie Erythrozyten, Thrombozyten oder Lymphozyten statt, wobei diese entweder im Zusammenhang mit bestimmten Krankheiten wie z.B. Herzinsuffizienz, Leukämie oder Diabetes oder auf den Einfluss von Medikamenten oder Hormonen hin untersucht wurden. Mikrokalorimetrische Untersuchungen mit Gewebszellen wurden in den meisten Fällen nur mit aus Ratten oder Mäusen isolierten Zellen durchgeführt, primär kultivierte humane Gewebszellen wurden hingegen nur vereinzelt verwendet. Für einen detaillierteren Überblick sei an dieser Stelle auf Böttcher et al. verwiesen²². Da die meisten Arbeiten sich bisher eher mit methodischen Fragestellungen beschäftigten und v.a. den Einfluss von exogenen Substanzen auf die Zellkultur untersuchten, wurden bisher überwiegend Daten publiziert, die mit einem offenen Messsystem generiert wurden. Die Verwendung eines geschlossenen Systems findet sich lediglich in einer methodischen Arbeit zur Mikrokalorimetrie von Nässberger et al.²⁵. Bei der mikrokalorimetrischen Untersuchung von Gewebeproben hingegen ist das geschlossene System Methode der Wahl^{26,27}.

Im folgenden soll nun eine Auswahl an bisher publizierten Arbeiten kurz vorgestellt werden, um interessante Einsatzmöglichkeiten der Mikrokalorimetrie in der medizinischen Forschung aufzuzeigen:

Die ersten mikrokalorimetrischen Untersuchungen mit Tumorzellen überhaupt wurden 1986 von Monti et al. durchgeführt²⁸. Er untersuchte mittels Mikrokalorimetrie den Stoffwechsel von Tumorzellen, die von Patienten mit Non-Hodkin-Lymphomen (NHL) isoliert wurden. Hierbei korrelierten die Wärmeproduktionen der Tumorzellen mit deren Malignität. Dies war insbesondere deswegen von Interesse, da zuvor festgestellt wurde, dass ein morphologisches Grading für die Bestimmung einer Prognose für Patienten mit NHL nur wenig hilfreich war.

Chemotherapien werden gewöhnlich ohne vorherigen Sensitivitätstest eingesetzt, obwohl ein Ansprechen der Therapie nicht per se angenommen werden kann. Ein Grund für den Verzicht auf vorherige Sensitivitätstests ist, dass sich alle etablierten Zytotoxizitäts-Methoden zur Testung des Ansprechens eines Tumors auf Chemotherapeutika langwierig oder aufwendig gestalten. Schön et al. haben daher in ihrer Arbeit die Methode der Mikrokalorimetrie daraufhin überprüft, ob diese prinzipiell als ein routinemäßiges in vitro Testverfahren für das Ansprechen von Chemotherapeutika in Frage käme²⁹. Hiefür wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Methotrexat behandelte T-Lymphom-Zellen sowohl mikrokalorimetrisch als auch mittels zytotoxischer Assays untersucht. Hierbei konnte eine eindeutige Korrelation zwischen den Ergebnissen der zwei Testverfahren hinsichtlich der Wirkung von Methotrexat nachgewiesen werden. Somit schien die Mikrokalorimetrie als ein Verfahren zur Sensitivitätstestung von Chemotherapeutika geeignet zu sein.

In einem späteren Artikel aus derselben Arbeitsgruppe musste diese Vermutung jedoch revidiert werden³⁰. Kimura et al. haben analog zu der Arbeit von Schön et al. weitere Chemotherapeutika wie Cisplatin oder Chlorambucil getestet und konnten jedoch keine eindeutigen Korrelationen zwischen den Ergebnissen der Mikrokalorimetrie mit den entsprechenden Referenzuntersuchungen feststellen. Als Ursache hierfür diskutierten die Autoren das (zeitliche) Versuchsdesign der mikrokalorimetrischen Untersuchung, das für die Wirkungsentfaltung der ausgewählten Substanzen vermutlich zu kurz angelegt war. Nach wie vor weisen sie jedoch auf das Potential mikrokalorimetrischer Untersuchungen im Kontext klinischer Forschung oder pharmakologischer Studien hin, insbesondere was Fragen der Kinetik von Wirkstoffen betrifft.

Roig et al. nutzten die Methode der Mikrokalorimetrie in ihrer Arbeit, um die Effekte einzelner Substanzen aus Chemotherapie-Kombinationen auf Tumorzellen zu beschreiben³¹. Hierdurch gelang es ihnen, Aussagen zu den Kinetiken der in unterschiedlichen Konzentrationen kombinierten Wirkstoffe zu machen.

Auch Bermudez et al. untersuchten die Wirkung von Chemotherapeutika an Lymphomzellen im Mikrokalorimeter, wobei auch eine Methotrexat-resistente Zelllinie verwendet wurde, um die gewonnenen Ergebnisse zu verifizieren³². Borrebaeck et al. haben u.a. mit der Methode der Mikrokalorimetrie die Wirkung von Lectin auf humane Leukämie Zelllinien untersucht und konnten eine antiproliferative Wirkung von Lectin nachweisen³³.

Den Einfluß von Inhibitoren des Stoffwechsels auf Ehrlich Aszites Karzinomzellen (EAC) haben Ito et al. untersucht. Für 2,4-Dinitrophenol konnten sie feststellen, dass dies bei EAC – im nur mit Glucose substituierten Medium – eine Steigerung der Wärmefreisetzung um 10% gegenüber der Kontrolle bewirkt³⁴.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Batchkalorimetrie mit ihren zwei Messsystemen eine Methode ist, die sich hervorragend dafür eignet, die Wirkung definierter Substanzen auf den Stoffwechsel von Zellen zu untersuchen. Die Auswahl des zu verwendeten Systems muss je nach Fragestellung sorgfältig getroffen werden. Bei der Interpretation der Messergebnisse ist darauf zu achten, dass es sich bei der Methode der Mikrokalorimetrie zwar um eine hochsensitive, aber gleichzeitig auch um eine unspezifische Methode handelt, da die Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen sich stets auf den Gesamtmetabolismus beziehen. Die Mikrokalorimetrie ermöglicht zwar oftmals die Entdeckung unerwarteter Effekte, lässt aber eine Interpretation dieser nur bedingt zu. Daher sollte die Mikrokalorimetrie für eine abschließende Diskussion und Beurteilung der beschriebenen Effekte um weitere Untersuchungen ergänzt werden^{22,34}. Außerdem sollten bei der Interpretation der Messergebnisse mögliche Störfaktoren wie Änderungen des pH-Wertes, unterschiedliche Sauerstoffsättigung oder Lösungsenthalpien von Wirkstoffen identifiziert und entsprechend berücksichtigt werden, da diese einen (unter Umständen erheblichen) Einfluss auf die Wärmefreisetzung haben und so das Ergebnis verfälschen können^{35,36}.

3. Biochemische Grundlagen

3.1. Zelluläre Energiegewinnung

Der weitaus größte Teil der Energiegewinnung des Organismus erfolgt innerhalb der Mitochondrien durch Kopplung zweier Vorgänge, nämlich der

- Reoxidation wasserstoffübertragender, reduzierter Coenzyme (wie z.B. NADH oder Succinat) mit Sauerstoff unter Wasserbildung und darüber hinaus der
- Fixierung der bei diesem exergonen Vorgang freiwerdenden Energie in Form von ATP.

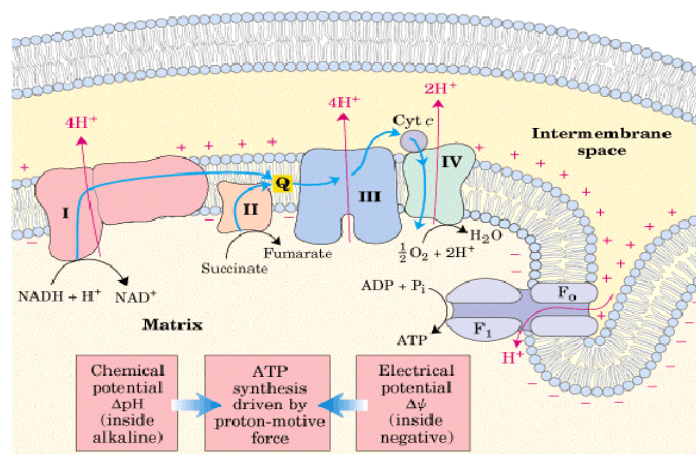
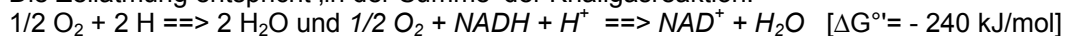


Abbildung 5: Prinzip der zellulären Energiegewinnung

- Bei der Oxidation von NADH in der Atmungskette werden Protonen aus dem Matrixraum in den Intermembranraum gepumpt. Dadurch wird ein elektro-osmotischer Protonengradient an der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut
- Die Energie des Protonengradienten setzt sich aus dem Membranpotential und einem osmotischen Anteil zusammen.
- Der Rückfluß der Protonen treibt die ATP-Synthase und somit die ATP-Produktion an, elektrische Energie wird so in chemische Energie umgewandelt.

Die Zellatmung entspricht ‚in der Summe‘ der Knallgasreaktion:



Bei der Knallgasreaktion geht die Energie komplett als Wärme verloren. Im Zellstoffwechsel wird ein Teil der Energie zur ATP-Synthese genutzt: $\text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$ $[\Delta G^\circ = + 30.5 \text{ kJ/mol}]$

Die Energiegewinnung der Zelle ist eine „kontrollierte Knallgasreaktion“: Die Oxidation von NADH und anderen Reduktionsäquivalenten erfolgt nicht direkt mit O_2 . Die Elektronen werden über eine Kette von Redoxproteinen (Atmungskette) übertragen. Diese Proteine enthalten prosthetische Gruppen, die reversibel reduziert und oxidiert werden können. Erst das letzte Redoxzentrum gibt die Elektronen an den terminalen Elektronenakzeptor (O_2) ab.

Die Sequenz von Enzymen und Überträgern, die für den Transport der Reduktionsäquivalente von NADH zum molekularen Sauerstoff verantwortlich sind, wird als Atmungskette bezeichnet. Diese stellt ein Kaskadensystem von Redoxpartnern unterschiedlichen Redoxpotentials dar, die in den Transport von Wasserstoff bzw.

Elektronen zum Sauerstoff eingeschaltet sind. Insgesamt besteht dies aus vier elektronentransportierenden Multienzymkomplexen, wovon drei zur elektronentransportabhängigen Protonentranslokation von der Matrix in den Intermembranraum imstande sind, wodurch eine elektrochemische Potentialdifferenz über der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut wird. Diese liefert die von der mitochondrialen F₁/F₀-ATPase benötigte Energie für die ATP-Bildung.

Coenzyme wie NADH oder Succinat werden von einem Enzymkomplex der Atmungskette oxidiert. Die bei den Oxidationsprozessen freigesetzten Elektronen gelangen über eine Elektronentransportkette zum Zytochrom-c-Oxidase-Komplex, von dem sie auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Durch den Elektronentransport wird Energie frei. Beim Elektronentransfer von NADH bzw. Succinat über Coenzym Q und Zytochrom c zum Sauerstoff werden beispielsweise jeweils Energien in Höhe von ca. 52 bzw. 36 kcal/mol frei³⁷. Mit Hilfe der durch den Elektronentransport freigesetzten Energie können Protonen durch die innere Mitochondrienmembran aus dem Matrixraum in die Cristae gepumpt werden. Die Energieübertragung geschieht also durch Ionen-Pumpen, die Protonen ohne begleitende Anionen durch die innere Mitochondrienmembran transportieren (elektrogener Protonentransport). Dabei entstehen gleichzeitig ein Protonengradient und ein Membranpotential, die beide als Komponenten eines „elektrochemischen Protonengradienten“ aufgefasst werden können. Dieser schafft die Voraussetzungen für den Ablauf verschiedener energieverbrauchender Prozesse, unter denen die ATP-Synthese im Vordergrund steht. Beim Rückfluss der Protonen in den Matrixraum katalysiert die ATP-Synthase die Bildung von ATP. Dieser Prozess wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet. Das Zusammenspiel von Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung im Sinne einer Energieübertragung von der exergonen Oxidation von NADH (und anderen reduzierten Endprodukten kataboler Stoffwechselwege) auf die physikalisch getrennte endergone ATP-Synthese wurde von Mitchell beschrieben und als chemi-osmotische Kopplung bezeichnet. Er erhielt für diese Entdeckung 1978 den Nobelpreis.

Aus energetischen Gründen kann ATP nicht ohne gleichzeitig ablaufende Redoxvorgänge synthetisiert werden. Umgekehrt würde die Oxidation von NADH oder Succinat ohne gleichzeitige Phosphorylierung nur Wärme erzeugen. Eine strikte Kopplung von Substratoxidation und ATP-Bildung, die auch als Atmungskontrolle bezeichnet wird, verhindert dies und lässt eine nennenswerte, schnelle Oxidation in der Atmungskette nur zu, wenn die Möglichkeit der ATP-Synthese durch Anwesenheit von ADP gegeben ist. Teilschritte der zellulären Energiegewinnung lassen sich durch spezifische Inhibitoren hemmen:

- Hemmung des Elektronentransports durch Hemmung der Enzyme der Atmungskette (Komplex I durch Rotenon und Barbiturate, Komplex II durch Malonat, Komplex III durch Antimycin, Komplex IV durch Cyanid und Sulfid)
- Hemmung der ATP-Synthese (direkt z.B. durch Oligomycin, indirekt z.B. durch Arsenat)
- Hemmung des ADP-ATP –Austausches (z.B. durch Atractylosid)
- Kurzschluss des elektrochemischen Protonengradienten durch Entkoppler wie z.B. 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) oder Carbonylcyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP)

Für einen detaillierteren Überblick sei an dieser Stelle auf den Übersichtsartikel von Skulachev ² sowie auf Lehrbücher der Biochemie und Physiologie ^{14,24,38} verwiesen.

3.2. Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung

Im folgenden Kapitel soll das Prinzip der Entkopplung als erstes mit dem Versuch einer Begriffsdefinition verständlich gemacht werden, bevor die Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung vorgestellt werden und der Wirkmechanismus ausgewählter Entkoppler erklärt wird. Abschließend werden physiologische Funktionen natürlicher Entkoppler erläutert.

3.2.1. Begriffsdefinition

Unter dem Begriff der Entkopplung wurde ursprünglich eine Zellatmung verstanden, die ohne ATP-Produktion einherging. Der Begriff wurde erstmals von Belitser et al. im Jahre 1939 geprägt, die bei der bioenergetischen Untersuchung der Wirkung von Arsenat auf Skelettmuskulatur feststellten, dass unter Arsenat trotz intakter Zellatmung kein ATP gebildet wurde. Nachdem jedoch im Laufe der Jahrzehnte immer mehr Erkenntnisse über die Bioenergetik der Zelle gewonnen wurden, ist diese Definition überholt: da ein Fehlen der ATP-Synthese nicht zwangsläufig auf einen Entkopplungsprozess zurückzuführen ist, ist es somit obsolet, Entkopplung mit einem Fehlen der ATP- Synthese gleichzusetzen ¹⁵. Im bioenergetischen Sinne wird nach Skulachev et al. unter dem Begriff Entkopplung somit ein nicht-Nutzen des durch die Zellatmung generierten Protonengradienten verstanden, sei es für chemische, osmotische oder mechanische Arbeit. Von einer entkoppelten Zellatmung werden nach heutiger Definition noch eine gekoppelte und nicht-gekoppelte Zellatmung unterschieden ¹⁵:

- Gekoppelte Zellatmung: durch die Zellatmung werden Protonengradienten generiert, die dem Antrieb chemischer (z.B. ATP-Synthese), osmotischer (z.B. Transport von geladenen Teilchen entgegen dem osmotischen Gefälle) oder mechanischer Arbeit (z.B. Antrieb der Flagellen beim Bakterium) dienen.

- Entkoppelte Zellatmung: durch die Zellatmung werden Protonengradienten generiert, die jedoch sofort durch beispielsweise erhöhte Membranpermeabilität „vergeudet“ werden.
- Nicht gekoppelte Zellatmung: Zellatmung ohne Generierung von Protonengradienten

Wallace et al. weisen in ihrer Übersichtsarbeit daraufhin, dass der Begriff der Entkopplung eigentlich nie alleine Verwendung findet, sondern immer um den Zusatz ‚*der oxidativen Phosphorylierung*‘ ergänzt wird, was wiederum den Einfluß der Entkoppler auf die mitochondriale ATP- Produktion betont. Und dies, obwohl nicht ausschließlich die ATP-Produktion, sondern alle energieabhängigen Funktionen im Mitochondrium von sämtlichen Entkopplern betroffen sind. In ähnlicher Weise wie Skulachev beschreiben Wallace et al. daher Entkopplung als einen Energie-verschwendenden Prozeß, der mit dem Großteil der mitochondrialen Funktionen um Energie konkurriert ⁸.

3.2.2. Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung

Es existieren eine Vielzahl an natürlichen und künstlichen Entkopplern, von denen der größte Teil als Wirkstoffe in Pestiziden oder Insektiziden Anwendung findet. Darüber hinaus wurden eine Vielzahl von Medikamenten beschrieben, die isolierte Mitochondrien entkoppeln. Hierzu gehören beispielsweise nichtsteroidale Entzündungshemmer wie Aspirin oder Diclofenac, zahlreiche Antihelmentika, bestimmte Antipsychotika und Antidepressiva oder einige antineoplastische Wirkstoffe ^{8,39}.

Die größte Gruppe der Entkoppler stellen schwache lipophile Säuren mit einem pK von 5-7 dar, die leicht protoniert bzw. deprotoniert werden können und stark elektronegative Seitenketten aufweisen ^{8,15,37}. Die mögliche Diffusion durch Lipidmembrane, die Stabilität der ionisierten Form in der Membran und die Fähigkeit, Protonen zu transportieren, tragen maßgeblich zum Entkopplungspotential dieser Gruppe bei. Zu dieser gehören unter anderem substituierte Phenole, Trifluormethylbenzimidazole, Salicylanilide sowie Carbonyl-Cyanid-Phenylhydrazone.

Eine zweite große Gruppe stellen freie Fettsäuren dar, die mit bestimmten Proteinen als natürliche Entkoppler fungieren. Sie weisen ebenfalls eine negative Ladung auf und können Protonen über die innere Mitochondrienmembran transportieren ^{8,15,40}.

Als weitere Gruppen von Entkopplern sind Ionophore, kationische Entkoppler und membran-aktive Peptide zu nennen ⁸.

3.2.3. Allgemeiner Wirkungsmechanismus ausgewählter Entkoppler

Im folgenden soll nun der Mechanismus der Entkopplung vorgestellt werden, der auf einem Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten beruht. Die zwei größten Gruppen der

Entkoppler, nämlich lipophile schwache Säuren wie beispielsweise 2,4-Dinitrophenol oder Fettsäuren beschreiten diesen Weg der Entkopplung. An dieser Stelle sei für weitere Mechanismen der Entkopplung durch andere Substanzgruppen insbesondere auf Wallace et al.⁸, Skulachev¹⁵, Hanstein³⁷, Wilson et al.⁴¹ und Lowell et al.⁴² verwiesen.

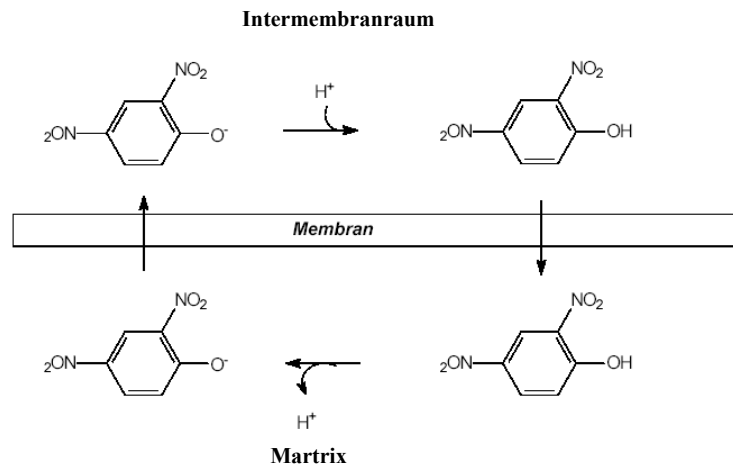


Abbildung 6: Prinzip des allgemeinen Wirkmechanismus von 2,4-Dinitrophenol

2,4-DNP, ein Entkoppler aus der Gruppe der lipophilen schwachen Säuren, ist membrangängig und wirkt als Protonophor: nach Aufnahme eines Protons diffundiert das Molekül in die Matrix, gibt dort das Proton an das alkalische Milieu ab und kehrt schließlich als Anion in den Intermembranraum zurück, wo der Zyklus erneut beginnt.

Entkoppler transportieren Protonen aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in die Matrix. Hierbei diffundieren die Entkoppler nach Aufnahme eines Protons in neutraler Form in die Matrix, geben dort ein Proton an das alkalischere Milieu ab und werden schließlich als lipophiles Anion vom Membranpotential zurück in den Intermembranraum gezogen, wo der Zyklus erneut beginnen kann. Die Zirkulation der Entkoppler scheint hierbei durch Membranproteine katalysiert zu werden, wobei vieles daraufhin deutet, dass diese Entkoppler-spezifisch variieren¹⁵. Die durch den Entkoppler bedingte Verschiebung der Protonen in die Matrix führt zu einem Zusammenbruch des, über der inneren Mitochondrienmembran aufgebauten, elektrochemischen Protonengradienten und somit zur Entkopplung von Zellatmung und ATP-Synthese. Der Abfall oder sogar ein Zusammenbruch des Protonengradienten stellt für die Zelle ein drastisches Ereignis dar, da viele Stoffwechselforgänge von einem adäquaten Protonengradienten abhängig sind. Somit ist vor allem in Stresszuständen die Überlebensfähigkeit der Zelle von der mitochondrialen Bioenergetik abhängig¹⁶. Durch den fehlenden Aufbau von speicherbaren Energien in Form von ATP wird die über die Substratoxidation freigesetzte Energie in Form

von Wärme frei. Da die Substratoxidation -bedingt durch den Verlust der Atmungskontrolle- auf einem hohen Niveau läuft, wird durch Entkopplung entsprechend viel Wärme frei ^{15,37}.

3.2.4. Physiologische Funktionen einer Entkopplung

Die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung stellt nicht nur einen grundsätzlich pathologischen Prozess dar, der durch exogene Protonen-Carrier wie beispielsweise 2,4-Dinitrophenol verursacht werden kann. So gibt es neben der pathologischen auch eine physiologische Entkopplung, wobei vor allem Fettsäuren als Protonen-Carrier dienen: sogenannte Entkoppler-Proteine (engl.: uncoupling protein: UCP) der Mitochondrien ermöglichen hierbei die Fettsäure-abhängige Protonen-Translokation über die innere Mitochondrienmembran.

Eine physiologische Aufhebung der mitochondrialen Bindung zwischen O₂-Verbrauch und ATP-Produktion dient beispielsweise der Optimierung der oxidativen Phosphorylierung ⁴⁰, der Kontrolle der Produktion von freien reaktiven Sauerstoffradikalen in den Mitochondrien⁴³ oder der Thermogenese im braunen Fettgewebe ⁴².

Die bisherige Forschung über Entkoppler-Proteine konnte bisher neben allgemeinen Entkoppler-Proteinen wie den ADP/ATP-Antiporter oder den Glutamat-Aspartat-Antiporter fünf spezifische Entkoppler-Proteine identifizieren: UCP1 bis UCP5 ¹⁵. Obwohl die Aminosäure-Sequenz dieser Proteine sehr ähnlich ist, ist jedes Entkoppler-Protein Produkt eines eigenen Gens und weist Unterschiede hinsichtlich Expression und Regulation auf. So kommt zum Beispiel UCP1 ausschließlich im braunen Fettgewebe vor, UCP2 und UCP 3 hingegen vor allem im weißen Fettgewebe sowie in der Skelettmuskulatur. Extreme Veränderungen hinsichtlich Expression der spezifischen Entkoppler-Proteine wurden im Rahmen von Krankheitsbildern wie Adipositas, Kachexie und Entzündung dokumentiert. Da vermutet wird, dass eine Dysregulation der Entkopplerproteine einen maßgeblichen Einfluß auf die Pathophysiologie der erwähnten Krankheiten hat, bemüht sich die Forschung um weitere Erkenntnisse über diese Proteingruppe. Die bisher entdeckten Unterschiede hinsichtlich der Regulation der Entkoppler-Proteine haben zu der Annahme geführt, dass diese bei einer Adaptation der Zellen auf wechselnde Substratversorgung eine wichtige Rolle spielen ^{40,44}. Einen sehr guten Überblick über den momentanen Forschungsstand bieten die Übersichtsarbeiten von Diehl et al. ⁴⁰, Skulachev et al. ¹⁵ und Lowell et al. ⁴².

4. Der Entkoppler 2,4 Dinitrophenol

4.1. Historische Aspekte

2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP), ein Entkoppler aus der Gruppe der lipophilen schwachen Säuren, wurde 1948 erstmals von Loomis und Lipmann in seiner Wirkung wissenschaftlich beschrieben¹⁵, wobei zur damaligen Zeit noch ein chemischer Wirkmechanismus der Entkoppler postuliert wurde⁴¹.

Insbesondere 2,4-DNP konnte unter den damals bekannten entkoppelnden Substanzen eine lange und teilweise kuriose Vergangenheit aufweisen. So wurde 2,4-DNP im ersten Weltkrieg in großem Umfang als TNT-Ersatz verwendet. In den frühen dreißiger Jahren galt 2,4-DNP in den USA als Wunderwaffe gegen Fettleibigkeit. Im Laufe von 5 Jahren wurden ca. 100.000 Diätwillige behandelt. Diverse Zwischenfälle während der Behandlung, insbesondere die Entstehung von Grauem Star bei bereits sehr jungen Patienten sowie schwere Vergiftungen und Todesfälle bei Überdosierung zerstörten jedoch trotz beeindruckender Erfolge in der Gewichtsreduktion der behandelten Personen relativ schnell jegliche Hoffnungen auf „die“ absolut zuverlässige und nebenwirkungsfreie Diättablette^{45,46}. Eine erfolgreiche Anwendung hingegen fand 2,4-DNP als Herbizid bzw. Insektizid^{8,37}. Im Jahr 1961 gelang es Mitchell, der bereits die chemi-osmotische Kopplung in den Mitochondrien entdeckte, den Wirkmechanismus von 2,4-DNP zu klären¹⁵.

4.2. Toxikologische Daten

Die chemische Formel von 2,4-DNP ist $C_6H_4N_2O_5$, das Molekulargewicht beträgt 184.11 g/mol⁴⁷. Es wird auf Grundlage von Tierversuchen als hochgradig toxisch eingestuft⁴⁸. Für Mäuse wird die LD_{50} mit 141 $\mu\text{mol/kg}$ angegeben⁸. Für den Menschen ist die letale Dosis mit 14–43 mg/kg (= 63–193 $\mu\text{mol/kg}$) angegeben⁴⁹, Jucker et al. hingegen geben die toxische Grenze von 2,4-Dinitrophenol mit 4 mg/kg (= 18 $\mu\text{mol/kg}$) an⁵⁰. Eine Untersuchung der Wirkung von 2,4-Dinitrophenol auf Sertoli-Zellkulturen der Ratte erwies eine toxische testikuläre Wirkung im Konzentrationsbereich von 10 mM 2,4-DNP⁵¹.

Intoxikationserscheinungen mit 2,4-Dinitrophenol konnten bereits 1914–1918 bei Arbeitern in einer französischen Munitionsfabrik beobachtet werden, die Dinitrophenol als Sprengstoffkomponente verarbeiteten⁴⁶. Neben extremen Gewichtsabnahmen wurden hochgradige Schwäche, Kopfschmerzen, verstärktes Schwitzen, starkes Durstgefühl, hohes Fieber, Dyspnoe als Symptome und schließlich Tod als Folge dokumentiert⁵². 2,4-Dinitrophenol wird als ein relativ schwacher Entkoppler eingestuft. Die Konzentration, die es bedarf, um eine 50-prozentige Entkopplung herbeizuführen, beträgt 30–100 μmol . Für SF6847 hingegen, den stärksten bekannten Entkoppler, beträgt die Konzentration nur 5–10 nM^{8,37,53}.

4.3. Spezieller Wirkungsmechanismus und Wirkungsprofil

Bevor auf den speziellen Wirkungsmechanismus von 2,4-Dinitrophenol eingegangen wird, soll in der folgenden Abbildung das allgemeine Prinzip der Entkopplung durch 2,4-Dinitrophenol veranschaulicht werden:

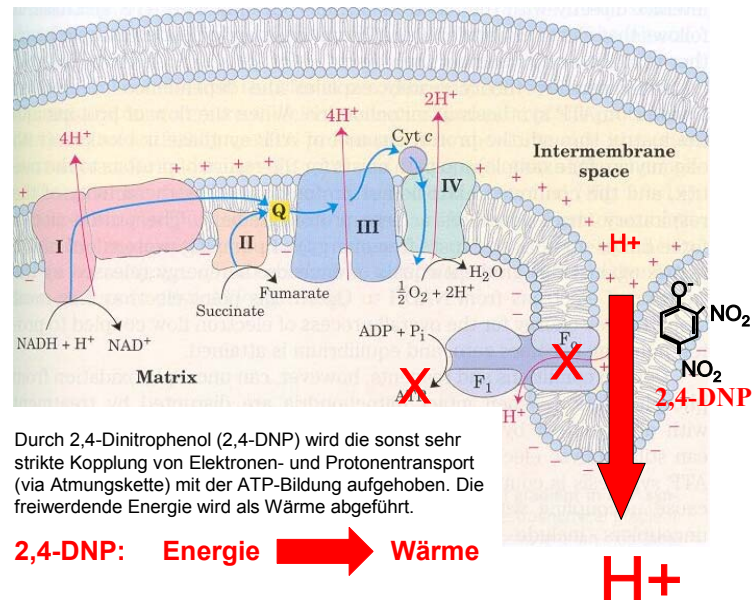


Abbildung 7: Prinzip der Entkopplung durch 2,4-Dinitrophenol

Durch 2,4-DNP werden Protonen aus dem Intermembranraum in die Matrix transportiert. Durch diese Verschiebung von Protonen kommt es schließlich zu einem Zusammenbruch des über der Mitochondrienmembran aufgebauten elektrochemischen Gradienten und somit zu einer Entkopplung von Zellatmung und ATP-Synthese. Die durch die Substratoxidation freigesetzte Energie wird somit nicht in Form von ATP konserviert, sondern als Wärme freigesetzt.

Der ADP-ATP-Antiporter der inneren Mitochondrienmembran wird als das Protein gesehen, welches mit 2,4-DNP interagiert, da bei spezifischer Hemmung dieses Proteins durch Carboxyatractylat ein Wirkverlust von 2,4-Dinitrophenol beobachtet werden kann¹⁵. Da die Interaktion von 2,4-DNP mit Membranproteinen jedoch vom Aufbau der Membran abhängig ist, weisen Skulachev et al. in diesem Zusammenhang daraufhin, dass Ergebnisse in wissenschaftlichen Untersuchungen hinsichtlich des Wirkpotentials von Dinitrophenol je nach untersuchtem Membransystem variieren können¹⁵.

Leverve et al. untersuchten in mehreren methodischen Arbeiten die bioenergetische Wirkung von 2,4-DNP⁵⁴⁻⁵⁷. Zusammenfassend konnten die Autoren in Versuchen mit isolierten Mitochondrien aus Rattenleberzellen folgende für 2,4-DNP typische bioenergetische Veränderungen definieren:

- Störung im Sinne eines Abfalls des elektrochemischen Protonengradienten
- Störung im Sinne einer Steigerung der Oxidationsrate, verknüpft mit einem Abfall des Redoxpotentials (NADH / NAD-Ratio)
- Störung im Sinne eines Abfalls der ATP-Produktion, verknüpft mit einem Abfall des Phosphatpotentials

Wurde bereits in anderen Arbeiten auf eine Abhängigkeit der 2,4-DNP-Wirkung von den verwendeten Medien hingewiesen ^{58,59}, gelang es nun Lerverve et al. erstmalig diese Abhängigkeiten nachzuweisen und somit die Ursache zum Teil gegensätzlicher Ergebnisse bei Versuchen mit 2,4-DNP zu erklären: so unterscheiden sich die bioenergetischen Veränderungen nach Behandlung mit 2,4-Dinitrophenol je nachdem, ob hauptsächlich im Zytosol bzw. im Mitochondrium oxidierte Substrate verwendet werden. Folgende Tabelle soll einen Überblick geben:

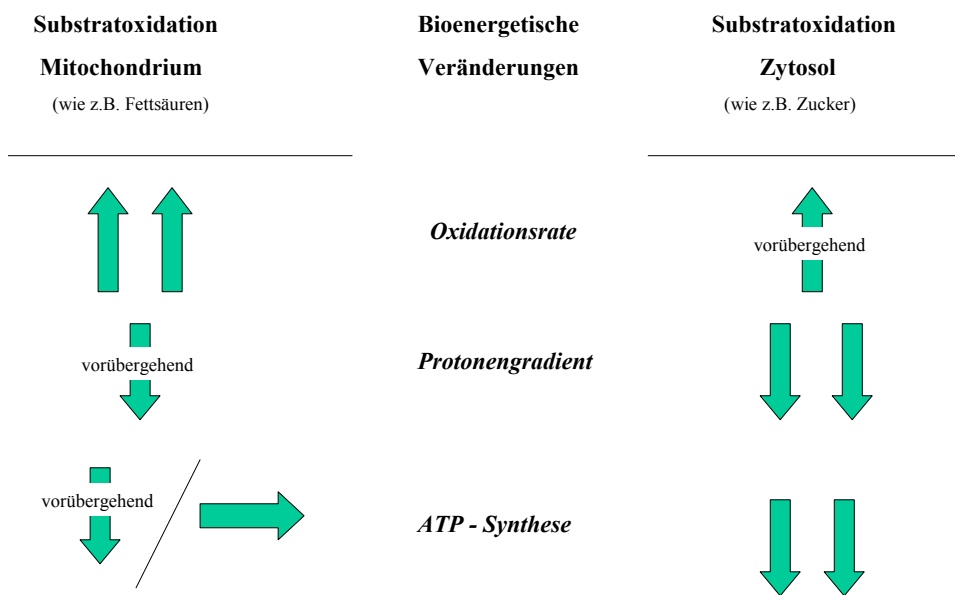


Tabelle 1: Bioenergetische Veränderungen im (isolierten) Mitochondrium nach Gabe von 2,4-Dinitrophenol (Zusammenfassung der Arbeiten von Lerverve et al. ⁵⁴⁻⁵⁷).

In vitro konnte gezeigt werden, dass bei Entkopplung von isolierten Hepatozyten in Gegenwart von Substraten, die direkt im Mitochondrium oxidiert werden (wie z.B. Fettsäuren) die Oxidationsrate langanhaltend auf einem hohen Niveau ablief. Der Protonengradient und die ATP-Synthese nahmen vorübergehend ab. Bei Substraten hingegen, die im Zytosol oxidiert werden (wie z.B. Zucker), stieg die Oxidationsrate nach 2,4-DNP-Gabe nur kurz an. Der Protonengradient und die ATP-Synthese nahmen

langanhaltend ab. Zusammenfassend lässt sich somit festhalten: unter 2,4-DNP ist die Energieverschwendung im Sinne einer gesteigerten Oxidationsrate dann am größten, wenn die Zelle mit Substraten versorgt ist, die direkt im Mitochondrium verstoffwechselt werden; der Abfall des Protonengradienten ist dann jedoch gering. Wird die Zelle jedoch mit Substraten versorgt, die primär im Zytosol verstoffwechselt werden, ist der Abfall des Protonengradienten am größten, eine Energieverschwendung findet jedoch nur initial statt. Die Arbeiten von Skulachev und Leverage et al. weisen daraufhin, wie wichtig die Berücksichtigung der Versuchsanordnung bei einem Vergleich von unterschiedlichen Arbeiten mit 2,4-DNP sind, insbesondere wenn Versuche mit isolierten Mitochondrien durchgeführt wurden.

Neben einem Einfluß auf Oxidationsrate, Protonengradient und ATP-Synthese wurden in der Literatur noch eine Aktivierung lysosomaler Funktionen durch 2,4-DNP beschrieben⁶⁰. Weitere Effekte von 2,4-DNP sind Aktivitätsänderungen bestimmter Enzyme, die mit der gesteigerten Oxidationsrate unter Dinitrophenol einhergehen: bisher wurden eine Erhöhung der cytosolischen Phosphofruktokinase, der Enolase (beide Glykolyse) und der mitochondrialen Succinatdehydrogenase (Zitronensäurezyklus) dokumentiert⁶⁰. Eine Abhängigkeit der ATPase von der 2,4-DNP-Konzentration wurde von Knowles et al. nachgewiesen. So wurde bei unterschiedlichen humanen Tumorzellen in eher niedrigen Konzentrationen (20-100 μM) die ATPase stimuliert, bei höheren Konzentrationen hingegen eher gehemmt⁶¹. Darüber hinaus konnte auch eine erhöhte CK-Freisetzung gemessen werden. Neben Veränderungen der Enzymaktivitäten wurden unter 2,4-DNP-Behandlung auch Veränderungen des Elektrolythaushalts beobachtet. Knowles et al. konnten in Versuchen mit aus Tumoren isolierten Mitochondrien ein K^+ - bzw. Mg^{2+} - Efflux messen⁶¹, Ganote et al. konnte in seinen Versuchen mit isolierten Rattenherzen einen Ca^{2+} - Efflux beobachten⁶².

Außer biochemischen Veränderungen bewirkt 2,4-DNP auch strukturelle Veränderungen der Zelle wie beispielsweise der Membranstruktur⁶⁰.

4.4. Untersuchungen mit 2,4-Dinitrophenol in vitro und in vivo

2,4-DNP wurde erstmals 1984 von Ito et al. mit der Methode der Mikrokalorimetrie untersucht. Hierbei wurde im offenen System (Rührampulle) die Wärmefreisetzung von Ehrlich Aszites Zellen (EAC) unter dem Einfluß von 2,4-DNP sowie diverser metabolischer Inhibitoren analysiert. Im Nährstoff-freien und gepufferten Medium zeigte 2,4-DNP in Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,5 mM mikrokalorimetrisch keinen Effekt auf die Wärmefreisetzung von EAC. Nach Glucose Zugabe konnte jedoch für die 0,1 mM 2,4-DNP-Konzentration eine Steigerung der Wärmefreisetzung von 6% gegenüber der Kontrolle, und für 0,5 mM 2,4-DNP eine Steigerung um 10% festgestellt werden. Als

Ursache hierfür nannten Ito et al. die freiwerdende Wärme der entkoppelten Atmungskette sowie eine verstärkte Glykolyse, die die beeinträchtigte Energiegewinnung kompensiert ³⁴.

Mit der Methode der invasiven NMR Spektroskopie führten Jucker et al. Experimente an der Skelettmuskulatur von lebenden Ratten durch, um die Aktivität von Entkopplerproteinen zu untersuchen. Eine Gruppe von Versuchstieren erhielt 4mg 2,4-DNP pro Kilogramm Körpergewicht. Die Oxidationsrate stieg hierbei um 400% an, die ATP-Synthese blieb jedoch unbeeinträchtigt. Insgesamt betrug der Grad der Entkopplung (Verhältnis ATP-Synthese/Oxidationsrate) 20% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mit höheren Konzentrationen 2,4-DNP (10-15 mg/kg) konnte eine signifikante Reduktion der ATP-Synthese gemessen werden ⁵⁰.

Ein interessantes Experiment führte Kristensen mit 2,4-DNP an humanen Fibroblasten durch: er versuchte zu klären, inwiefern sich ein durch 2,4-DNP bzw. andere metabolische Inhibitoren beeinträchtigter Energiehaushalt auf die Überlebensquote der Zellen auswirkt (gemessen mittels eines LDH-Tests). Hierbei zeigte sich kein Zusammenhang von LDH-Freisetzung und Konzentration der metabolischen Inhibitoren bzw. des 2,4-DNPs. Kristensen vermutet als Ursache hierfür, dass glykolytisch generiertes ATP eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Membranfunktion und -integrität spielt. Die Messungen mit 2,4-DNP in einer Konzentration von 1mmol/l auf Fibroblasten, die in Glucose-freiem MEM-Medium inkubiert wurden, ergaben einen Beginn der LDH-Freisetzung nach 9-10 Stunden. Die ATP-Konzentration betrug zu diesem Zeitpunkt nur noch 2% der Anfangskonzentration. Die Ratio der Adeninnukleotide $[(ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP)]$, die das Verhältnis zwischen energieverbrauchenden und energiegenerierenden Prozessen steuert, fiel nach 4 Stunden von 1 auf 0,3 ab. Wurde das Medium der Fibroblastenkultur hingegen mit Glucose angereichert, konnte im 24 Stunden Experiment keine LDH-Freisetzung in Reaktion auf 2,4-DNP beobachtet werden und die ATP-Konzentration betrug noch 75-90% der Anfangskonzentration, was auf eine gesteigerte Glykolyse zurückgeführt werden konnte ⁶³.

In einem in-vitro-Test mit Neuroblastomzellen von der Maus wirkte sich 2,4-DNP hemmend auf die Zellproliferation aus, die mittels Proteinbestimmung ermittelt wurde. Nach 24 Stunden Inkubation mit einer Konzentration von 163 μ M 2,4-DNP ergab sich eine Reduktion des Proteingehalts um 50%, ein Hemmer der Glykolyse hingegen zeigte die gleiche Wirkung jedoch schon mit einer Konzentration von 2,7 μ M. Die stoffwechselsteigernde Wirkung von 2,4-DNP konnte klar bestätigt werden ⁶⁰.

Nishizawa et al. haben im Rahmen ihrer Untersuchungen mit Melanomzellen von der Maus hinsichtlich der Auswirkung einer 2,4-DNP-Behandlung auf die Überlebensrate folgende Daten ermittelt: 8 Stunden nach 2,4-DNP-Behandlung der in PBS inkubierten Zellen starben bei einer Konzentration von 50 μ M bis 500 μ M alle Zellen ab. Beigabe von Glucose

verlängerte hingegen die Überlebenszeit; 10% FCS verhinderte sogar den zytotoxischen Effekt von 2,4-DNP im betrachteten Zeitintervall. Der ATP-Gehalt der Zellen verringerte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe bei einer Konzentration von 10 μM 2,4-DNP innerhalb von 4 Stunden um 95%. Dieser Effekt zeigte sich reversibel, da nach Waschen der Zellen und Inkubation mit frischem, FCS angereichertem Medium für zwei Stunden wieder der normale ATP-Gehalt gemessen werden konnte ⁵⁹.

Linsinger et al. fanden heraus, dass 2,4-DNP im Konzentrationsbereich von 125 μM bis 2 mM bei Jurkat Zellen das CD95-FAS-Signal verstärken können und so eine Apoptose der Zellen einleiten können ¹⁷. In weiteren Untersuchungen durch die gleiche Arbeitsgruppe konnte der Ablauf der Apoptose-Induktion näher erklärt werden und der Effekt auch für weitere Zelllinien wie CEM, HeLa oder Mitogen-stimulierte humane T- Zellen bestätigt werden ¹⁸. Daher bekräftigten die Autoren mit ihren Untersuchungen die Hypothese, dass nicht nur Signalmoleküle bei der Aktivierung von Todesrezeptoren beteiligt sind, sondern auch andere Faktoren wie das Membranpotential ⁶⁴. Sie konnten zeigen, dass dieses über den Einsatz von Entkopplern gezielt gestört werden kann und so eine Apoptose induziert werden kann ¹⁸.

5. Aspekte des Energiestoffwechsels von Tumorzellen

Im allgemeinen gilt ein verstärkter Glucoseumsatz als eine der markanten Eigenschaften von Tumorzellen. Diese Besonderheit macht man sich in der Diagnostik mit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) seit längerem erfolgreich zu Nutze⁹.

Für den hohen Glucoseumsatz der Tumorzelle ist insbesondere die sogenannte ‚aerobe Glykolyse‘ ursächlich: ähnlich wie fetales Gewebe oder hämatopoetische Zellen unterscheiden sich viele Tumorzellen maßgeblich durch eine Verschiebung der Energiegewinnung aus dem Mitochondrium in das Zytosol, wo der im allgemeinen von Tumorzellen erhöhte Energiebedarf durch eine gesteigerte Glykolyse gedeckt wird. Die Mitochondrien sind folglich nicht mehr Hauptproduktionsort von ATP⁶⁵⁻⁶⁷.

Es scheint paradox, dass Zellen, die einen hohen Energiebedarf decken müssen, den energetisch ungünstigen Stoffwechselweg der Glykolyse wählen, mittels dessen nur 5% der potentiell in Glucose verwertbaren Energie gewonnen werden⁶⁸. Das Phänomen der hohen glykolytischen Rate von Tumorzellen wurde erstmals von Otto Warburg im Jahr 1924 beschrieben⁶⁹. Die Entdeckung veranlasste ihn dazu, einen Defekt in der Atmungskette als Ursache für den veränderten Stoffwechsel zu postulieren, wobei er dies als Ursache für die Entstehung des Tumors vermutete. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden⁶⁷.

Obwohl die Besonderheit des Energiestoffwechsels vieler Tumore bereits seit einigen Jahrzehnten entdeckt wurde, ist die Ursache der aeroben Glykolyse und ihre Bedeutung für Wachstum und Proliferation der Tumorzelle ungeklärt und somit Gegenstand wissenschaftlicher Studien und Diskussionen.

Im folgenden sollen die grundlegendsten Erkenntnisse über den Energiestoffwechsel von Tumorzellen zusammengefasst werden, die im Rahmen der Arbeit interessant scheinen:

5.1. Energiegewinnung von Tumorzellen

Kennzeichen vor allem von schnell wachsenden Tumorzellen ist, wie bereits angeführt, eine gesteigerte glykolytische Energiegewinnung trotz ausreichendem O₂-Vorkommens, die sogenannte ‚aerobe Glykolyse‘. Diese Art der Energiegewinnung von Tumorzellen scheint jedoch nicht eine einzelne Ursache wie z.B. die Expression eines bestimmten Onkogens zu haben, sondern ist mit hoher Wahrscheinlichkeit multifaktoriell bedingt. Aus der entsprechenden Interaktion der verschiedenen Faktoren, die sich je nach Tumortyp, Differenzierungsgrad und Wachstumsverhalten unterschiedlich gestaltet, resultiert schließlich die spezifische, ‚individuelle‘ Ausprägung des Stoffwechsels, wobei diese mit dem Grad der Malignität korreliert^{65,66,70,71}.

Zu den Faktoren, die zur aeroben Glykolyse von Tumorzellen beitragen, zählen:

- **Veränderte Enzymaktivitäten** ^{65,66,70,72}: Eine hohe glykolytische Kapazität wird durch verstärkte bzw. veränderte Enzymaktivitäten von Hexokinase (Mitochondrien-gebundene Form), Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase (M2) gewährleistet. Die Hexokinase ist direkt an das Mitochondrium gebunden und ist so durch den direkten Zugang zu ATP stimuliert. Auf diese Weise werden große Mengen Glucose-6-Phosphat in das glykolytische System eingespeist. Die kontinuierliche Phosphorylierung der Glucose reduziert den Phosphat-Level und hemmt somit eine effektive Tätigkeit der oxidativen Phosphorylierung. Die Pyruvatkinase weist eine geringere Affinität für ihre Substrate auf und bedingt somit eine Akkumulation insbesondere von Phosphoenolpyruvat und Fructose-1,6-Biphosphat. Auf diese Weise wird der ATP-hemmende Effekt auf die Glykolyse aufgehoben und die Pyruvatkinase aktiviert. Eine erhöhte Laktatproduktion der Tumorzellen liegt unter anderem daran, dass um die 90% des glykolytischen Pyruvat zu Laktat reduziert werden, anstatt im Zitronensäure-Zyklus oxidiert zu werden. Als Ursache hierfür wird eine veränderte Pyruvat-Dehydrogenase vermutet, die in Tumorzellen maßgeblich an der Entgiftung von Acetaldehyd beteiligt ist. Ein weiterer Faktor für den schnellen Ablauf der aeroben Glykolyse scheint eine erhöhte Verfügbarkeit von ADP im Cytoplasma zu sein. Für die Bereitstellung des ADP wird der membranständigen Na/K-ATPase, die das in der Glykolyse gebildete ATP abbaut, eine besondere Bedeutung zugewiesen, da der Kontrollmechanismus gestört sein soll, der für eine enge Kopplung zwischen Glykolyse und ATPase-Aktivität verantwortlich ist. Durch das erhöhte Vorkommen von ADP wird zudem der Zitratzyklus stimuliert, was schließlich auch die Protein-Synthese z.B. durch Versorgung mit Aminosäuren fördert.
- **Veränderte Membrantransportprozesse** ^{9,65,66,72}: Eine verstärkte Diffusion von Glucose in die Zelle wird durch einen hohen Glucose-Gradienten zwischen Blut und Tumorzelle erreicht: dieser wird durch eine verstärkte Hexokinase-Aktivität gefördert, indem diese die Konzentration an Glucose in der Zelle niedrig hält. Zudem wird die erhöhte Glucosekonzentration in der Zelle durch Überexprimierung spezifischer Transporter (insbesondere GLUT 1 und 3) gefördert. Für die mitochondriale Oxidation von generiertem NADH werden in normalen Zellen die Elektronen dieses Coenzym entweder durch den Glycerol-Phosphat-Transporter, den Malat-Aspartat-Transporter oder den Fettsäuren-Zyklus in das Mitochondrium transportiert. In Tumoren scheinen diese Transporter jedoch in ihrer Funktion beeinträchtigt zu sein, so dass die Tumorzelle das NADH im Zytosol mittels Laktatproduktion reoxidiert.

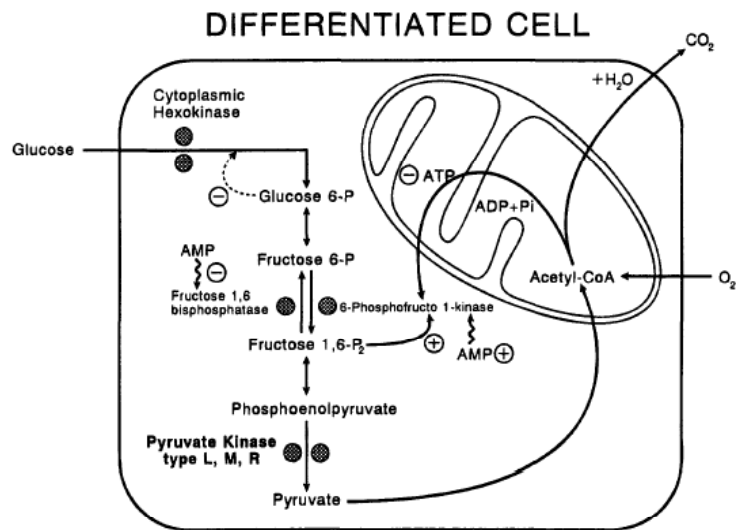


Abbildung 8: Regulation der Glykolyse in differenzierten Zellen (nach Mazurek et al.,⁶⁸)

Glucose wird über spezifische Transporter in die Zelle aufgenommen und dort enzymatisch zu Glucose-6-Phosphat und schließlich Pyruvat umgewandelt, wobei pro Mol Glucose 2 ATP generiert werden. Bei ausreichendem Sauerstoffvorkommen wird Pyruvat zu HCO_3 oxidiert, wobei hierbei 36 zusätzliche ATP gewonnen werden. Ist kein Sauerstoff vorhanden, wird Pyruvat zu Laktat umgewandelt.

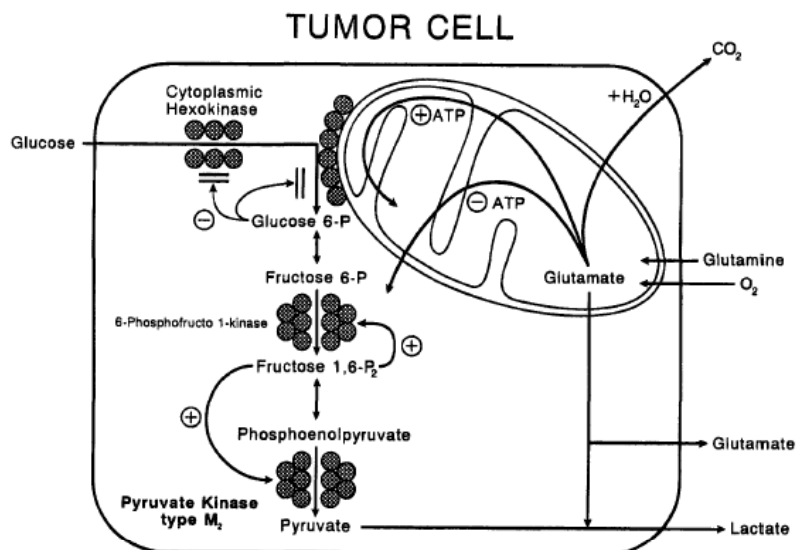


Abbildung 9: Regulation der Glykolyse in Tumorzellen (nach Mazurek et al.,⁶⁸)

In Tumorzellen sind die Enzymaktivitäten von Hexokinase, 6-Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase verstärkt bzw. verändert, zudem ist die Steuerung der Enzyme über Rückkopplungsmechanismen gestört, so dass daraus eine hohe glykolytische Kapazität resultiert. Eine mitochondriale Steuerung der Glykolyse nach Energiebedürfnis findet nicht statt und die Glykolyse ist somit unabhängig von einer adäquaten Sauerstoffversorgung.

- Funktionsbedingte Wachstumskontrolle ^{65,66,71}: Eine hohe glykolytische und geringe respiratorische Aktivität kann nach der Hypothese von Newsholme et al. als Teil eines Kontrollmechanismus verstanden werden, der eine effektivere Steuerung der Synthese von für die Proliferation relevanten Makromolekülen gestattet.
- Morphologische und strukturelle Veränderungen ^{65,66,73,74}: Eine Verschiebung der Energiegewinnung von der oxidativen Phosphorylierung hin zur aeroben Glykolyse wird neben den biochemischen Veränderungen auch durch ein geringes Vorkommen an Mitochondrien in Tumorzellen begünstigt. Darüber hinaus scheint auch eine veränderte Morphologie und Ultrastruktur der Mitochondrien in Tumorzellen für eine verringerte respiratorische Kapazität verantwortlich zu sein. Auch wenn bestimmte Tumore zwar Veränderungen an Enzymen oder einzelnen Komponenten der Atmungskette aufweisen, scheint jedoch ein genereller Defekt der Atmungskette in Tumorzellen nicht vorzuliegen.

Für das Charakteristikum von Tumorzellen, einem erhöhten Glucose Umsatz, zeichnet sich jedoch nicht nur die aerobe Glykolyse verantwortlich, sondern auch Veränderungen des Pentose-Phosphatwegs. Coy et al. gelang es kürzlich Mutationen der Transketolase, einem Schlüsselenzym des Pentose-Phosphatwegs, nachzuweisen: das sogenannte Transketolase-1 Enzym ist in Tumorzellen überexprimiert ³. Dies erlaubt Tumorzellen eine verstärkte nicht-oxidative Verstoffwechslung von Glucose und eine verstärkte Produktion von Metaboliten für die Nukleinsäuresynthese und ermöglicht ihnen dadurch ein aggressives Wachstum.

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass die veränderten Stoffwechselwege von Tumorzellen zugunsten eines erhöhten Glucose-Umsatzes ein Überleben und Wachstum des Tumors unter Bedingungen erleichtern, wo Sauerstoff und Nährstoffe knapp sind. Neben der Energiegewinnung produzieren die veränderten Enzyme der Glykolyse oder des Pentose-Phosphatwegs außerdem ein ständig ausreichendes Pool an Metaboliten, die für synthetische Prozesse und damit für die Proliferation der Zellen essentiell sind. Entsprechend konnte in der G1-Phase der Zellproliferation eine Hochregulation bestimmter Enzyme wie insbesondere Hexokinase und Pyruvatkinase gemessen werden ⁶⁸, wobei Glucose eine Schlüsselrolle bei der Enzyminduktion zu spielen scheint ⁷⁴. Eine hohe glykolytische Aktivität begünstigt darüber hinaus auch Zellmigration, was Mazurek et al. dazu leitet, eine direkte Verknüpfung von Migration und veränderten Enzymaktivitäten zu postulieren ⁶⁸. Zudem resultieren aus der Akzentuierung der aeroben Glykolyse weitere Vorteile. Eine ständig auf einem hohen Niveau ablaufende Glykolyse bedingt ein saures Milieu um den Tumor. Es konnte gezeigt werden, dass dies einen entscheidenden

Wachstumsvorteil für den Tumor darstellt, da dieser auf Grund ausgebildeter Schutzmechanismen dem sauren Milieu widerstehen kann, benigne Zellen jedoch nicht ⁹. Der anders gestaltete Stoffwechsel der Tumorzelle hilft jedoch auch schon bei der Entstehung der Tumorzelle, da die frühe Karzinogenese in einer avaskulären Umgebung stattfindet und so dennoch eine adäquate Energieversorgung gewährleistet werden kann ⁹. Brand et al. schließen außerdem aus ihren Experimenten, dass die aerobe Glykolyse auch eine Schutzfunktion für die Tumorzelle darstellt, da sie durch den nicht-oxidativen Abbau von Glucose das Risiko einer übermäßigen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) während der kritischen Phasen einer verstärkten Biosynthese und Zellproliferation reduziert. Zudem weisen sie daraufhin, dass das vermehrt gebildete Pyruvat als Antioxidanz wirkt ⁷⁵.

5.2. Substrate eines veränderten Energiestoffwechsels

Tumorzellen sind nicht auf bestimmte Stoffwechselsubstrate angewiesen: Glucose, Fettsäuren und Aminosäuren können von ihnen verwertet werden, wobei sich das Spektrum jedoch nach Tumortyp, aber auch je nach Entwicklungsstadium des einzelnen Tumors unterscheidet ⁶⁵. Baggetto beschreibt in diesem Zusammenhang Tumorzellen als hocheffiziente Systeme, die unterschiedlichste Nährstoffe erschließen können, diese dann aber höchst ineffizient verstoffwechseln ⁷⁰. Als Resultat dieses erfolgreichen Wettbewerbs um das Nährstoffangebot des Körpers kommt es somit auch zu Veränderungen im gesamten Stoffwechsel und Hormonhaushalt, wie beispielsweise einer verstärkten Gluconeogenese. Insgesamt versetzt der Abzug von Stoffwechselmetaboliten durch den Tumor den Körper in eine Art Hungerzustand, wobei jedoch im Vergleich zu einem physiologischen Hungerzustand keine Reduktion des Sauerstoffverbrauchs bzw. der Kohlendioxidproduktion zu beobachten ist ⁶⁵.

Als wichtiger Stoffwechselmetabolit gilt für Tumorzellen im allgemeinen neben Glucose vor allem Glutamin, das als ein Hauptmetabolit des Zitronensäure-Zyklus fungiert. Mittels einer intramitochondrialen Glutaminase wird Glutamin zu Glutamat transformiert, das wiederum zu α -Ketoglutarat transaminiert und als solches in den Zitronensäure-Zyklus eingespeist wird. Das NAD(P⁺) Malat Enzym oxidiert das in das Mitochondrium eingeschleuste Malat zu Pyruvat, um so einen Acetyl-CoA Bestand zu generieren, der in den Zitronensäure-Zyklus eingespeist werden kann ^{76,76}.

Da Citrat maßgeblich für eine zytoplasmatische Cholesterol- und Fettsäure-Synthese verwendet wird und daher nicht im Zitronensäure-Zyklus zu CO₂ oxidiert wird, füllt das durch den Glutaminabbau gewonnene α -Ketoglutarat die entstehende Lücke und gewährleistet somit den Ablauf des Zitronensäure-Zyklus ^{68,70}.

Glutamin ist jedoch nicht nur für die Energiegewinnung wichtig, sondern erfüllt beispielsweise als Substrat für die Pyrimidin- und Protein- Synthese eine wichtige Rolle für die Tumorzellproliferation ^{65,68}. Generell gilt, dass der glutaminolytische und glykolytische Stoffwechsel umso mehr aufeinander abgestimmt sind, je undifferenzierter die Tumorzelle ist ⁷⁰. Mazurek weist noch daraufhin, dass auf Grund hoher gemessener Glutamin-Level in Tumorgewebe Tumorzellen auch bei einer Limitierung von Glucose lebens- und proliferationsfähig sind ⁶⁸. Eine aufwendige Untersuchung von Guppy et al. relativiert jedoch die in Publikationen häufige enorme Bedeutungszuweisung der Metabolite Glucose und Glutamin für die Energiegewinnung von Tumorzellen, da diese einen Anteil von nur knapp 40% am gesamten ATP-Umsatz für Glucose und Glutamin ergeben hat ⁷⁷.

5.3. Bedeutung der oxidativen Phosphorylierung für die Tumorzelle

Die aerobe Glykolyse hat in Tumorzellen einen ungewöhnlich großen Anteil an der Energiegewinnung ^{65,66,68,70}, in Ehrlich Ascites Zellen beträgt dieser sogar 50% ⁶⁵. Ein noch immer ungeklärtes Paradox ist, dass trotz der offensichtlich geringen Bedeutung der oxidativen Phosphorylierung für die Energiegewinnung eine verstärkte Transkription nukleärer und mitochondrialer Gene der Enzyme der oxidativen Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte ⁷³.

Die große Anzahl an wissenschaftlichen Untersuchungen, die sich mit dem Charakteristikum der aeroben Glykolyse unter den verschiedensten Fragestellungen auseinandersetzen, kann leicht den Anschein erwecken, dass in Tumorzellen eine oxidative Phosphorylierung eine nur unbedeutende Rolle spielt ⁷⁷. Doch Kondo konnte sogar schon 1979 für Melanomzellen der Maus mittels Untersuchung von Stoffwechselmetaboliten eine aktive Funktion der oxidativen Phosphorylierung nachweisen, deren Qualität sich nicht maßgeblich von normalem Gewebe unterschied ⁷⁸. Knowles weist in seiner Arbeit ausdrücklich darauf hin, dass vereinzelte Untersuchungen vermuten lassen, dass Tumorzellen im allgemeinen durchaus auch Energie über den Stoffwechselweg der oxidativen Phosphorylierung generieren ⁷⁹. Dies wird von einer aufwendigen Untersuchung mit einer Mamma-Karzinom Zelllinie von Guppy et al. bestätigt: Im Langzeitversuch über 5 Tage wurde ein Beitrag der oxidativen Phosphorylierung an der gesamten ATP-Produktion in Höhe von 80% gemessen, wobei Glucose 10%, Glutamin 14%, Palmitat 7%, Oleat 4% und unbekannte Metaboliten 65% dazu beitrugen. Der glykolytische Anteil an der gesamten ATP-Produktion betrug hingegen nur 20%. Guppy et al. merken hierzu kritisch an, dass der Anteil der glykolytischen Aktivität in vivo insbesondere in hypoxischen Situationen sehr wohl höher sein kann. Eine hohe glykolytische Aktivität aber im allgemeinen als Charakteristikum von Tumorzellen anzusehen halten sie für vermessen ⁷⁷.

6. Alternative Therapieansätze der Krebsforschung

6.1. Therapieansätze am Mitochondrium, insbesondere am Energiestoffwechsel

Die konventionelle Chemotherapie mit ihrem bevorzugtem Ansatzpunkt an der DNA-Replikation schnell proliferierender Zellen weist bisher nur eingeschränkte Erfolge auf, insbesondere da sie die spezifische Ausprägung von Tumorzellen nicht ausreichend berücksichtigt. Forschung, die sich auf vielversprechende bisher weitestgehend unbearbeitete molekulare Ansatzpunkte wie beispielsweise Plasmamembran, Mitochondrien oder Stoffwechsel stützt, ist daher dringend nötig^{6,80,81}. Insbesondere der Energiestoffwechsel als Ansatzpunkt der Tumorthherapie ist seit kurzer Zeit wieder in den Fokus des Interesses gerückt, nachdem jahrzehntelang nur vereinzelt Forschung auf diesem Gebiet stattfand^{4,9,10}. Im folgenden sollen einige interessante therapeutische Ansätze am Mitochondrium und insbesondere am Energiestoffwechsel der Zelle vorgestellt werden:

Seit längerem ist bekannt, dass Mitochondrien beim programmierten Zelltod, der Apoptose, eine bedeutende Rolle spielen: so führen beispielsweise der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials oder eine Störung des Energiestoffwechsels zur Aktivierung von Caspasen und somit zur Apoptose. Da aber gerade Tumorzellen gegen Apoptose durch eine vermehrte Produktion von sog. anti-apoptischen *Bcl-2* Proteinen besser geschützt sind, beschäftigen sich mehrere Ansätze mit der Entwicklung von Antagonisten dieser Schutzproteine⁴.

Die Rolle des Membranpotentials für die Induktion der Apoptose versuchte sich eine Vielzahl von Arbeiten zu Nutze zu machen, die sich mit *MKT-077* beschäftigten, einem neu synthetisierten Wirkstoff. Dieser gehört zu der Gruppe der *DLCs* (delocalized lipophilic cation), deren spezifischer Wirkmechanismus jedoch weitestgehend ungeklärt ist. *MKT-077* zeigte in *in vitro* und *in vivo* Experimenten eine antitumoröse Aktivität durch Störung der morphologischen und funktionellen Integrität der Mitochondrien von Tumorzellen, unter anderem eine Inhibierung des Energiestoffwechsels. Der lipophile Wirkstoff, der selektiv von den Mitochondrien der Tumorzellen aufgenommen wird, galt nach aufwendigen Screening-Programmen von allen *DLCs* am vielversprechendsten hinsichtlich Wasserlöslichkeit, unerwarteter Effekte, Toxizität, Wirkung und Pharmakokinetik. Die Selektivität von *MKT-077* und anderer *DLCs* wird auf das erhöhte Membranpotential von Tumorzellen zurückgeführt. Koya wies allerdings daraufhin, dass noch weitere Faktoren hierbei eine Rolle spielen müssen, da auf die Herzmuskelzellen, die ebenfalls ein erhöhtes Membranpotential aufweisen, in den *in vivo* Versuchen kein toxischer Effekt nachgewiesen werden konnte. In Phase 1 Studien der klinischen Testung zeigte sich jedoch eine erhöhte Nephrotoxizität, so dass diese abgebrochen werden mussten.

Ein anderer *DLC*, *Deca*, zeigte ebenfalls *in vitro* und *in vivo* antitumoröse Aktivität. Im Tumormodell (humanes Ovarialcarcinom) an der nackten Maus zeigte sich *Deca* in Kombination mit Cisplatin überlegen, die Überlebenszeit gegenüber Cisplatin allein stieg von 50 auf 200 Tage. Bei *in vitro*-Testung an Cisplatin-resistenten humanen Ovarialcarcinomzellen konnte nach Zugabe von *Deca* die Resistenz überwunden werden. Außerdem konnte bei *in vitro*-Testungen an humanen Ovarialcarcinomzellen gezeigt werden, dass mit *Deca* die erforderliche Cisplatin Dosis um das 90-fache gesenkt werden konnte⁸².

Gegenstand momentaner Untersuchungen mit *DLCs* ist *F16*, der ebenfalls in den Mitochondrien akkumuliert und der durch Verschwendung des Protonengradienten zu einer Inhibierung der oxidativen Phosphorylierung führt. In Versuchen mit u.a. humanen Mamma-Ca Zellen konnte nachgewiesen werden, dass *F16* auf diese Weise eine Öffnung der sog. *mitochondrial permeability transition* bedingte, also eine erhöhte (innere Mitochondrien)-Membranpermeabilität verursachte, und über eine Freisetzung von Cytochrom c schließlich zur Apoptose der Zellen führte^{4-7,81,83-85}.

Nieminen et al. konnten in Versuchen mit isolierten Hepatozyten von Ratten nachweisen, dass eine u.a. durch den Entkoppler *CCCP* bedingte Reduktion des ATP-Pools um mehr als 20% zum Absterben von Zellen führt. Die Inhibierung der zellulären ATP-Formation schien hierbei eine wichtigere Rolle als ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials zu spielen, da Fructose durch glykolytische ATP-Produktion das Zellsterben verhindern konnte⁸⁶.

Ursache hierfür könnte sein, dass ein erfolgreicher Ablauf des Zellzyklus eine ausreichende ATP-Versorgung erfordert, da wie Sweet et al. zeigen konnten, verschiedene Phasen des Zellzyklus unterschiedliche Energiebedürfnisse haben. So resultierte in ihren Versuchen eine durch Entkoppler bedingte Erniedrigung des zellulären Gesamt-ATP um 15% bzw. 35% in einer Akkumulation der Zellen in der G₁ bzw. G₂ Phase; eine weitere Erniedrigung wirkte zytotoxisch⁸⁷. Die Vermutung, dass Wachstumsphasen unterschiedliche Energiebedürfnisse aufweisen und folglich der Zellzyklus nur bei jeweils ausreichenden Energiepools voranschreitet, konnte von Dorward et al. in ihren Untersuchungen bestätigt werden⁸².

Hamilton et al. untersuchten *in vitro* die Wirkung von Doxorubicin in Kombination mit Inhibitoren der Glykolyse und konnten zeigen, dass eine Kombinationstherapie mit Substanzen, die den Energiehaushalt stören, von großem therapeutischen Nutzen sein kann¹¹: das Zellsterben war in Kombination mit Inhibitoren der Glykolyse wie beispielsweise Oxamat signifikant höher. Da der Eingriff in den Energiestoffwechsel zu einem Abfall des ATP-Pools führte, vermuten die Autoren, dass der synergistische Effekt aus einer Störung der zellulären Reparaturfunktion resultierte¹¹. Substanzen, die in den

Energiestoffwechsel der Zelle eingreifen und zu einer Reduktion des ATP-Pools führen, können aber nicht nur physiologische Zellabläufe beeinträchtigen, sondern auch zum Zelltod führen. Eguchi et al. zeigten mit ihren in vitro Versuchen, dass nach Störung des Energiehaushaltes - je nach intrazellulärem ATP-Bestand - Apoptose oder Nekrose resultieren⁸⁸.

Neben dem ATP-Bestand scheinen jedoch auch bestimmte Metabolite eine Auswirkung auf das Zellüberleben zu haben. Petronni et al. konnten in ihren Experimenten mit einer leukämischen Zelllinie nachweisen, dass auf Grund einer Glutaminausdehnung des Mediums nach 24 Stunden Zellwachstum sistiert und vermehrt Apoptosen beobachtet werden können⁸⁹.

Eine Strategie, die sich die hohe glykolytische Aktivität von Tumorzellen zu Nutze macht, besteht in der Ansäuerung von Tumorgewebe durch orale oder i.v. Gabe von Glucose. Etablierte Verfahren wie Hyperthermie oder der Einsatz von alkylierenden Substanzen können dadurch optimiert werden⁹⁰.

Ein sehr interessanter und im Tiermodell bereits erfolgreicher Ansatz wird von Martin et al. in seinen Übersichtsarbeiten vorgestellt^{12,13}: Ein generelles Problem von meist die DNA schädigenden Chemotherapeutika ist, dass Tumorzellen von geringerer Sensitivität nur subletal geschädigt werden. Ein Effekt der Chemotherapeutika, die Inhibierung der Glykolyse durch die Aktivierung eines entsprechenden Enzyms, führt zwar zu einer Reduktion des ATP-Pools der Zellen, diese reicht jedoch nicht aus, um eine Nekrose der Zellen einzuleiten, da Nekrosen erst ab sehr geringen ATP-Leveln in Höhe von ungefähr 15% des Normwertes eintreten. Genau hier setzt ein neuer therapeutischer Ansatz an, der versucht, durch weitere Reduktion des ATP-Pools die kritische Schwelle zu erreichen, mit der eine Nekrose bei insbesondere der nur subletal geschädigten Zellen einsetzt. In Verbindung mit unterschiedlichen Chemotherapeutika zeigte die Kombinationsapplikation von *6-Aminonicotinamid*, einem NAD-Antagonist, der die glykolytische ATP-Produktion hemmt, *MMPR*, einem Hemmer der Purin de novo Synthese und somit ein limitierender Faktor für die Adenin-Bereitstellung für die ATP-Synthese, und *PALA*, ein Wirkstoff, der die Pyrimidin-Spiegel senkt, im Tiermodell beachtliche Tumorregressionen, die deutlich höher lagen als bei Einzelapplikation der die ATP- bzw. Pyrimidin-Bestände reduzierenden Wirkstoffe. Dies zeigt, dass zumindest im Tiermodell eine parallele biochemische Modulation des Energiestoffwechsels von Tumorzellen nachhaltig die Effizienz von Chemotherapeutika positiv beeinflussen kann^{12,13}.

Einen Überblick über den momentanen Forschungsstand hinsichtlich weiterer mitochondrialer Therapieansätze bieten zudem die Übersichtsarbeiten von Preston et al. sowie von Dias et al.^{4,91}.

6.2. Möglichkeiten und Grenzen der Hyperthermie

Die Hyperthermie ist ein etabliertes Verfahren, das unterstützend in der Krebstherapie, meist in Kombination mit Bestrahlung, angewendet wird²¹. Verschiedene randomisierte Studien haben für bestimmte Tumorerkrankungen gezeigt, dass die Hyperthermie eine Strahlentherapie in ihrer lokalen Wirkung verstärken und lokale Tumorkontrolle, Remissionen oder sogar den Überlebensgewinn deutlich verbessern kann²⁰. Aber auch die Wirksamkeit bestimmter Chemotherapeutika wie alkylierende und platinhaltige Substanzen kann durch den Einsatz von Hyperthermie erfolgreich gesteigert werden^{21,92}. Hyperthermie alleine zeigte hingegen in Studien nur sehr begrenzte Erfolge^{20,21}.

Bisher sind im Rahmen von in vitro und in vivo Versuchen eine Vielzahl an Effekten einer Hyperthermie beschrieben worden. Im allgemeinen wiesen verschiedene experimentelle Untersuchungen in vitro und in vivo einen direkten (selektiven) toxischen Effekt auf Tumorzellen bei Temperaturen zwischen 41° bis 47°C nach, wobei eine Temperatur von 43°C offenbar als entscheidende Schwelle für eine schnelle Induktion von Zelltod anzusehen ist^{19,21}. Nach wie vor unklar sind die, der Hyperthermie zu Grunde liegenden Mechanismen; vieles weist darauf hin, dass diese multifaktoriell bedingt sind¹⁹.

Im folgenden soll eine Auswahl an bisher beschriebenen Effekten der Hyperthermie vorgestellt werden, die von Hildebrandt in einem Übersichtsartikel zusammengefasst wurden¹⁹:

- Denaturierung von zytoplasmatischen und Membranproteinen
- Hemmung der de novo Synthese von RNA und DNA Molekülen ab Temperaturen von über 42°C
- Beeinträchtigung der Reparaturfähigkeit von DNA-Schäden, was die Wirksamkeit der Hyperthermie in Kombination mit der Strahlentherapie erklärt
- Abhängigkeit der Wärmesensitivität vom Zellzyklus: vor allem während der Mitose sind Zellen besonders empfindlich für Wärme
- Abhängigkeit der Durchblutung von Tumorgewebe von der Temperatur: über 42°C wurde eine Minderdurchblutung, unter 42°C hingegen eine bessere Blutversorgung festgestellt

Die Tumor-Selektivität der Hyperthermie ist auf die charakteristischen Unterschiede zwischen normaler und Tumorphysiologie zurückzuführen¹⁹: Hierfür werden insbesondere verantwortlich gemacht die durch mangelnde Blutversorgung niedrigen Sauerstoffpartialdrücke und der durch den Stoffwechsel bedingte niedrige pH in Tumorgewebe.

Einen detaillierten Überblick über den Stand der Hyperthermie bieten die Übersichtsartikel von Wust et al. und van der Zee^{20,21}.

7. Ziel der Arbeit

Im Rahmen des Forschungsprojektes *„Investigation of representative tumor- and normal cell lines to estimate the influence of an uncoupling agent for the oxidative phosphorylation“* sollte die Frage beantwortet werden, ob - und wenn ja, in welchen Dosierungen - 2,4-Dinitrophenol, ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, bei malignen im Vergleich zu benignen Zelllinien die Wärmeproduktion signifikant erhöht.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte daher ein Modell für die mikrokalorimetrische Analyse von 2,4-Dinitrophenol entwickelt werden. Das Modell musste den Anforderungen einer groß angelegten Studie gerecht werden, da mit diesem Modell eine Vielzahl an Zelllinien auf die Wirkung unterschiedlicher Dosisstufen 2,4-Dinitrophenol untersucht werden sollten, um schließlich eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für 2,4-Dinitrophenol beschreiben zu können.

Nachdem ein adäquates Messsystem etabliert war, sollte mit diesem ein Testdurchlauf mit 4 Zelllinien und 5 Dosisstufen erfolgen. Mit diesen Daten sollte schließlich eine geeignete Methodik für eine aussagekräftige Datenanalyse entwickelt werden, die es gestattet, die Wärmeproduktion unterschiedlicher Zelllinien unter unterschiedlichen Dosisstufen 2,4-Dinitrophenol zu vergleichen.

8. Material und Methoden

8.1. Material

8.1.1. Geräte

Zellkulturausstattung

Sterilwerkbank	SterilGARD® Class II TypA/B3
Brutschrank	Incubator NAPCO 5420-1
Lichtmikroskop	Leica® DM IRB
Zählkammer	Brand® Neubauer-Zählkammer Tiefe 0,1mm Fläche 0,0025mm ²
Zentrifuge	Hettich® Universal 16R
Pipettierhilfen	Brand® accu-jet, Eppendorf® Unipipetten 3190, Messpipetten
Elisa-Reader	MRX Dynex®
Vortexgerät	Ika-Works®

Mikrokalorimeterausstattung

Mikrokalorimeter	ThermoMetric 2277 Therma Activity Monitor, Haake GH, Haake D 1 Fa. C3-Analysentechnik
MS-DOS Programm	Digitam 2.0
Ultraschallreiniger	Bandelin® Sonorex RK 100
Stahlampullen	Sonderanfertigung, Fa. ThermoDux
Teflonabdichtungen	PTFE seal discs 5 ml
Plättchen	Deckgläschen Diatec®: Sonderanfertigung 4x1, 2x1 und 1x1 cm

8.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien (geordnet nach Herstellern)

Biochrom®	PBS Dulbecco
Merck®	Triton X-100
Sigma®	Trypanblue Solution 0,4%, 2-4-Dinitrophenol
Roche®	LDH-Test-Kit
Seromed®	Trypsin EDTA 0,1% 70% Ethanol

Verbrauchsmaterial (geordnet nach Herstellern)

Eppendorf®	Pipettenspitzen
Greiner®	Cellstar® PP-Test tubes, sterile, 15 ml,
Hartmann®	Pehazell® Zellstoff
Nunc®	Mikrotiterplatten
TPP®	Zellkulturflasche 75 cm ² ; Zentrifuge Rörchen, Gamma-sterilisiert

8.1.3. Zellen und Zellkulturmedien

Zellen:	Teratocarcinomzellen pA1 : ATCC®
	Mamma-Karzinom Zellen BT20 : Cellsystems®
	Nabelschnurendothelzellen HUVEC: Cellsystems®
	Keratinozyten: Primärkultur aus Vorhautpräparaten (Universitäts-Hautklinik Würzburg)
Zellkulturmedien:	RPMI-1640: Biochrom®
	EGM: Clonetics Bio-Whittaker®
	FCS: PAN®
	Gentamycin: Biochrom®

8.2. Methoden

8.2.1. Zellkultur und Monolayer-Anzucht

Alle Arbeiten wurden grundsätzlich unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Zellkultur-Werkbank durchgeführt.

Vorbereitung Medien:

Nährmedium PA ₁ -Zellen:	RPMI 1640 mit 10% FCS und Gentamycin (25 mg/l)
Nährmedium HUVEC-Zellen:	EGM Komplettmedium
Nährmedium BT20-Zellen:	RPMI 1640 mit 10% FCS und Gentamycin (25 mg/l)
Nährmedium Keratinozyten:	EGM Komplettmedium

Zellkultur-Anzucht

Die Zellen wurden mit 10 ml des entsprechenden Nährmediums in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wuchsfläche in Kultur genommen, im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und schließlich bei konfluentem Bewuchs passagiert.

Plättchen-Vorbereitung und Passage

Die Plättchen wurden in 70%-iger Ethanollösung gereinigt und mit einfach destilliertem Wasser nachgewaschen. Im Anschluß daran wurde jedes Plättchen in ein Glasröhrchen mit Kappe übertragen; dieses wurde anschließend autoklaviert und im Trockenschrank getrocknet.

Zur Aussaat der Zellen in die vorbereiteten Röhrchen wurde das Nährmedium der Zellkulturflasche abpipettiert, nachdem diese auf ausreichenden Bewuchs sowie Pilze bzw. Kontamination kontrolliert war.

Nach Waschen der Zellen mit 10ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) - um FCS-Reste zu entfernen - wurde die Zellkultur mit 1ml Trypsin-Lösung im Brutschrank für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die gelösten Zellen mit 10ml PBS aufgemischt und in ein 15ml Plastikröhrchen überführt.

Um die Zellzahl der Suspension zu bestimmen, wurde eine 1:2 Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert, die unter dem Lichtmikroskop ausgewertet wurde. Die Zellzahl der Suspension wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{[(\text{Anzahl gezählte Zellen}) \cdot 2 \cdot (\text{Gesamtmenge der Suspension}) \cdot 10000]}{\text{Anzahl der ausgezählten Grossquadrate}}$$

Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 260x g zentrifugiert; anschließend wurden der Überstand verworfen und die Zellpellets mit 10ml Nährmedium gründlich resuspendiert.

Die Zellen wurden in fünf vorbereitete Glasröhrchen ausgesät und im Brutschrank mit einer Schräge von 45° inkubiert.

Die restliche Suspension wurde zurück in die Zellkulturflasche pipettiert und auf insgesamt 15ml Nährmedium angereichert und im Brutschrank bis zur nächsten Passage inkubiert.

8.2.2. Ansatz der 2,4-Dinitrophenol-Lösung

2,4-DNP ist in Glukose-freier Locke's Lösung löslich⁹³. Diese wurde wie folgt angesetzt:

NaCl 9g, KCl 0.42g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.31g, NaHCO_3 0.2g, A. bidest ad 1 Liter

CaCl_2 wurde erst in die Lösung gegeben, nachdem die anderen Salze gelöst waren, da sonst schwerlösliches $\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$ entsteht. Die Überprüfung der Lösung im Mikrokalorimeter fiel negativ aus: es zeigten sich keine Wärmeeffekte.

2 g 2,4-DNP wurden in 1 Liter Locke's Lösung gelöst. Über den mittleren Wassergehalt (20%) von 2,4-DNP errechnete sich eine 2,4-DNP-Konzentration von $9\mu\text{mol/ml}$.

Insgesamt wurde im Rahmen dieser Arbeit mit 4 Dosisstufen 2,4-DNP gearbeitet (zzgl. der Nulldosis). Diese wurden wie folgt angesetzt:

- Dosisstufe $12.5\mu\text{mol/l}$: 1.375 μl gelöstes 2,4-DNP pro ml Medium
- Dosisstufe $25\mu\text{mol/l}$: 2.75 μl gelöstes 2,4-DNP pro ml Medium
- Dosisstufe $50\mu\text{mol/l}$: 5.5 μl gelöstes 2,4-DNP pro ml Medium
- Dosisstufe $100\mu\text{mol/l}$: 10.1 μl gelöstes 2,4-DNP pro ml Medium

8.2.3. Mikrokalorimetrie

Die Messungen wurden in einem isothermalen Mikrokalorimeter Typ TAM 2277 (Batchkalorimetriesystem der Firma *Thermometric*, Schweden) durchgeführt. Für die Proben wurden Stahllampullen verwendet, die vor jeder Messung mit einer neuen Teflondichtung im Deckel versehen wurden. In methodischen Untersuchungen hinsichtlich

mikrokalorimetrischer Messungen im Submikrowattbereich von Thoren et al. zeigten weder Stahllampullen noch Teflondichtungen in Verbindung mit MEM -Medium einen Einfluß auf die Wärmefreisetzung⁹⁴. Die auf Grund im Medium stattfindender Oxidationsprozesse bedingte Wärmefreisetzung wurde vernachlässigt, da sie mit 0,1 µW / ml für MEM -Medium gering ist⁹⁴.

Die Messkanäle des Geräts wurden in regelmäßigen Abständen geeicht, um verlässliche Ergebnisse sicherzustellen. Um darüber hinaus eine kontinuierliche Funktion über die unterschiedlichen Jahreszeiten zu gewährleisten, wurde die Raumtemperatur durch Einsatz einer Klimaanlage auf konstante 24°C gehalten.

Vorbereitung der mikrokalorimetrischen Messung

Die Zeitdauer, bis die Plättchen einen konfluenten Bewuchs aufwiesen, variierte je nach verwendeter Zellart. Es ergaben sich folgende Zeiten: PA₁-Zellen und BT20-Zellen: je 24 Stunden; HUVEC-Zellen und Keratinozyten: je 72 Stunden.

Die mit Ultraschall und Alkohol gereinigten sowie gründlich trocken geriebenen Stahllampullen wurden mit 3,6 ml 37°C temperiertem Nährmedium luftblasenfrei gefüllt. Mit einer sterilen Pinzette wurde dann je ein flächenhaft bewachsenes Plättchen vorsichtig in den Ampullen versenkt. Da Flüssigkeitstropfen auf der Ampulle Störungen in der Messung der Wärmefreisetzung verursachen können⁹⁴, wurde darauf geachtet, dass Ampulle und insbesondere Gewinde trocken waren. Nach Verschluss der Ampullen wurden diese äußerlich mit Alkohol gereinigt und trockengerieben und schließlich im Mikrokalorimeter versenkt. Um die Ampullen an die Temperatur des Wasserbades von 37°C anzugleichen, wurden diese 20 Minuten in der sogenannten Vorheiz-Position belassen. Anschließend wurden die Ampullen durch langsames Absenken in die Messposition gebracht und die Messung konnte beginnen.

Durchführung der mikrokalorimetrischen Messung

Durch Vorversuche wurde ein entsprechendes Messsystem etabliert (siehe hierfür Kapitel 9.1): Die Monolayer wurden auf sogenannten ‚mittleren‘ Plättchen (200 mm²) kultiviert. In einem Versuchsansatz wurden schließlich parallel zwei native und zwei 2,4-DNP-behandelte Monolayer im Mikrokalorimeter (geschlossenes System) über einen Zeitraum von 9 Stunden gemessen.

Nachbereitung der mikrokalorimetrischen Messung

Nach der Messung wurde die Plättchendichte ermittelt (siehe Kapitel 8.2.4). Um Untersuchungen mit dem Medium durchführen zu können, wurden jeweils 4x 200 µl Medium aus jeder Stahllampulle in vier Mikrolitergefäße abpipettiert. Im Anschluß wurden

dann in einem Aliquot der pH, die Glucosekonzentration sowie die O₂- und CO₂-Sättigung in einem Radiometer bestimmt. Darüber hinaus wurde aus einem weiteren Aliquot im Zentrallabor der Universität die Laktat-Konzentration bestimmt. Die restlichen zwei Aliquots wurden für eventuelle spätere Messungen eingefroren.

Die Stahllampullen wurden in einem Ultraschall-Bad gereinigt, getrocknet und mit Alkohol abgerieben. Die während der Messung auf dem Programm aufgezeichneten Daten wurden in ASC-Files umgewandelt und mit Microsoft Excel® weiterverarbeitet.

8.2.4. Ermittlung der Plättchendichten

Für die Datenanalyse war es essentiell, eine exakte und verlässliche Methode zur Bestimmung der Plättchendichten (Anzahl der auf Plättchen wachsenden Zellen) zur Verfügung zu haben. Es wurden daher drei unterschiedliche Verfahren getestet:

1.: Ermittlung der Plättchendichte durch Auszählung eines ‚repräsentativen‘ Plättchens

In einem ersten Versuch zur Zellzahlbestimmung wurde jeweils ein Plättchen nach jeder Messung ausgezählt.

Hierfür wurden die Plättchen mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt; anschließend wurden 5 Blickfelder in einer 10-fachen Vergrößerung in einem Plattenmikroskop mit Maßstab im Sichtfeld fotografiert und diese ausgezählt. Vom Mittelwert der Auszählungsergebnisse ausgehend wurde dann die Gesamtzellzahl des Plättchens berechnet: Ein Blickfeld hat eine Fläche 0,3072 mm²; eine Fläche des mittleren Plättchens beträgt 200mm². Da Vorder- und Rückseite bewachsen ist, muß das Ergebnis mit dem Faktor 2 multipliziert werden. Folglich ergibt sich folgende Formel:

$$[(\text{Mittelwert der Auszählungsergebnisse}) \cdot (651,04166) \cdot 2]$$

2.: Ermittlung der Plättchendichte mittels Neubauer Zählkammer

Bei dieser Methode wurde jedes Plättchen nach der Messung gesondert ausgezählt.

Hierfür wurde das Plättchen in ein Röhrchen mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,1 %; Seromed) für die Dauer von einer Minute gegeben. Um die Zellen möglichst vollständig von dem Plättchen abzulösen, wurde das Röhrchen samt Plättchen anschließend kurz auf einem Vortex-Gerät geschüttelt. Zwecks Inhibierung der Trypsinwirkung wurde nun das Röhrchen mit 5 ml PBS mit 10% FCS aufgefüllt. Nach Aufmischen der Zellen wurde ein Aliquot entnommen (20 µl) und mit der gleichen Menge Trypanblau gemischt. Diese Suspension wurde nun in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet (4 Großquadrate wurden ausgezählt). Die Zellzahl der Suspension wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{[(\text{Anzahl gezählte Zellen}) \cdot 2 \cdot (\text{Gesamtmenge der Suspension}) \cdot 10000]}{(\text{Anzahl der Großquadrate})}$$

Um einen Zellverlust beim Waschen der Zellen zu vermeiden, wurde auf ein Abzentrifugieren der Lösung und erneutes Resuspendieren mit PBS verzichtet.

3.: Ermittlung der Plättchendichte mittels LDH-Test

Bei dieser Methode wurde ebenfalls jedes Plättchen nach der Messung gesondert ausgewertet.

Testprinzip

Das zytoplasmatische Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist in allen Zellen einer Zellart in weitgehend konstanten Konzentrationen vorhanden und wird bei Membranschäden bzw. bei kompletter Lyse der Zellen freigesetzt. Der verwendete Zytotoxizitäts-Test von Roche nutzt die Tatsache, dass das Ausmaß der gemessenen Enzymaktivität mit dem Anteil der lysierten Zellen korreliert.

Die LDH-Aktivität wird mit einem enzymatischen Test bestimmt: In einem ersten Schritt wird über die LDH-katalysierte Oxidation von Laktat zu Pyruvat NAD zu NADH/H reduziert. In einem zweiten Schritt wird das generierte NADH/H genutzt, um das (gelbe) Tetrazoliumsalz zu dem (roten) Formazansalz zu reduzieren. Eine große Anzahl an toten bzw. membrangeschädigten Zellen bedingt eine entsprechend hohe Enzymaktivität. Diese korreliert direkt mit der Menge des gebildeten Formazansalzes in einem definierten Zeitraum. Somit ist die Intensität der Farbe proportional zu der Anzahl der lysierten Zellen.

Anfertigung Standardreihe

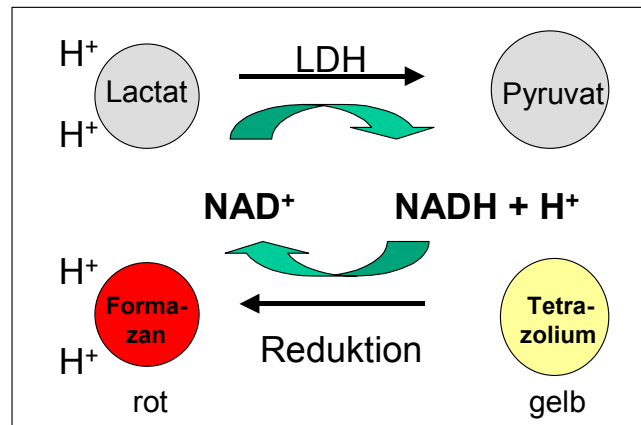
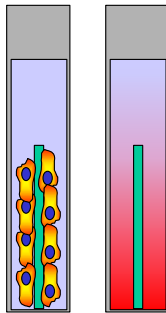
Für jede Zelllinie wurde eine Standardreihe angelegt, da das Enzym LDH nicht in jeder Zelllinie in gleicher Konzentration vorliegt:

Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen. 0,5 Mio Zellen pro ml PBS wurden in einem Mikrolitergefäß 10 Minuten bei 400x g abzentrifugiert; der Überstand wurde möglichst restlos entfernt. Das Pellet wurde in 1 ml 2% Triton/PBS-Lösung resuspendiert und die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen und Ausblasen der Pipette mechanisch zerstört. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen, anschließend erneut ausgiebig gevortext und die Zellfragmente bei 600x g abzentrifugiert. Der Überstand (ca. 600 µl) wurde in ein neues Mikrolitergefäß überführt.

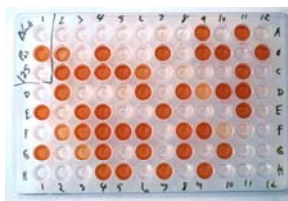
Nun wurde mit diesem Überstand eine Verdünnungsreihe mit 10 Verdünnungsstufen sowie Leerwert (=PBS) im Doppelansatz angelegt (Verdünnungen mit 2% Triton/PBS; Verdünnungsschritte mit 200 µl).

50 µl der Standardlösung wurden im Doppelansatz pipettiert und 50 µl LDH-Reagenz zugegeben. Nach einer halben Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 25 µl HCL gestoppt und die ODD-Werte im ELISA-reader bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

Lyse der Zellen
mit Triton-X-100



ELISA-Platte



Prinzip der Erfassung der Enzymaktivität:

Im ersten Schritt wird mittels LDH Lactat zu Pyruvat umgewandelt, wobei NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert wird. In einem zweiten Schritt werden die zwei Wasserstoffatome auf Tetrazoliumsalz übertragen, welches somit zu Formazan reduziert wird. Dieser Farbstoff wird schließlich mit dem ELISA erfasst.

Abbildung 10: Prinzip des Zytotoxizitätstest nach Roche für die Bestimmung der Zellzahl

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches Bestandteil jeder Zelle ist. Die Enzymaktivität korreliert jeweils mit dem Anteil an (lysierten) Zellen. Bei Beschädigung der Zellmembran (durch Triton-X-100) gelangt LDH ins Medium. Der Zytotoxizitätstest nach Roche quantifiziert die Enzymaktivität und bestimmt mit dieser auf Grundlage einer zuvor angefertigten Standardreihe die Anzahl der Zellen.

Bestimmung der Zellzahl der Plättchen

Die Plättchen wurden sofort nach der Messung jeweils in ein Röhrchen mit 2% Triton/PBS-Lösung überführt und mit dem Vortex-Gerät geschüttelt. Maximal 1 Woche wurden die Proben im Kühlschrank aufbewahrt. Nach erneutem Vortexen wurden 300 µl der Probe im Doppel in eine konische 96-well Platte überführt und 10 Minuten bei 400x g zentrifugiert. Aus jedem well wurden im Anschluß 50 µl in die eigentliche ELISA-Platte überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass das Pellet nicht angesaugt wurde. Je Ansatz wurden 50 µl LDH-Reagenz zugegeben, die Reaktion nach einer halben Stunde Inkubation bei Raumtemperatur mit 25 µl HCL gestoppt und die Platte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

Vergleich der unterschiedlichen Methoden zur Zellzahlermittlung

Um die verlässlichste und exakteste Methode zur Zellzahlermittlung zu finden, wurden die Ergebnisse aller drei getesteten Verfahren graphisch dargestellt und anschließend statistisch überprüft: hierzu wurde der Zusammenhang zwischen ermittelter Zellzahl und mittlerer Wärmeproduktion im Messzeitraum mittels Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht.

8.2.5. Wärmebad

Für die Simulation des Mikrokalorimeters wurde folgendes Modell etabliert: ein Wasserbad wurde mittels eines Thermostats auf konstant 37° C erwärmt.

Die Zellen (pA1) wurden in analoger Weise wie für die Mikrokalorimetrie als Monolayer inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Monolayer unter den selben Bedingungen in speziell angefertigte Stahllampullen übertragen, die auch bei den Messungen im Mikrokalorimeter Verwendung fanden. Nach Abdichtung der Ampullen mit einer Spezialfolie wurden diese in das Wärmebad übertragen. Nach jedem Versuchsansatz wurden die Ampullen aus dem Wärmebad entfernt; nach Entfernung der Abdichtefolie und Öffnen der Ampullen wurden die Gewinde sorgsam auf Trockenheit überprüft, um eine Undichte auszuschließen. Im Anschluss erfolgten die unterschiedlichen Messungen am Medium: von jeder Probe wurden 200 µLiter Medium abpipettiert und dieses zwecks Bestimmung von Glucose, pH, pO₂ und pCO₂ sofort in einem Radiometer ausgewertet. Die Laktatbestimmung erfolgte im Zentrallabor der Universität Würzburg. Zusätzlich wurden die Plättchendichten mittels LDH-Test bestimmt (siehe Kapitel 8.2.4).

8.3. Statistik: Überblick über die verwendeten Verfahren

Die statistischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Fachinstitut für Statistik, Herr Stefanelli, Domstrasse 10, 97070 Würzburg durchgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Analysen wurden - je nach Fragestellung - die folgenden Kennwerte angegeben:

- bei Häufigkeitsdaten waren dies absolute und relative Häufigkeiten (% Werte)
- bei metrischen Daten waren dies das arithmetische Mittel, als Maß für Variabilität die Standardabweichung, das Minimum und Maximum, die Fallzahl, sowie die Perzentile. Perzentile, zu denen auch der Median zählt, können als „Eckpunkte“ einer Werteverteilung bezeichnet werden. Beispielsweise charakterisiert der Median den Wert, der die Stichprobe in der Mitte teilt.

Ohne Ausnahme wurden alle statistischen Tests rein explorativ eingesetzt; die Befunde haben keinen „beweisenden“ oder „konfirmativen“ Charakter.

*Mann-Whitney-U-Test*⁹⁵:

Zielsetzung: Vergleich und Bewertung von Unterschieden zweier Gruppen in Parametern, die stetige Daten enthalten

*Fisher-Yates-Test*⁹⁶:

Zielsetzung: Prüfung von Unterschieden bei Häufigkeitsdaten (z.B. Prüfung, ob Unterschiede in Prozentwerten bestehen)

*Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis (H-Test)*⁹⁷:

Zielsetzung: Vergleich von mehr als zwei Gruppen in Parametern, die stetige Daten enthalten

*Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschiedes*⁹⁸:

Zielsetzung: Kennwert, der die Relevanz eines Unterschiedes angibt. Macht keinerlei Annahmen bzgl. der Form der Verteilung der Daten (z.B. ist Normalverteilung nicht nötig). Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert, häufig auch als WMW bezeichnet, wird mit dem Vertrauensbereich zur Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95% angegeben. Der Kennwert liegt in den Grenzen von 0 - 1 und wird nach dem folgenden Schema bewertet:

0.5 = die paarweise verglichenen Gruppen sind äquivalent

Werte < 0.5 zeigen, dass die erste der beiden Gruppen geringere Werte hat

Werte > 0.5 zeigen, dass die erste der beiden Gruppen höhere Werte hat

0.5 – 0.06 = 0.44: Unterschied mit geringer / kleiner Relevanz

0.5 – 0.14 = 0.36: Unterschied mit mittlerer Relevanz

0.5 – 0.21 = 0.29: Unterschied mit großer Relevanz

0.5 + 0.06 = 0.56: Unterschied mit geringer / kleiner Relevanz

0.5 + 0.14 = 0.64: Unterschied mit mittlerer Relevanz

0.5 + 0.21 = 0.71: Unterschied mit großer Relevanz

*Generalisierter Wilcoxon-Test*⁹⁸:

Zielsetzung: Vergleich von zwei Gruppen in gleichzeitig mehreren Parametern, die stetige Daten enthalten, Verallgemeinerung des Mann-Whitney-U-Tests auf mehr als einen Parameter (Test der Kontrastkoeffizienten bzgl. "stochastic ordering with equal weights", Wei & Lachin, 1984)

*Korrelationskoeffizient nach Spearman*⁹⁷:

Zielsetzung: Korrelation von Daten, ohne dass eine Annahme hinsichtlich der Verteilungsform gemacht werden muss (z.B. Normalverteilung)

Statistisch signifikante Korrelationskoeffizienten (als r bezeichnet) können wie folgt bewertet werden:

- $r \geq 0.70$ hohe oder sehr gute Korrelation
(ausreichend für Individualprädiktionen mit mäßigem Prädiktionsfehler)
- $r \geq 0.50$ gute Korrelation
(ausreichend für Gruppenprädiktionen)
- $r < 0.50$ moderate oder niedrige Korrelation
(nicht ausreichend für eine Prädiktion)

Auch das Vorzeichen des Koeffizienten ist wichtig:

positiver Koeffizient $r > 0$: gleichläufiger oder „größer - größer“ Zusammenhang

negativer Koeffizient $r < 0$: gegenläufiger oder „kleiner - größer“ Zusammenhang

Wertebereich des Korrelationskoeffizienten: -1 bis +1

Lineare Regressionsanalyse ⁹⁶:

Zielsetzung: Beschreibung des Zusammenhangs zwischen zwei quantitativen Merkmalen. An Hand einer Geradengleichung kann die Vorhersage von Werten einer abhängigen Variable aus den Werten einer als unabhängig gesehenen Variable erfolgen. Für eine Quantifizierung des beobachteten Zusammenhangs zwischen den Merkmalen wird das Bestimmtheitsmaß (R^2) herangezogen, das allerdings nichts über die Signifikanz des ermittelten Zusammenhangs aussagt. Hierfür müssen gesonderte Signifikanztests durchgeführt werden. R^2 liegt im Wertebereich von 0 bis 1. Je größer R^2 ist, desto größer ist die Erklärungskraft des Modells.

Hinweise zur statistischen Symbolik

Explorativ berechnete statistische Signifikanzen werden mittels sogenannter p-Werte gekennzeichnet. Das "p" steht für "probability". Der p-Wert bezieht sich auf eine Nullhypothese (z.B. „kein Zusammenhang“ oder „kein Unterschied“). Diese vermutet man vorerst als wahr. Geringe p-Werte führen zur Ablehnung der Nullhypothese und machen eine Alternative („signifikanter Zusammenhang“, „signifikanter Unterschied“) plausibel. Die folgende Tabelle zeigt einen Bewertungsmaßstab für die p-Werte.

Kennzeichnung der explorativen Signifikanzen

<i>Symbol</i>	<i>Irrtumswahrscheinlichkeit</i>	<i>Bedeutung</i>
n.s.	$p > 0.05$	nichtsignifikanter Unterschied zwischen Gruppen
*	$p \leq 0.05$	explorativ signifikanter Unterschied

9. Entwicklung eines Modells zur mikrokalorimetrischen Analyse mehrerer Zelllinien

9.1. Etablierung eines geeigneten Messsystems

Bisherige mikrokalorimetrische Arbeiten im Bereich der medizinischen Forschung verfolgen entweder methodische Fragestellungen oder sind von sehr kleinem Stichprobenumfang. Folglich konnte hinsichtlich des Messsystems auf keinerlei Erfahrung zurückgegriffen werden. Es wurden daher in einem ersten Schritt die Anforderungen definiert, die das Messsystem erfüllen sollte:

Anforderung an das Messsystem:

- einfache und schnelle Handhabung
 - niedrige Störanfälligkeit
- ⇒ *Verwendung eines geschlossenen Systems*
- möglichst Simulation einer ‚natürlichen‘ Wachstumsumgebung
 - möglichst Vermeidung des ‚Crowding-Effekts‘
- ⇒ *Kultivierung der Zellen auf einem Glasplättchen (‚Monolayer‘)*

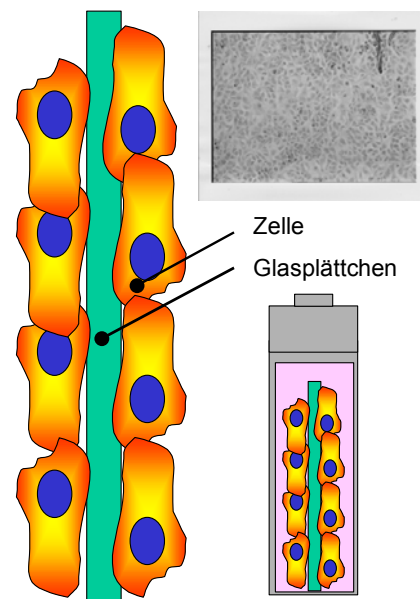


Abbildung 11: Schematische Darstellung sowie Foto eines Monolayers

Der Einsatz der Mikrokalorimetrie insbesondere in der Tumorforschung fordert repräsentative und reproduzierbare Daten ³⁴, zumal ein methodischer Ansatz gefunden werden soll, mit dem eine Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen werden kann. Auf Grund der geplanten hohen Versuchszahl war die Verwendung eines offenen Systems für das Mikrokalorimeter wegen der komplizierten Handhabung und extrem hohen Störanfälligkeit ausgeschlossen (siehe Kapitel 2.1). Die Messungen wurden daher in einem geschlossenen System mit speziell angefertigten, verschließbaren Stahlampullen durchgeführt.

Durch die Wahl des geschlossenen Systems wurde eine Kultivierung der zu untersuchenden Zellen als Monolayer einer Zellsuspension vorgezogen. Letztere hätte auf Grund des sich ausbildenden Zellsediments eine gleichmäßige Substrat- bzw. Sauerstoffversorgung der Zellen ausgeschlossen und somit einen beachtlichen ‚Crowding-‘

Effekt' verursacht (für eine nähere Erläuterung des Crowding-Effekts siehe Kapitel 10.3). Eine Verwendung von Monolayern bietet sich darüber hinaus aber auch an, da Tumorzellen adhärent wachsende Zellen sind und somit eine ‚natürliche‘ Wachstumsumgebung simuliert wird.

9.1.1. Methodischer Ansatz

Um mit einem möglichst idealen System zu arbeiten, sollte die Monolayerkultur folgenden Anforderungen entsprechen:

- Mikrokalorimetrisch sollte kein Abfall der Wärmefreisetzung im Messzeitraum zu beobachten sein
- Die Wärmefreisetzung sollte mindestens 5 μ Watt betragen

Die geplante Messdauer für die späteren Versuche mit 2,4-Dinitrophenol wurde aus organisatorischen Gründen auf 9 h festgelegt. Da in dieser Zeit das Medium nicht zum limitierenden Faktor werden sollte, war die Anzahl der Zellen auf dem Plättchen so zu wählen, dass mikrokalorimetrisch kein Abfall der Wärmefreisetzung im Messzeitraum von 9 h zu beobachten war. Eine weitere Anforderung an die Zelldichte war eine Wärmefreisetzung von mindestens 5 μ Watt, da unterhalb dieser Grenze reproduzierbare Messungen beim verwendeten Messsystem schwierig sind^{22,94}.

Um die Monolayerkultur zu finden, die die o.g. Anforderungen erfüllt, wurden drei Versuchsgruppen mit unterschiedlich großen Plättchen gebildet. Die Teratokarzinom-Zelllinie pA1 wurde für die Entwicklung des Modells verwendet. Die Zellkonzentration für die Kultivierung der Monolayer betrug 0,5 Mio/ml; die jeweils verwendete Zellsuspension pro Plättchengröße ist der folgenden Übersicht zu entnehmen:

Plättchengröße	Zellsuspension
100 mm ² – „klein“	1.5 ml
200 mm ² – „mittel“	3 ml
400 mm ² – „groß“	6 ml

Da das Verhältnis Zellzahl zu Volumen (Medium) während der Inkubationszeit für alle Plättchen konstant war, war eine etwa gleiche Zelldichte auf den besiedelten Plättchen innerhalb der Versuchsgruppen zu vermuten. Die Wärmeentwicklung der Zellen wurde schließlich für eine Dauer von durchschnittlich 22 Stunden im Mikrokalorimeter gemessen. Während der mikrokalorimetrischen Messung betrug das Mediumvolumen grundsätzlich 3.6 ml, unabhängig von der Größe des Plättchens.

9.1.2. Ergebnisse

Für die Versuchsgruppen der kleinen bzw. mittleren Plättchen ließen sich drei gemeinsame Kurvenverläufe beschreiben (der Übersicht wegen ab ca. der 52. Minute dargestellt):

Abbildung 12a: Mikrokalorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'kleine' Plättchen: alle Kurvenverläufe (n=32)

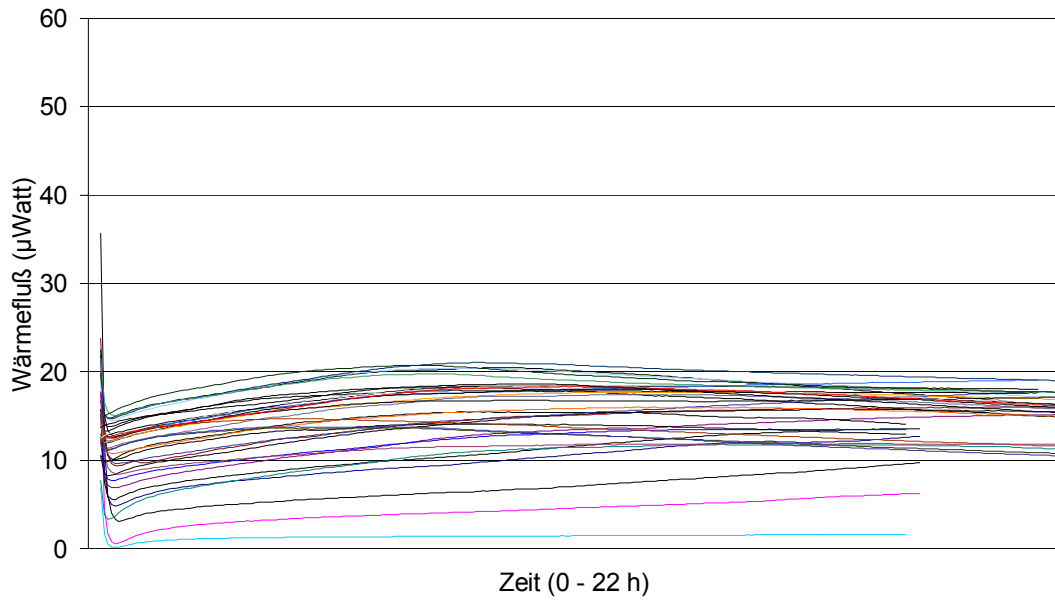


Abbildung 12b: Mikrokalorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'kleine' Plättchen - Kurvenverlauf Typ I (n=6)

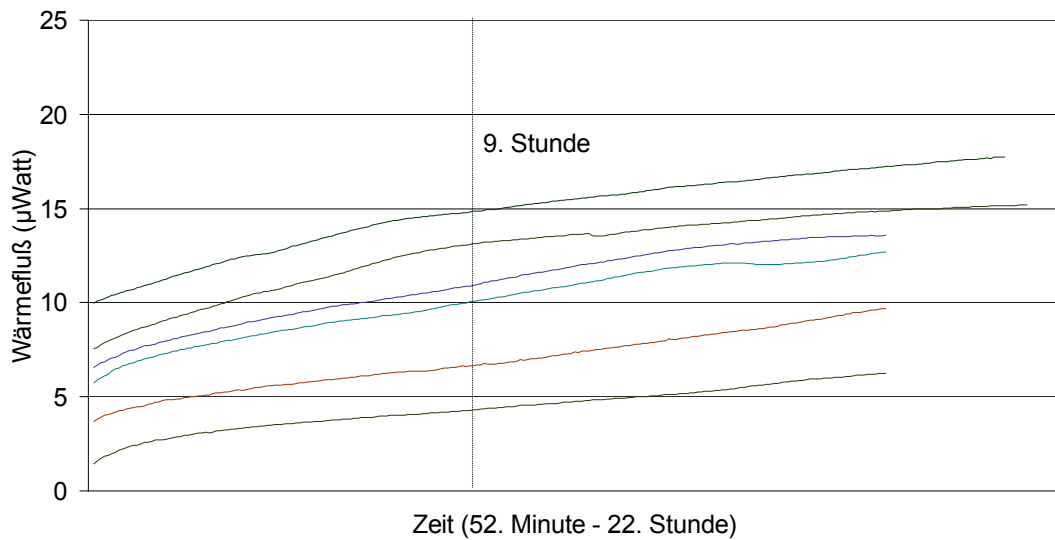


Abbildung 12c: Mikrokolorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'kleine' Plättchen - Kurvenverlauf Typ II (n=8)

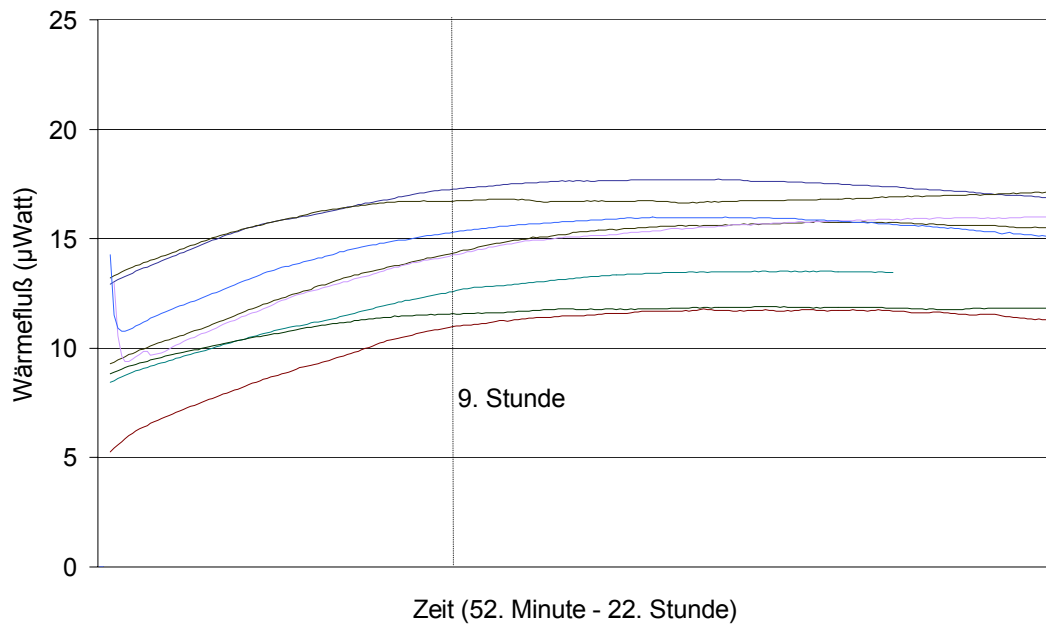


Abbildung 12d: Mikrokolorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'kleine' Plättchen - Kurvenverlauf Typ III (n=18)

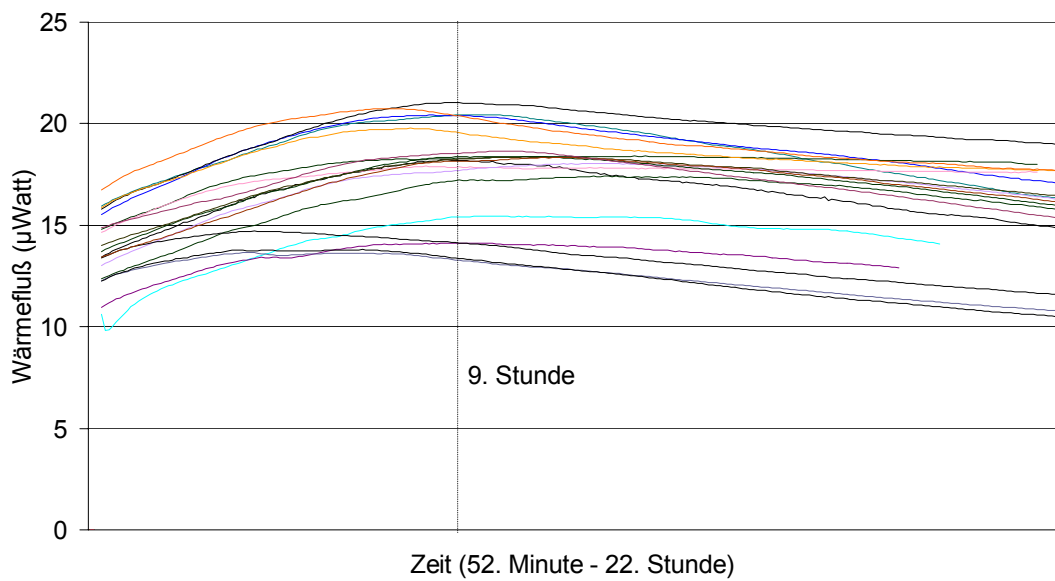


Abbildung 13a: Mikrokalorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'mittlere' Plättchen: alle Kurvenverläufe (n=86)

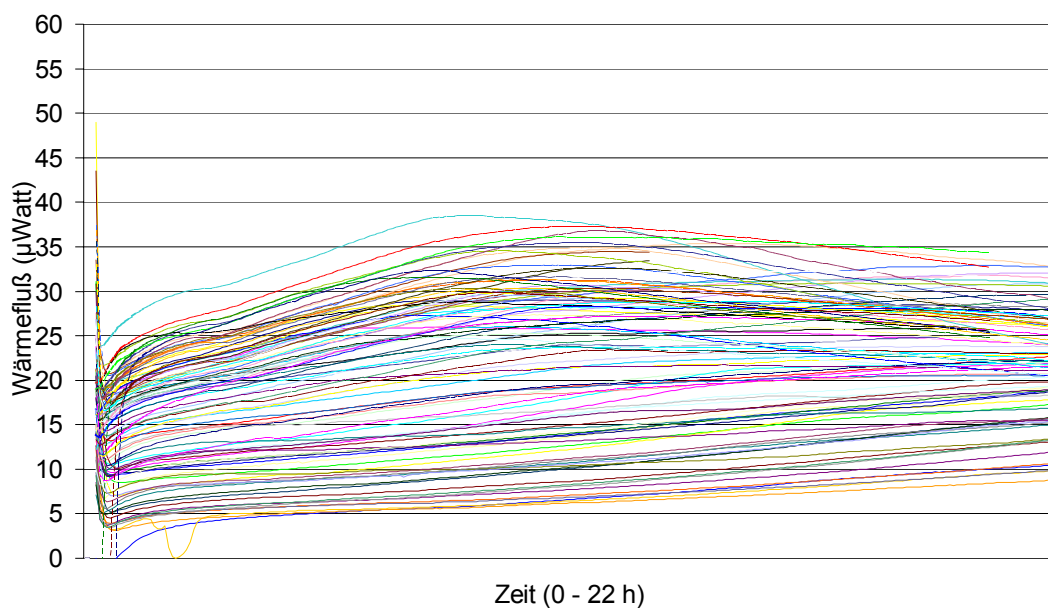


Abbildung 13b: Mikrokalorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'mittlere' Plättchen - Kurvenverlauf Typ I (n=32)

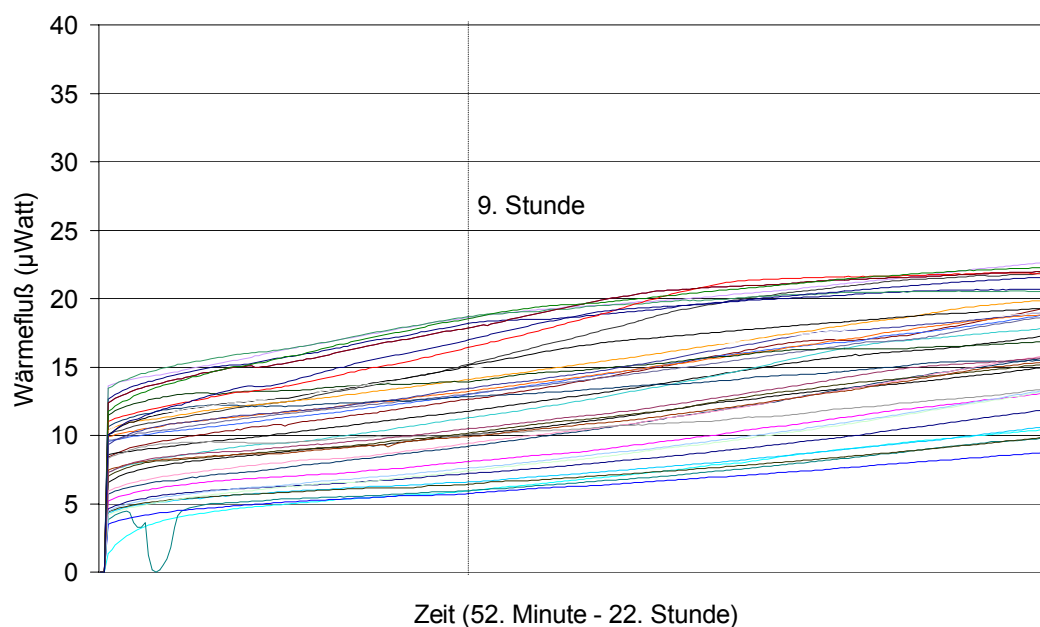


Abbildung 13c: Mikrokolorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'mittlere' Plättchen - Kurvenverlauf Typ II (n=22)

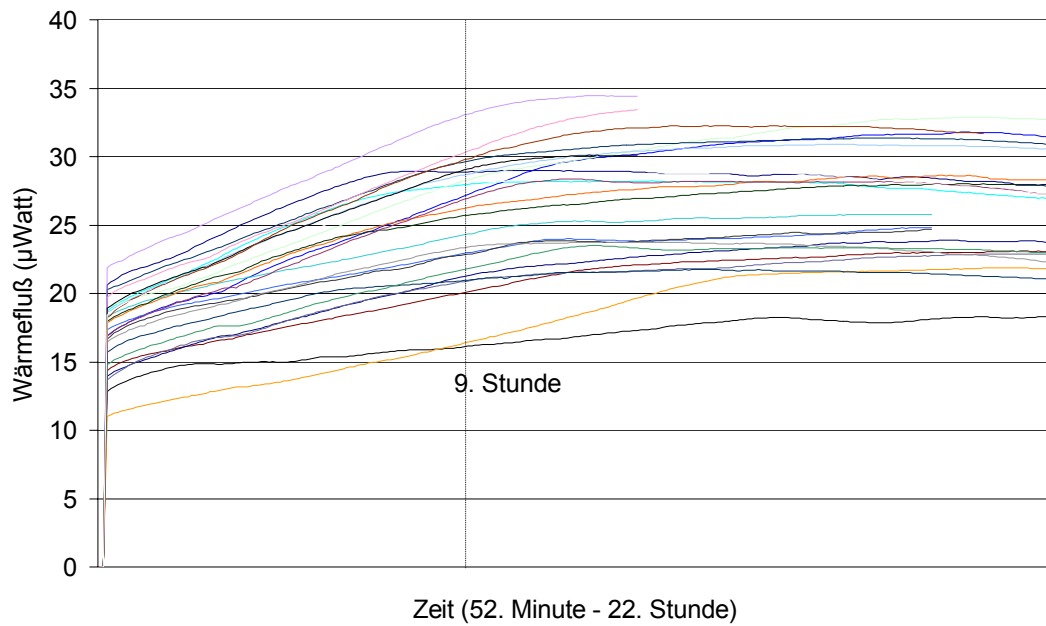
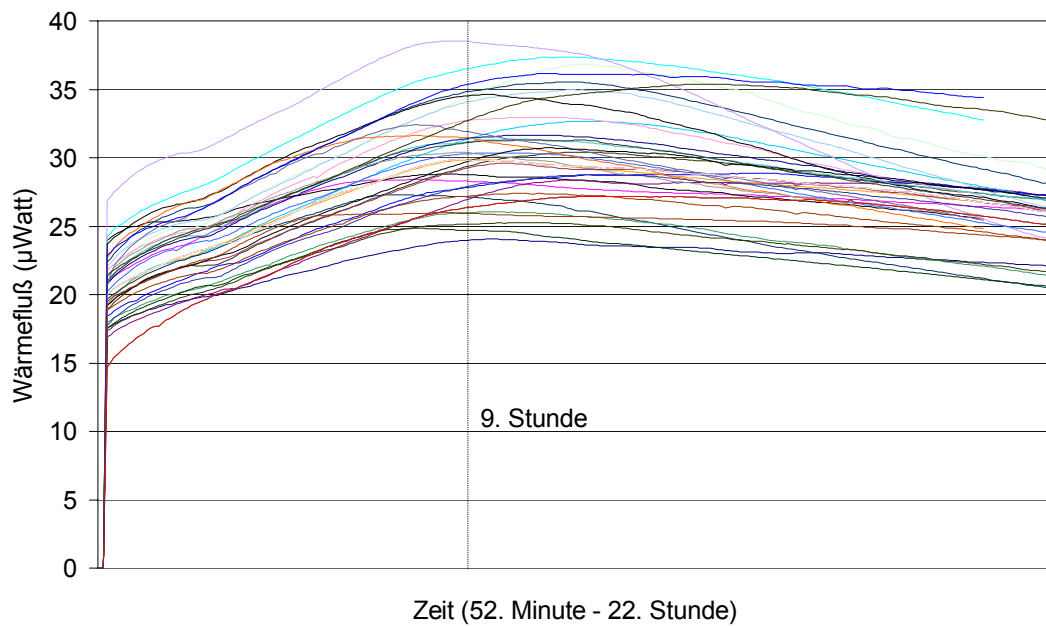


Abbildung 13d: Mikrokolorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'mittlere' Plättchen - Kurvenverlauf Typ III (n=32)



Kurvenverlauf Typ I: Der Wärmefluss beginnt auf einem niedrigen Energieniveau und nimmt im gesamten Zeitraum von 22 Stunden kontinuierlich zu.

Kurvenverlauf Typ II: Der Wärmefluss zeigt von Beginn an, von einem höheren Energieniveau ausgehend, einen stärkeren Anstieg; nach etwa der Hälfte der Zeit erreicht der Wärmefluss sein Maximum, das bis zum Ende gehalten wird (Plateauphase).

Kurvenverlauf Typ III: Hier ist das initiale Energieniveau und der Anstieg des Wärmeflusses nochmals höher als bei Typ II; das Maximum wird eher erreicht, danach erfolgt ein Abfall des Wärmeflusses.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuchsgruppen (kleine und mittlere Plättchen):

Plättchengröße:	klein	mittel
Anzahl Versuche:	32	86
<i>Kurvenverlauf Typ I</i>		
Anzahl	6	32
initiales Energieniveau (μ Watt):	1-10	4-14
<i>Kurvenverlauf Typ II</i>		
Anzahl	8	22
initiales Energieniveau (μ Watt):	5-14	11-22
<i>Kurvenverlauf Typ III</i>		
Anzahl	18	32
initiales Energieniveau (μ Watt):	10-17	15-27
 <i>Versuche unter 5 μWatt</i>		
(bezogen auf Gesamtzahl der Versuche)	2 von 32	3 von 86
	[= 6,25 %]	[= 3,49 %]
 <i>Versuche mit Abfall vor der 9. Stunde</i>		
(bezogen auf Gesamtzahl der Versuche)	6 von 32	2 von 86
	[= 18,75 %]	[= 2,33 %]

Die Versuchsgruppe der großen Plättchen zeigte vier unterschiedliche Kurvenverläufe (der Übersicht wegen ab ca. der 52. Minute dargestellt):

:

Abbildung 14a: Mikrokolorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'große' Plättchen: alle Kurvenverläufe (n=46)

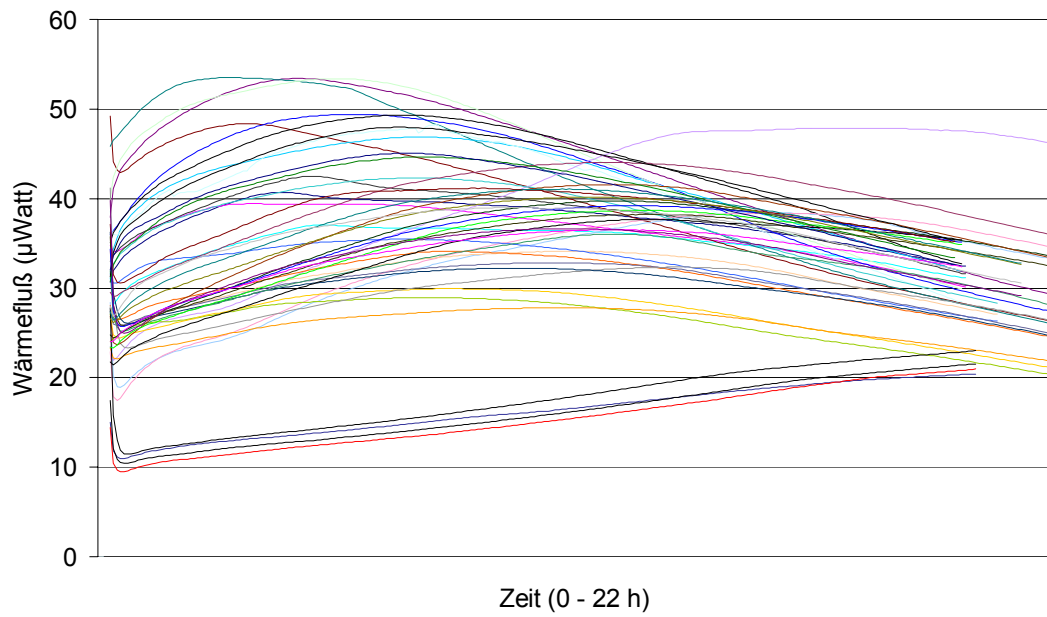


Abbildung 14b: Mikrokolorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'große' Plättchen - Kurvenverlauf Typ I (n=5)

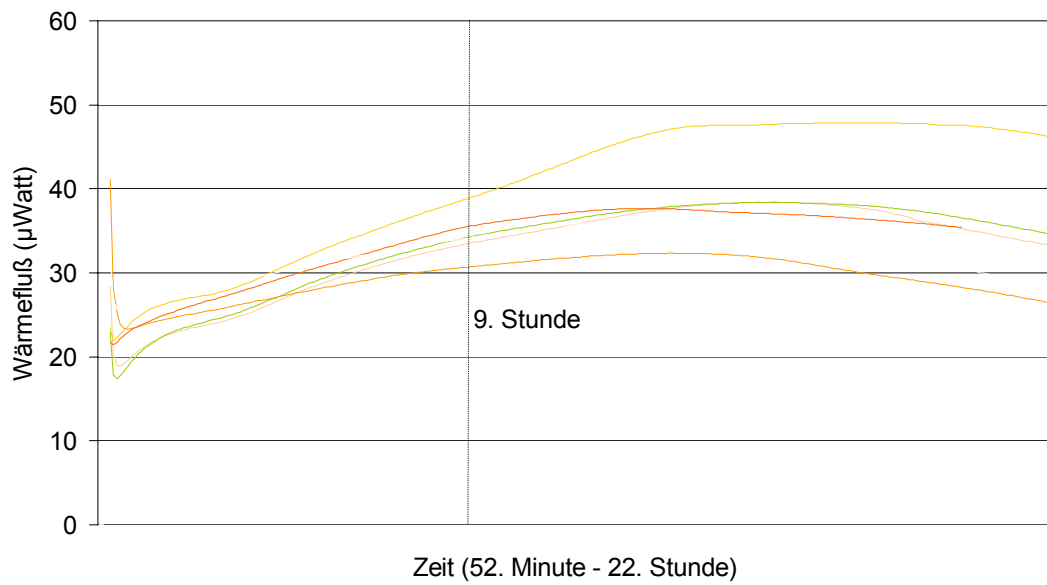


Abbildung 14c: Mikrokolorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'große' Plättchen - Kurvenverlauf Typ II (n=15)

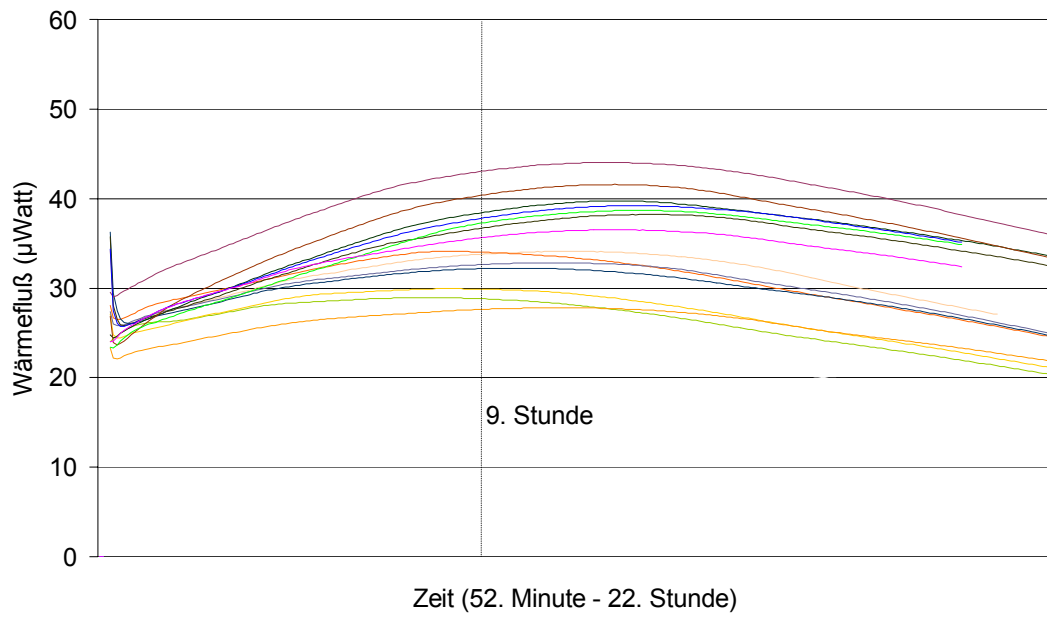


Abbildung 14d: Mikrokolorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
'große' Plättchen - Kurvenverlauf Typ III (n=8)

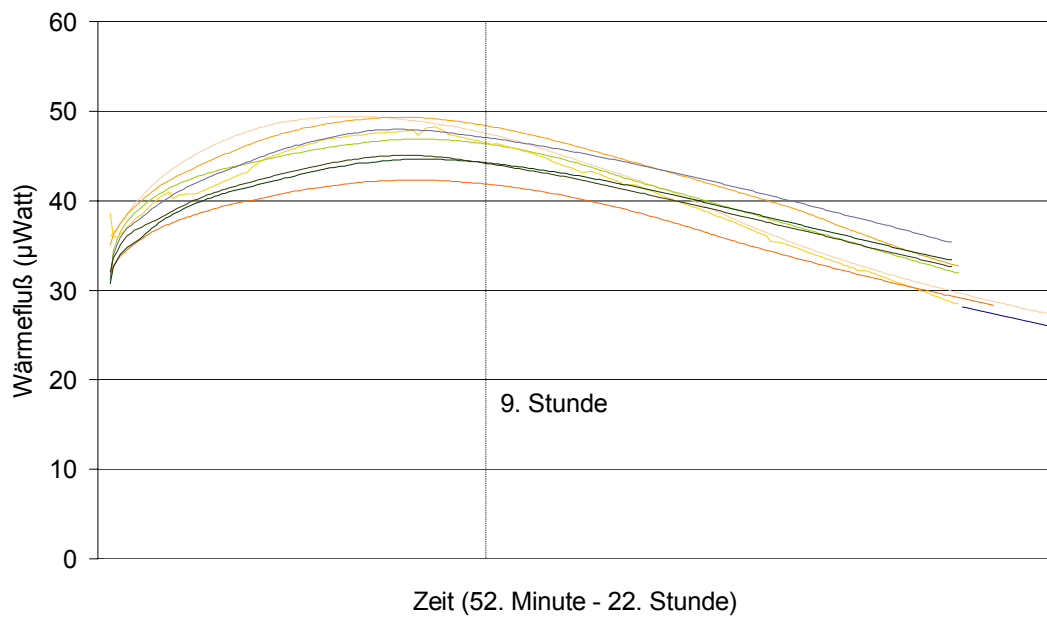
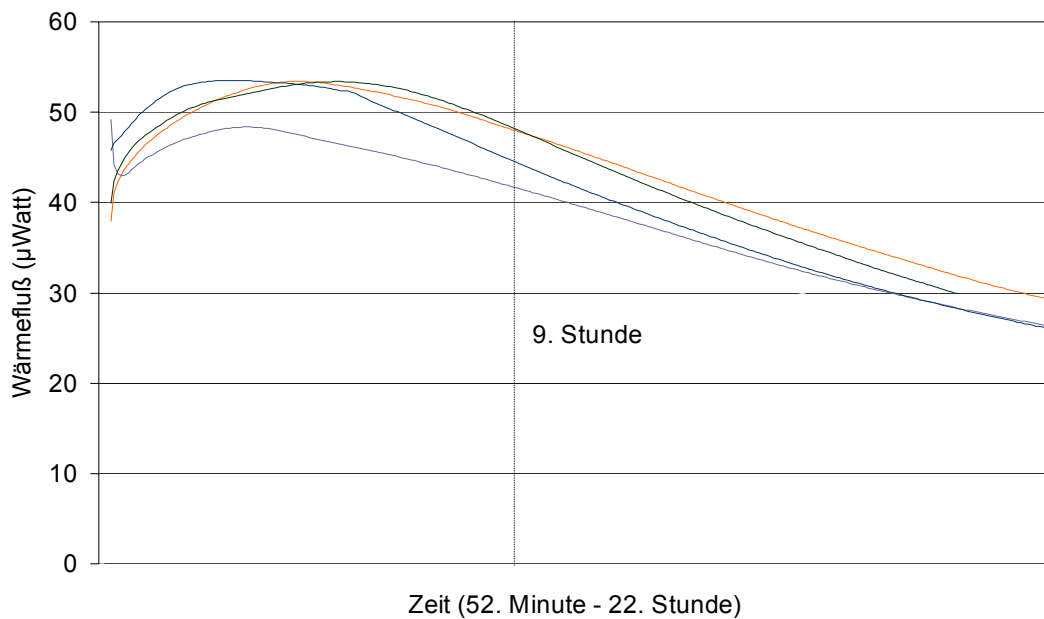


Abbildung 14e: Mikrokalorimetrische Analyse von pA1 Monolayern:
 'große' Plättchen - Kurvenverlauf Typ IV (n=4)



Kurvenverlauf Typ I: Der Wärme fluß nimmt, beginnend auf einem Energieniveau von 18-22 μWatt , kontinuierlich zu und bildet in etwa nach der 9. Stunde ein Plateau aus bzw. fällt langsam ab.

Kurvenverlauf Typ II: Von einem höheren Energieniveau ausgehend nimmt der Wärme fluß zu und erreicht um die 9. Stunde sein Maximum, und fällt daraufhin ab.

Kurvenverlauf Typ III: Hier ist das initiale Energieniveau und der Anstieg des Wärme flusses höher als bei Typ II; das Maximum wird bereits vor der 9. Stunde erreicht, danach erfolgt ein zügiger Abfall des Wärme flusses.

Kurvenverlauf Typ IV: Auf einem noch höheren Energieniveau beginnend erreicht der Wärme fluß noch schneller sein Maximum und fällt noch rascher ab.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuchsgruppe der großen Plättchen:

Plättchengröße:	groß
Anzahl Versuche:	32
<i>Kurvenverlauf Typ I</i>	
Anzahl	5
initiales Energieniveau (µWatt):	18-22
<i>Kurvenverlauf Typ II</i>	
...Anzahl	15
initiales Energieniveau (µWatt):	22-28
<i>Kurvenverlauf Typ III</i>	
...Anzahl	8
initiales Energieniveau (µWatt):	31-36
<i>Kurvenverlauf Typ IV</i>	
...Anzahl	4
initiales Energieniveau (µWatt):	40-48

Versuche unter 5 µWatt

(bezogen auf Gesamtzahl der Versuche) 0 von 32 [=0 %]

Versuche mit Abfall vor der 9. Stunde

(bezogen auf Gesamtzahl der Versuche) 15 von 32 [=46,88 %]

Ein Vergleich der Versuchsgruppen nach Versuchen mit Abfall des Wärmeflusses vor der 9. Stunde zeigte, dass nur 2.3% der mittleren Plättchen diese Anforderung nicht erfüllten. Hiermit unterschieden sie sich signifikant von den anderen zwei Versuchsgruppen.

Plättchen	Beobachtungen (Abfall Wärmefluss vor der 9. Stunde)	%Vergleich	Absolutzahlen		Signifikanztest und Wertung (Test nach Fisher-Yates)
<i>mittel</i>	2 von 86	2.3%	2	84	p=0.005 **
<i>klein</i>	6 von 32	18.8%	6	26	
<i>klein</i>	6 von 32	18.8%	6	26	p=0.03 *
<i>groß</i>	15 von 32	46.9%	15	17	
<i>mittel</i>	2 von 86	2.3%	2	84	p<0.001 ***
<i>groß</i>	15 von 32	46.9%	15	17	

Wärmefreisetzungen unter 5 µWatt waren bei allen Versuchen selten (kleine Plättchen: 6.25%, mittlere Plättchen: 3.49%, große Plättchen: 0%).

9.1.3. Diskussion

Den drei charakteristischen Kurvenverläufen der ersten und zweiten Versuchsgruppe (kleine und mittlere Plättchen) liegen vermutlich drei unterschiedliche Zellzahlbereiche zu Grunde, die für Typ I am niedrigsten und für Typ III am höchsten sind – hierfür spricht, dass die initiale Wärmefreisetzung, mit leichten Überschneidungen, für Typ I am niedrigsten und für Typ III am höchsten ist:

- Für die Versuche, die den Kurvenverlauf Typ I aufwiesen, lagen die Zellzahlen vermutlich in einem Bereich, der im Messzeitraum von 22 h ein kontinuierliches Wachstum und einen uneingeschränkten Stoffwechsel der Zellen zuließ, ohne dass das Medium zum limitierenden Faktor wurde.
- Die Versuche, die den Kurvenverlauf Typ II aufwiesen, wurden dagegen offenbar mit Monolayern durchgeführt, deren Zellzahl in einem höheren Bereich lagen als die von Typ I. Mikrokolorimetrisch zeigte sich nach einem Anstieg der Wärmefreisetzung eine Plateauphase. Hierfür konnten zwei Ursachen in Betracht kommen: erstens könnte das Medium bei dem hier verwendeten Zellzahlbereich zum limitierenden Faktor geworden sein, das Zellwachstum somit sistiert und der Stoffwechsel auf einem niedrigeren Niveau stattgefunden haben. Zweitens könnte eine Kontakthemmung der Zellen zu einem Wachstumsstopp geführt haben.
- Bei den Versuchen, die den Kurvenverlauf Typ III aufwiesen, scheint das Medium auf Grund der noch höheren Zelldichte so ausgezehrt gewesen zu sein, dass die Zellen abstarben und die Wärmefreisetzung entsprechen abfiel.

Den Kurvenverläufen der dritten Versuchsgruppe (große Plättchen) sind vermutlich vier Zellzahlbereiche zuzuordnen. Auch hier gilt, dass die Wärmefreisetzung umso schneller abfiel, je höher dieser Zellzahlbereich lag. Im Unterschied zur ersten und zweiten Versuchsgruppe lagen die Zellzahlen bereits in den Versuchen mit Kurvenverlauf Typ I in einem Bereich, der zu einer Auszehrung des Mediums und somit zum Absterben von Zellen führte.

Zu der Hypothese der Mediumauszehrung ist kritisch anzumerken, dass hierbei nicht von einer generellen, sondern vielmehr ‚lokalen‘ Mediumauszehrung auszugehen ist: der Anteil an Versuchen, die einen Abfall des Wärmeflusses vor der 9. Stunde zeigten, betrug für die großen Plättchen 47%, für die mittleren 2.3%, für die kleinen 19%. Da alle Plättchengrößen jedoch grundsätzlich mit dem gleichen Volumen Medium im Mikrokolorimeter kultiviert wurden, ist folglich eine generelle Mediumauszehrung unwahrscheinlich. Vielmehr ist eine ‚lokale‘ Substratlimitierung durch Diffusionsprobleme, bedingt durch ungerührtes Medium um die Plättchen herum, anzunehmen. Dies scheint bei den kleinen Plättchen besonders ausgeprägt.

Für die Versuchsreihen mit 2,4-Dinitrophenol wurde das mittlere Plättchen ausgewählt, da

- 97,7 % der Versuche mit mittleren Plättchen in den ersten 9 h keinen Abfall des Wärmefflusses zeigten. Hiermit unterschieden sie sich signifikant von den anderen zwei Versuchsgruppen.
- Wärmefreisetzungen unter 5 μ Watt waren bei den mittleren Plättchen sehr selten (3 von 86 Versuchen, entspricht 3.5 %). Es wurde davon ausgegangen, dass diese eher auf fehlerhafte Inkubation der Monolayer als auf eine generell zu geringe Plättchendichte der mittleren Plättchen zurückzuführen waren. Folglich wurden Versuche mit Wärmefreisetzungen unter 5 μ Watt im Rahmen der Hauptversuche nicht gewertet.

Die unterschiedlichen Kurvenverläufe *innerhalb* einer Versuchsgruppe zeigen, dass die Zelldichte auf den Plättchen auch *innerhalb* einer Versuchsgruppe variieren mussten, was auch durch spätere Messungen der Zellzahl belegt werden konnte (siehe nachfolgendes Kapitel 9.2). Da die Methode zur Kultivierung der Zellen als Monolayer strikt standardisiert wurde (siehe Kapitel 8.2.1), liegt die Vermutung nahe, dass auf Grund unterschiedlicher Biorhythmen und variierender Teilungsraten der Zellzyklus unterschiedlich schnell ablief, zumal aus organisatorischen Gründen die Zellen für die Versuche aus unterschiedlichen Passagen der pA1-Linie verwendet werden mußten.

Erste Datenanalysen der Versuchsreihen mit 2,4-Dinitrophenol zeigten, dass die variierenden Plättchendichten einen Störfaktor darstellten, der unbedingt in die Datenanalyse mit einbezogen werden musste (siehe Kapitel 10.1 und 10.2). Es war daher essentiell, eine verlässliche und exakte Methode zur Bestimmung der Plättchendichte zu finden, um die Daten adäquat auswerten zu können. Obwohl erst nach Beginn der Versuchsreihen mit 2,4-Dinitrophenol eine verlässliche und exakte Methode zur Bestimmung der Plättchendichte etabliert werden konnte, gestattete es die vorliegende große Anzahl an Versuchen auch ohne Kenntnis der Zellzahl charakteristische Kurvenverläufe für die Versuchsgruppen zu beschreiben und zu interpretieren. Auf diese Weise konnte daher auf Grundlage der zuvor definierten Anforderungen die mittlere Plättchengröße als Standard für die Kultivierung der Monolayer bestimmt werden.

9.2. Etablierung eines geeigneten Verfahrens zur Ermittlung der Plättchendichte

Wie in Kapitel 9.1.3 erläutert, war es trotz strikter Standardisierung auf Grund der Beschaffenheit biologischer Systeme nicht möglich, Monolayer mit reproduzierbaren Plättchendichten herzustellen. Es war daher für weitergehende Versuche von erheblicher Bedeutung, ein Verfahren zur Verfügung zu haben, das es gestattet, die Plättchendichten nach den mikrokalorimetrischen Messungen exakt zu ermitteln. Es wurden daher drei unterschiedliche Methoden (siehe Kapitel 8.2.4) auf ihre Eignung hin überprüft, deren Ergebnisse im folgenden vorgestellt und diskutiert werden.

9.2.1. Ermittlung der Zellzahl durch Auszählung eines ‚repräsentativen‘ Plättchens

Ergebnis:

Die graphische Darstellung der ermittelten Zellzahlen mit den entsprechenden Wärmeflüssen lässt bereits vermuten, dass kein Zusammenhang zwischen der berechneten Zellzahl und der Wärmefreisetzung besteht. Dies konnte auch belegt werden: die Korrelation zwischen Zellzahl und mittlerer Wärmefreisetzung im Messzeitraum stellte sich in der Korrelationsanalyse nach Spearman als nicht bedeutsam heraus: Korrelationskoeffizient $r=0.503$ ($p=0.138$, nonsignifikant)

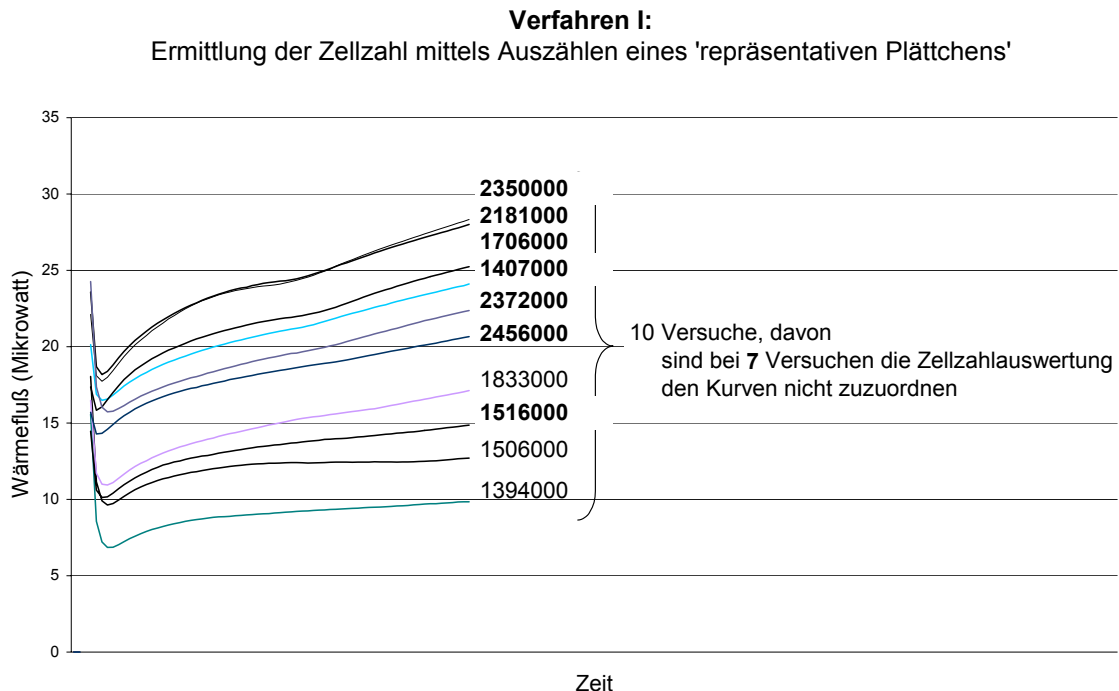


Abbildung 15: Wärmeflüsse mit den entsprechenden Zellzahlen, hier ermittelt mit Verfahren I
Es scheint, dass die hier getestete Methode zur Ermittlung der Zellzahl fehlerhafte Ergebnisse produziert. Diese Vermutung konnte statistisch bestätigt werden: die Korrelation zwischen Zellzahl und mittlerer Wärmeproduktion war nonsignifikant ($r=0.503$, $p=0.138$).

Diskussion:

Normalerweise würde man mit steigender Zellzahl eine entsprechend höhere Wärmefreisetzung erwarten. Dies war jedoch nicht der Fall, wie Abbildung 15 veranschaulicht. Stellenweise wiesen sogar Versuche mit gleicher Zellzahl völlig unterschiedliche Wärmefreisetzungen auf. Da dies weder zellbiologisch noch mikrokolorimetrisch zu erklären war, lag es nahe anzunehmen, dass das gewählte Verfahren zur Auszählung des Plättchens zu ungenau ist und falsche Ergebnisse liefert. Diese Vermutung konnte durch den fehlenden statistischen Nachweis einer Korrelation zwischen Zellzahl und Wärmeproduktion bestätigt werden. Die Methode stellte sich somit als ungeeignet heraus. Folgende Ursachen kommen hierfür in Frage:

- *repräsentativer Charakter der Methode:* von dem Auszählungsergebnis des repräsentativen Plättchens wurde auf die Zellzahl der anderen drei Plättchen eines Versuchsansatzes geschlossen. Betrachtet man jedoch die vier Kurvenverläufe der Wärmefreisetzung eines Versuchsansatzes, fällt bereits auf, dass diese um durchschnittlich 5 μ Watt differieren. Trotz strikter Standardisierung bei Inkubation der Monolayer und der ausschließlichen Verwendung von Zellen einer Passage für einen Versuchsansatz unterschieden sich offensichtlich die Plättchendichten auch innerhalb eines Versuchsansatzes. Die später etablierte Methode der Zellzahlbestimmung mittels LDH-Test bestätigte diese Annahme.
- *kein konsequenter homogener Bewuchs der Plättchen:* auf Grundlage der fünf ausgezählten Blickfelder wurde die Zellzahl der weiteren 1300 Blickfelder eines Plättchens ermittelt. Es wurde davon ausgegangen, dass die Plättchen auf der Vorder- und Rückseite gleichmäßig bewachsen waren. Da die Plättchen bei Inkubation jedoch schräg gelagert wurden, war dies mit hoher Wahrscheinlichkeit jedoch nicht der Fall. Außerdem war bereits auf manchen Fotos zu erkennen, dass die Plättchen nicht zwingend konfluent bewachsen waren.
Tumorzellen weisen bekanntlich keine Kontaktinhibition auf. Folglich war ein Bewuchs des Plättchens in mehreren Lagen möglich und somit eine genaue Zellzahlbestimmung mit dieser Methode nicht möglich.

Da dieses Verfahren zur Zellzahlermittlung sich somit als nicht geeignet herausstellte, wurde eine andere Methode zur Zellzahlauszählung getestet.

9.2.2. Ermittlung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer

Ergebnis:

Die ermittelten Zellzahlen wurden den entsprechenden Kurvenverläufen der Wärmefreisetzung in einem Graphen zugeordnet (siehe Abbildung 16).

Verfahren II:
Ermittlung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

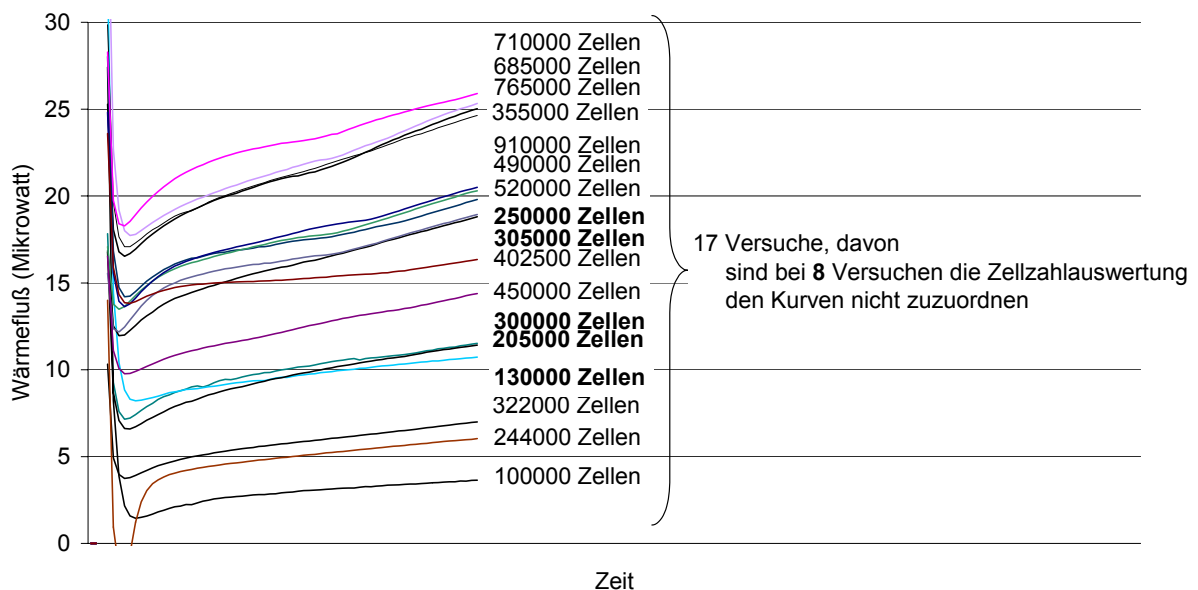


Abbildung 16: Wärme flüsse mit den entsprechenden Zellzahlen, hier ermittelt mit Verfahren II

Auch wenn mit der hier getesteten Methode zur Ermittlung der Zellzahl die Zellzahlen den jeweiligen Wärme flüssen in der graphischen Darstellung nur bedingt zugeordnet werden können, ergab die statistische Analyse einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen Zellzahl und mittlerer Wärme produktion ($r=0.804$, $p=0.001$). Obwohl das Verfahren zur Ermittlung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer somit geeignet wäre, wurde es auf Grund des hohen Zeitaufwandes bei der Durchführung zugunsten des im nächsten Kapitel vorgestellten Verfahrens verworfen.

Die Korrelationsanalyse nach Spearman für die Korrelation zwischen Zellzahl und mittlerer Wärme freisetzung ergab:

Korrelationskoeffizient $r=0.804$ ($p<0.001$, hochsignifikant)

Diskussion:

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, ließen sich nicht alle Zellzahlen den entsprechenden Wärme flüssen adäquat zuordnen. Es scheint daher, dass nur bedingt ein Zusammenhang zwischen der berechneten Zellzahl und der mittleren Wärme freisetzung besteht. Die Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte jedoch eine signifikante Korrelation zwischen Zellzahl und mittlerer Wärme produktion.

Auch wenn diese Methode sich zwar in der statistischen Analyse als geeignet herausgestellt hat, fiel die Entscheidung für den im folgenden Kapitel vorgestellten LDH-Test zur Ermittlung der Zellzahl, da die Methode mittels Neubauer Zählkammer angesichts der großen geplanten Stichprobe mit einem enormen Zeitaufwand für die Durchführung verbunden gewesen wäre.

9.2.3. Ermittlung der Zellzahl mittels LDH-Test:

Ergebnis:

Die ermittelten Zellzahlen wurden den entsprechenden Kurvenverläufen der Wärmefreisetzung in einem Graphen zugeordnet (siehe Abbildung 16).

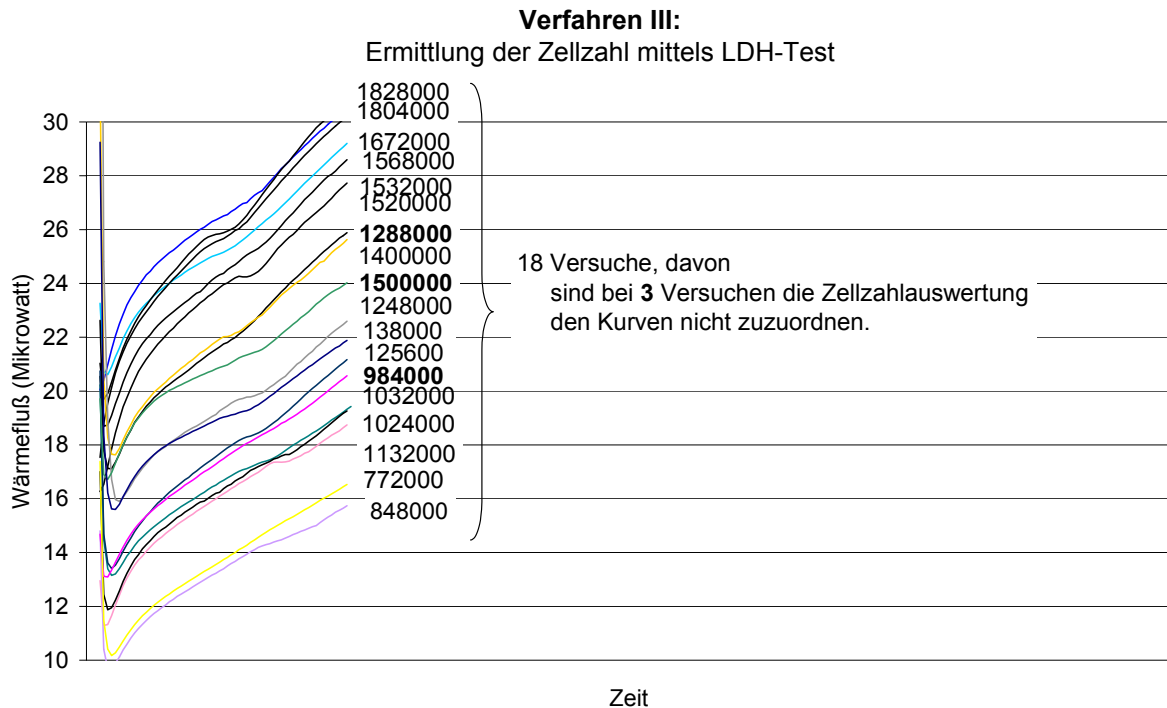


Abbildung 17: Wärmeflüsse mit den entsprechenden Zellzahlen, hier ermittelt mit Verfahren III

Wie die Abbildung bereits vermuten lässt, liegt hier ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Zellzahl und mittlerer Wärmeproduktion ($r=0.864$, $p=0.001$) vor. Da dieses Verfahren somit verlässliche und exakte Zellzahlen liefert und zudem relativ einfach durchzuführen ist, wurde die Zellzahlen aller folgenden Versuche mit diesem Verfahren bestimmt.

Die Korrelationsanalyse nach Spearman für die Korrelation zwischen Zellzahl und mittlerer Wärmefreisetzung ergab:

Korrelationskoeffizient $r=0.864$ ($p<0.001$, hochsignifikant)

Diskussion:

Die Ermittlung der Zellzahl mittels LDH-Test erwies sich als sehr verlässliche und exakte Methode. Die Wärmefreisetzung ließ sich hierbei sehr gut mit der zugrundeliegenden Zellzahl korrelieren. Zudem konnte der LDH-Test gut standardisiert und ohne größeren Zeitaufwand durchgeführt werden. Daher wurden die Zellzahlen für alle folgenden Versuche mit dieser Methode bestimmt.

10. Datenanalyse

Als Ziel der Arbeit sollte ein Modell entwickelt werden, das geeignet ist, den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von 2,4-Dinitrophenol auf den Wärmefluss bzw. die Wärmefreisetzung unterschiedlicher (maligner und benigner) Zelllinien zu untersuchen. Nachdem durch die Vorversuche ein adäquates Messsystem zur mikrokalorimetrischen Analyse von adhärennten Zellen mittels Monolayer-Technik gefunden worden war, wurden primär mit der Zelllinie pA1 Versuchsreihen mit fünf unterschiedlichen Dosisstufen (0, 12.5, 25, 50 und 100 μM 2,4-DNP) durchgeführt. Es folgten Versuche mit der Zelllinie BT20 und mit den primären Zellen HUVEC und Keratinozyten, jeweils getestet mit unterschiedlichen Dosisstufen.

Bei den mikrokalorimetrischen Untersuchungen wurde über einen Zeitraum von 9 Stunden der Wärmefluss (Messeinheit: Mikrowatt, μWatt) der Proben gemessen. Dieser Wärmefluss ist ein Parameter für die freiwerdenden Energie pro Zeiteinheit. Das Integral dieses gemessenen Wärmeflusses entspricht der absoluten Wärmefreisetzung oder Wärmeproduktion (Messeinheit: Joule; J) im Zeitraum 9 Stunden.

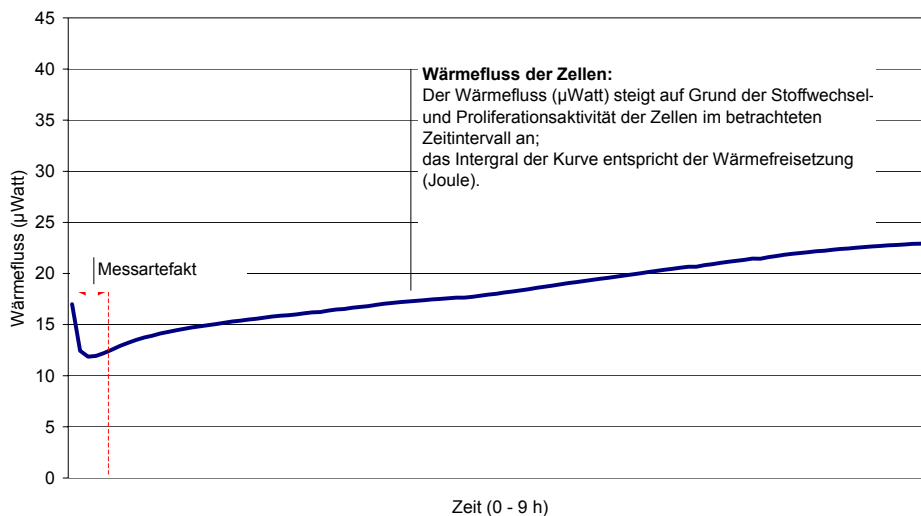


Abbildung 18: Beispiel einer mikrokalorimetrischen Analyse eines pA1-Monolayers (unbehandelt). Gezeigt ist der gemessene Wärmefluss (μWatt) im Zeitintervall 0-9 Stunden. Zu Beginn der Messung zeigten sich regelmäßig Messartefakte, folglich wurden die Daten erst ab der 20. Minute verwendet. Das Integral des Wärmeflusses entspricht der Wärmefreisetzung oder Wärmeproduktion (Joule). Diese wird von der Software des verwendeten Mikrokalorimeters automatisch berechnet: für den hier gemessenen Monolayer (1024000 Zellen) ergab sich eine Wärmefreisetzung im Zeitintervall 20. Minute bis - 9 Stunde von 591 mJ/Monolayer oder 140 nJ/Zelle.

In dem 4-Kanal-Mikrokalorimeter wurde grundsätzlich pro Versuchsansatz in zwei Kanälen der Wärmefluss der behandelten Zellen gemessen, in den anderen zwei Kanälen wurde der Wärmefluss der unbehandelten Zellen als Referenz zur behandelten Probe gemessen.

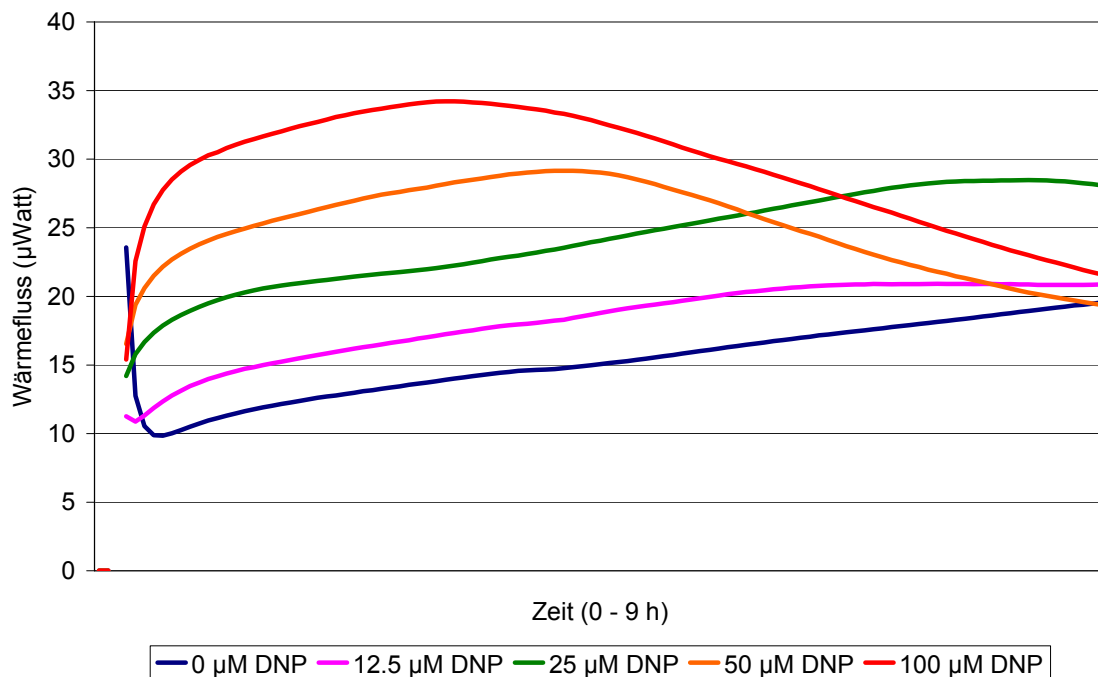


Abbildung 19: Beispiel einer mikrokalorimetrischen Analyse von fünf pA1-Monolayern, jeweils behandelt mit 0 µM, 12.5 µM, 25 µM, 50 µM und 100 µM 2,4-DNP

Gezeigt ist der gemessene Wärmefluss (µWatt) im Zeitintervall 0-9 Stunden. Die Plättchendichte der Monolayer betrug 1.5 Mio Zellen +/- 10%. Je höher die 2,4-DNP-Konzentration, umso mehr Wärme wird freigesetzt. Allerdings wird mit den höheren Konzentrationen schneller ein Maximum im Kurvenverlauf erreicht, die Wärmefreisetzung fällt danach ab.

Da bisherige mikrokalorimetrische Arbeiten im Bereich der medizinischen Forschung entweder methodische Fragestellungen verfolgen oder von sehr kleinem Stichprobenumfang sind, konnte auf keine etablierten Auswertungsmethoden zurückgegriffen werden. Folglich musste ein geeignetes Verfahren zur Auswertung der Daten entwickelt werden. Hiermit wurde gleich nach Abschluss der ersten Messreihen mit der pA1 Zelllinie begonnen.

Bis eine adäquate Methodik zur Auswertung der Daten etabliert werden konnte (Ansatz IV, siehe Kapitel 10.5), wurden insgesamt drei Ansätze einer Auswertung entworfen und durchgerechnet. Diese erschienen jedoch im Rahmen ansatzbedingt neu auftretender Fragen und Probleme als ungeeignet. Dennoch sollen sie im folgenden kurz vorgestellt und diskutiert werden. Da bei Überprüfung der Ansätze I-III noch nicht alle geplanten Versuchsreihen abgeschlossen waren, beziehen sich die folgenden Auswertungen ausschließlich auf die Versuchsreihen mit pA1-Zellen.

10.1. Ansatz I: Vergleich der absoluten Wärmeproduktion

10.1.1. Methodische Überlegung

Für eine erste Datenanalyse standen insgesamt 34 Versuchsansätze mit insgesamt 5 getesteten Dosisstufen 2,4-DNP zur Verfügung. Die Wärmeproduktionen (oder Wärmefreisetzungen) der pA1-Monolayer unter den unterschiedlichen 2,4-DNP-Dosisstufen sollten verglichen werden: in einem ersten Ansatz sollte daher die Frage geklärt werden, um wie viel Prozent die Wärmeproduktion unter den jeweiligen Dosisstufen gesteigert wird. Folglich wurde ein Vergleich des Steigerungspotentials der Wärmeproduktion unterschiedlicher Dosisstufen angestrebt.

In einem Versuchsansatz wurden parallel zwei native und zwei 2,4-DNP-behandelte Proben im Mikrokalorimeter über einen Zeitraum von 9 Stunden gemessen. Da die aufgezeichneten Kurven des Wärmeflusses jedoch teilweise auch innerhalb eines Versuchsansatzes geringfügig unterschiedlich ausfielen, stellte sich die Frage, auf welche native Probe welche behandelte Probe bezogen werden sollte.

Aus den Vorversuchen war bekannt (siehe Kapitel 9.1.3), dass - trotz strikter Standardisierung bei der Kultivierung der Monolayer - die Plättchendichten und entsprechend die Wärmefreisetzung auf Grund der Beschaffenheit biologischer Systeme variieren. Da jedoch die Proben eines Versuchsansatzes auch entsprechend in einem Arbeitsgang vorbereitet wurden, wurde angenommen, dass die Plättchendichten einer Messung nur geringfügig variieren und sich diese geringfügige Variation nicht störend auf die Ergebnisse auswirkt.

Es wurde daher der Mittelwert der Wärmefreisetzung der zwei 2,4-DNP-behandelten bzw. der zwei nativen Proben im entsprechenden Intervall ermittelt (siehe weiter unten) und anschließend verglichen; angegeben ist jeweils der Prozentsatz, um den in einem Versuchsansatz die Wärmefreisetzung nach Zugabe von 2,4-DNP ‚durchschnittlich‘ gesteigert wird.

Angesichts der Kurvenverläufe stellte sich jedoch die Frage, in welchem Messzeitraum die Wärmeproduktion der nativen bzw. behandelten Proben verglichen werden sollte. Da bei hohen Konzentrationen wie 100 μM 2,4-DNP im Messzeitraum von insgesamt 9 Stunden die Wärmeproduktion zwar initial deutlich erhöht war, dann aber spätestens zur Hälfte des Messzeitraums unter das Niveau der nativen Proben abfiel, konnte die Wärmeproduktion der 2,4-DNP-behandelten Zellen über den ganzen Messzeitraum gleich oder sogar niedriger als die der nativen Zellen sein (siehe Abbildung 20).

Dies machte deutlich, dass für die Auswertung der Daten die Berücksichtigung eines adäquaten Zeitintervalls, in dem die Daten verglichen werden sollten, notwendig war. Dieses Zeitintervall wurde so gewählt, dass es für alle Versuche vor dem Maximum der

behandelten Kurven lag, um nicht nur den Gesamteffekt von 2,4-DNP im Messintervall, sondern auch den unmittelbaren Effekt von 2,4-DNP beurteilen zu können.

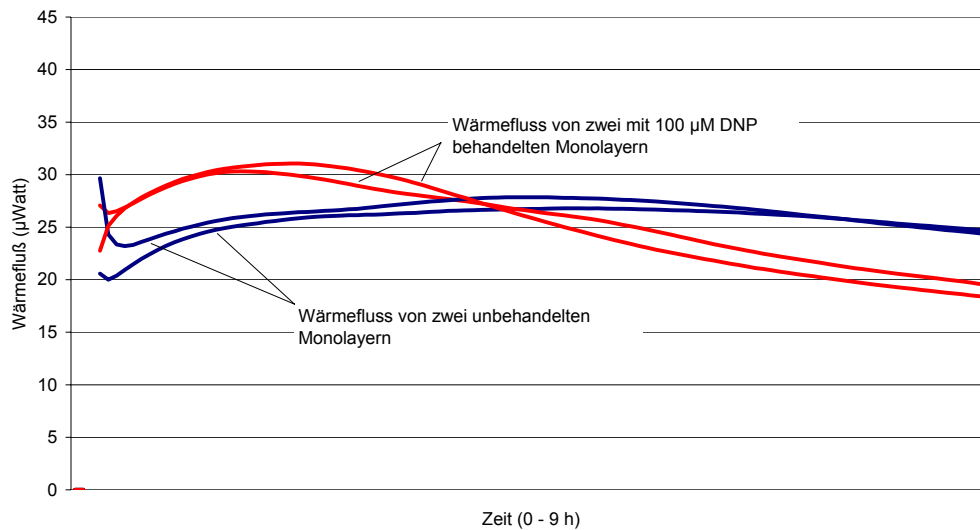


Abbildung 20: Beispiel einer mikrokalorimetrischen Analyse von pA1 Zellen (4 Monolayer, 2 davon behandelt mit 100 μM DNP).

Gezeigt sind jeweils die Wärmeflüsse von zwei unbehandelten und zwei mit 100 μM DNP behandelten Monolayern. Die Messungen entstammen einem Versuchsansatz, durchgeführt mit einem 4-Kanal-Mikrokalorimeter.

Es wurden daher zwei Berechnungen durchgeführt: ein Teil verglich die Daten des gesamten Messintervalls bis zur 9. Stunde, ein zweiter die Daten bis zur 3. Stunde, ein Zeitpunkt, an dem alle unbehandelten Kurven ihr Maximum noch nicht erreicht haben.

Bei manchen Versuchen fiel der Wärmefluss in den ersten Minuten der Messung zuerst um wenige Mikrowatt ab, bevor er kontinuierlich anstieg (siehe Abbildung 18). Da dies als Messartefakt gewertet wurde, wurde mit der Berechnung der Wärmeproduktion nicht nach unmittelbarem Beginn der Messung, sondern generell ab der 20. Minuten begonnen, um die Ergebnisse nicht durch Messartefakte zu verfälschen.

10.1.2. Methodik

Für die aufgezeichneten Wärmefluss-Kurven der behandelten bzw. nativen Versuche eines Versuchsansatzes wurde jeweils die entsprechende Mittelwertskurve berechnet (siehe Abbildung 21). Anschließend wurde für die beiden Mittelwertskurven das jeweilige Integral errechnet. Die Wärmeproduktion der nativen Messung wurde mit der Wärmeproduktion unter 2,4-DNP verglichen, um die prozentuale Steigerung der Wärmeproduktion unter 2,4-DNP bestimmen zu können.

Da auf Grund der kleinen Datenmenge (<10 je Bedingung) nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte und die Daten ferner nicht gepaart vorlagen, mussten die Ergebnisse mit nicht-parametrischen Tests ausgewertet werden.

Hierzu wurden die Mediane der jeweiligen Versuchsreihen berechnet und miteinander verglichen: es wurden ein Test auf generellen Unterschied (Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis) sowie paarweise Vergleiche der Dosisschwerpunkte (Mediane) mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

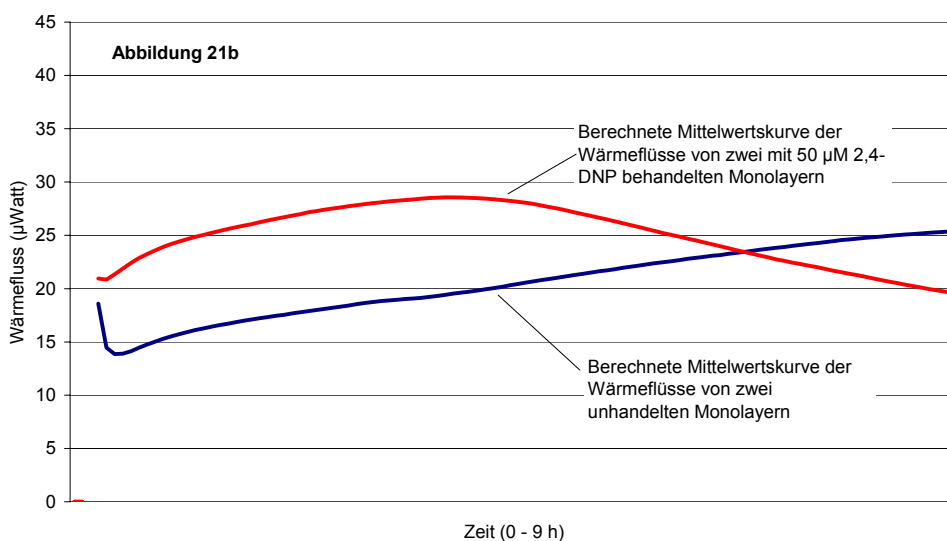
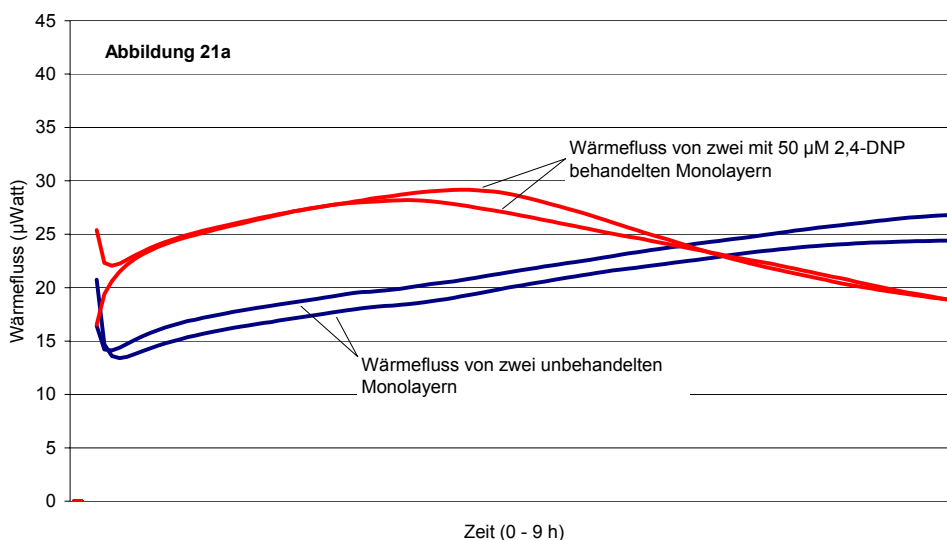


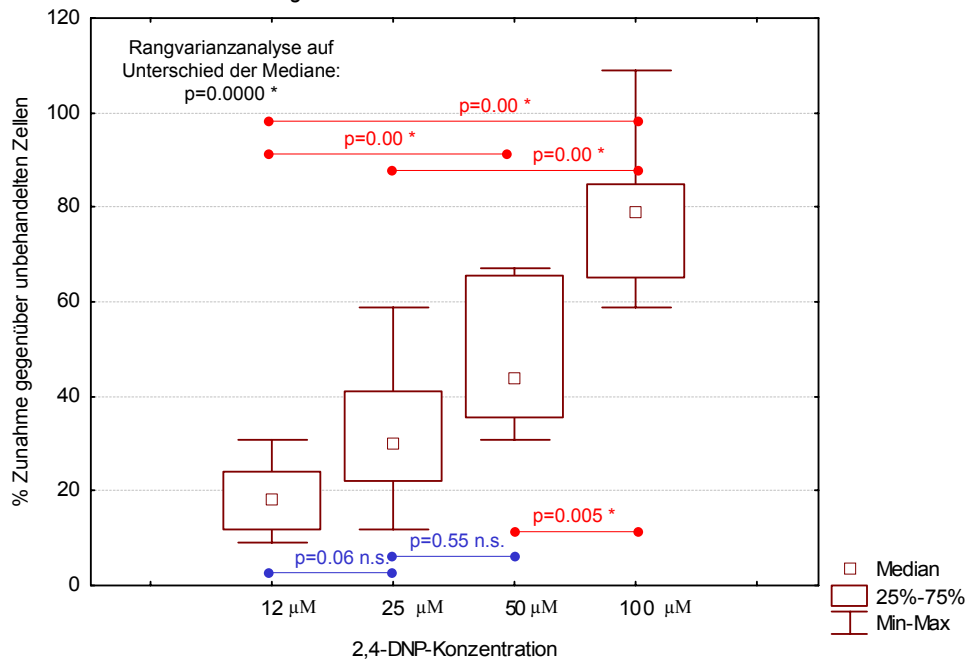
Abbildung 21a und b: Beispiel einer mikrokolorimetrischen Analyse von pA1 Zellen (4 Monolayer, 2 davon behandelt mit 50 µM DNP). Gezeigt sind jeweils die Wärmeflüsse von zwei unbehandelten und zwei mit 50 µM DNP behandelten Monolayern (Abb. 21a) sowie die berechneten Mittelwertskurven (Abb. 21b).

Einen Überblick über die diesem Ansatz zu Grunde liegenden Daten gibt die nachstehende Tabelle (ein Versuchsansatz bestand jeweils aus zwei (un-)behandelten Proben):

Zelllinie	Anzahl der Versuchsansätze für die Versuchsreihen ...			
	12,5 µM DNP	25 µMDNP	50 µMDNP	100 µM DNP
pA1	9	9	7	9

10.1.3. Ergebnisse

Prozentuale Steigerung der absoluten Wärmefreisetzung unterschiedlicher Dosisstufen - ein Vergleich für das Zeitintervall 20.Minute – 3. Stunde



Prozentuale Steigerung der absoluten Wärmefreisetzung unterschiedlicher Dosisstufen - ein Vergleich für das Zeitintervall 20.Minute – 9. Stunde

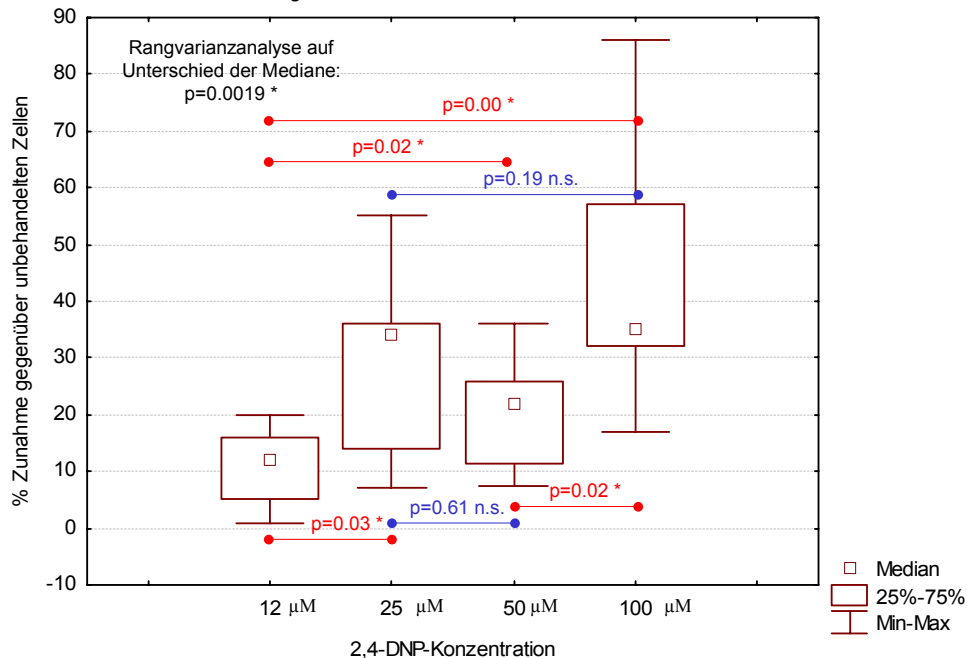


Abbildung 22: Vergleich der prozentualen Zunahme der absoluten Wärmefreisetzung gegenüber unbehandelten Zellen unter unterschiedlichen 2,4-DNP-Dosisstufen

Untersucht wurde das Zeitintervall 20.Min.-3.h. (Abb. 22a) und 20.Min.-9.h. (Abb. 22b). Wichtigster Kennwert für den Vergleich zwischen den Dosisstufen ist der Median. Test auf generellen Unterschied erfolgte mittels Rangvarianzanalyse, die paarweise Vergleiche der Dosischwerpunkte (Mediane) mittels Mann-Whitney-U-Test.

10.1.4. Diskussion

Betrachtet man die Mediane der Versuchsreihen 50 μM und 100 μM 2,4-DNP im Zeitintervall 20.Minute - 3.Stunde fällt auf, dass diese ungefähr die Hälfte der Mediane im Zeitintervall 20.Minute - 9.Stunde betragen. Folglich ist die Wärmefreisetzung unter diesen hohen 2,4-DNP Konzentrationen maßgeblich in den ersten Stunden erhöht: dies resultiert – nach einem raschen, steilen Anstieg des Wärmeflusses unter diesen hohen Konzentrationen - aus dem folgenden raschen Abfall des Wärmeflusses der behandelten Zellen. Ursache hierfür könnte ein herunterregulierter Stoffwechsel sein: auf Grund der enormen Wärmefreisetzung zu Beginn und damit einhergehenden hohem Substratverbrauch wird das Medium ausgezehrt und somit allmählich zum limitierenden Faktor. Eine andere Ursache könnte eine toxische Wirkung des 2,4-DNP sein, die mit der Zeit zu einer Reduktion der Zellzahl und somit zu einer abfallenden Wärmefreisetzung führt.

Die Steigerung der Wärmefreisetzung mit 25 μM 2,4-DNP hält im Vergleich zu den höheren 2,4-DNP Konzentrationen länger an, teilweise sogar über den gesamten betrachteten Zeitraum von 9 Stunden. Dies ist auch der Grund für eine im Prinzip gleiche prozentuale Steigerung der Wärmefreisetzung in den beiden betrachteten Zeitintervallen. Eine Konzentration von 25 μM 2,4-DNP scheint somit im bestehenden Messsystem für eine kontinuierliche Steigerung der Wärmeproduktion zu sorgen. Ursache hierfür könnte eine noch ausreichende Nährstofflage im Medium sein. Die Konzentration könnte aber auch mit 25 μM in einem Bereich liegen, die sich nicht toxisch auf die Zellen auswirkt. Gleiches gilt auch für die Versuchsreihe mit 12,5 μM 2,4-DNP.

Obwohl die statistische Analyse der Daten für das Zeitintervall 20.Minute - 3.Stunde signifikante Unterschiede liefert und die fehlenden Signifikanzen des Zeitintervalls 20.Minute - 9.Stunde erklärbar sind, wird auf die einzelnen Ergebnisse an dieser Stelle nicht näher eingegangen: die Ergebnisse innerhalb der einzelnen Versuchsreihen streuen erheblich. Außerdem unterscheiden sich manche Versuchsreihen wie beispielsweise die Versuchsreihe 25 μM 2,4-DNP hinsichtlich ihres Steigerungspotentials nicht so eindeutig von anderen Versuchsreihen, wie es eigentlich vom Vergleich der graphischen Darstellung der Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze her zu erwarten wäre. Folglich musste die Datenanalyse optimiert werden

Bei Betrachtung der graphischen Darstellung aller bisherigen Versuche fiel auf, dass teilweise auch innerhalb eines Versuchsansatzes die Kurven des registrierten Wärmeflusses unterschiedlich ausfielen. Dies bedeutete, dass - nicht wie ursprünglich angenommen - zumindest innerhalb eines Versuchsansatzes von nur geringfügig variierenden Plättchendichten auszugehen war. Trotz Standardisierung bei der Inkubation der Monolayer und Verwendung der gleichen Passage konnten die Zelldichten auf den

Plättchen offensichtlich auch innerhalb eines Versuchsansatzes erheblich variieren. Dies könnte sowohl die extremen Streuungen der ermittelten Steigerungspotentiale innerhalb einer Versuchsreihe als auch die - entgegen der Erwartung - zum Teil nicht nachweisbaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsreihen erklären.

Um den vermuteten Einfluss offensichtlich schwankender Zelldichten auf die Ergebnisse zu überprüfen, wurden die Ergebnisse graphisch in Abhängigkeit der Wärmeproduktion der nativen Proben dargestellt. Letztere wurde gewählt, da für diese Versuche keine Zellzahlen vorlagen.

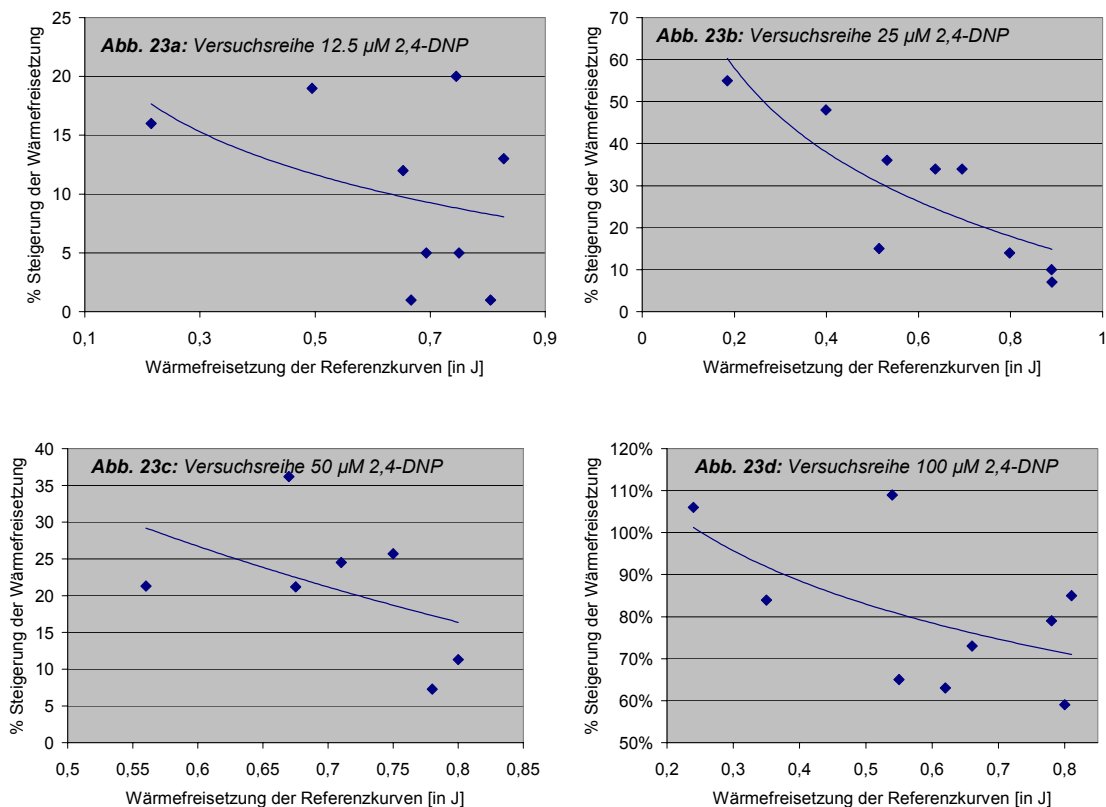


Abbildung 23 a bis d: Prozentuale Steigerung der Wärmefreisetzung unter 12.5 μM , 25 μM , 50 μM und 100 μM 2,4-DNP, jeweils dargestellt in Abhängigkeit der mittleren Wärmefreisetzung der entsprechenden Referenzkurven [pA1 Monolayer, Zeitintervall 20.Min - 9.h].

Wie den Abbildungen zu entnehmen ist, scheinen mit zunehmender Wärmefreisetzung der Referenzkurven - und somit offensichtlich schwankenden Plättchendichten - das Steigerungspotential von 2,4-DNP abzunehmen, was im folgenden näher untersucht werden soll.

Die Graphen erhärten die Vermutung, dass die Plättchendichten variierten und somit die Zellzahl einen Störfaktor darstellte. Dies bekräftigte die Notwendigkeit, ein geeignetes Verfahren zur Ermittlung der Plättchendichten zu etablieren (siehe Kapitel 9.1.3). Die Versuche wurden zudem mit anschließender Bestimmung der Zellzahl wiederholt.

In einem zweiten Ansatz wurde dann der Einfluss des Störfaktors „variierende Plättchendichte“ dadurch minimiert, dass in den oben genannten Ansatz der Berechnung

nicht die absolute Wärmefreisetzung des gesamten Zellrasens, sondern die Wärmefreisetzung umgerechnet auf jeweils eine Zelle (sogenannte „spezifische Wärmefreisetzung“) einfluss.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Datenauswertung mit dem hier vorgestellten Ansatz zum Teil signifikante und gut interpretierbare Ergebnisse lieferte. Dennoch wurde dieser Ansatz verworfen, da durch die Datenanalyse ein unerwarteter Störfaktor (variierende Plättchendichten) im verwendeten Modell identifiziert wurde, der in dem vorgestellten Ansatz nicht berücksichtigt wurde. Da mehrere Zelllinien getestet werden sollten, war es für eine abschließende Gesamtauswertung aller Versuche wichtig, vergleichbare Daten vorliegen zu haben. Es wurden daher die Versuche wiederholt und diesmal im Anschluss daran die Plättchendichten ermittelt. Diese wurden dann in den Daten berücksichtigt, um die Auswertung zu optimieren.

10.2. Ansatz II: Vergleich der spezifischen Wärmeproduktion

10.2.1. Methodische Überlegung

Wie in Kapitel 10.1.4 dargelegt, wurden die Plättchendichten der Monolayer als Störfaktor identifiziert, so dass der erste Ansatz einer Datenanalyse verworfen wurde. Die Versuche wurden wiederholt und somit konnten die Plättchendichten für die Auswertung der unterschiedlichen Wärmeproduktionen berücksichtigt werden. In einem zweiten Ansatz wurde daher untersucht, um wie viel Prozent die *spezifische* Wärmeproduktion unter den jeweiligen Dosisstufen gesteigert wurde.

10.2.2. Methodik

Um die spezifische Wärmefreisetzung zu berechnen, wurde die absolute Wärmefreisetzung der jeweiligen Probe durch die ermittelte Anzahl der Zellen dieser Probe dividiert. Die Ergebnisse der spezifischen Wärmefreisetzung *einer* behandelten Probe wurden jeweils mit den gemittelten spezifischen Wärmefreisetzungen der zwei nativen Proben des Versuchsansatzes verglichen. Die Auswertung wurde mit der prozentualen Steigerung der spezifischen Wärmefreisetzung der behandelten Zellen im Vergleich zum Mittel der Kontrollzellen durchgeführt. Da die Zellzahl erst nach der Messung des kompletten Zeitintervalls (9h) ermittelt werden konnte, beschränkte sich der Vergleich der spezifischen Wärmefreisetzung auf das Intervall 20. Minute – 9. Stunde. Im Anschluss wurden die Daten dann wie im Ansatz I analysiert.

Darüber hinaus wurden in analoger Weise wie in Ansatz I die ermittelten (spezifischen) Steigerungspotentiale in Abhängigkeit der Zellzahl dargestellt, um die Vermutung der Abhängigkeit des Steigerungspotentials von den variierenden Zelldichten zu bestätigen.

Einen Überblick über die Datenlage gibt die nachstehende Tabelle (ein Versuchsansatz bestand jeweils aus zwei (un-)behandelten Proben):

Zelllinie	Anzahl der Versuchsansätze für die Versuchsreihen ...			
	12,5 μ M DNP	25 μ MDNP	50 μ M DNP	100 μ M DNP
pA1	6	8	5	0
	... entsprechende Anzahl der behandelten Versuche ...			
pA1	12	16	10	0

Für die Versuchsreihe mit 100 μ M 2,4-DNP wurden zwar Versuche durchgeführt, diese konnten aber nicht verwendet werden, da sich das verwendete Verfahren zur Ermittlung der Plättchendichte als ungeeignet herausstellte (siehe Kapitel 9.2.1). Die Versuchsreihe 100 μ M 2,4-DNP wurde jedoch später wiederholt und die Zellzahlen mit einem dem LDH-Test ermittelt.

10.2.3. Ergebnis

Prozentuale Steigerung der spezifischen Wärmefreisetzung unterschiedlicher Dosisstufen - ein Vergleich für das Zeitintervall 20. Minute – 9. Stunde

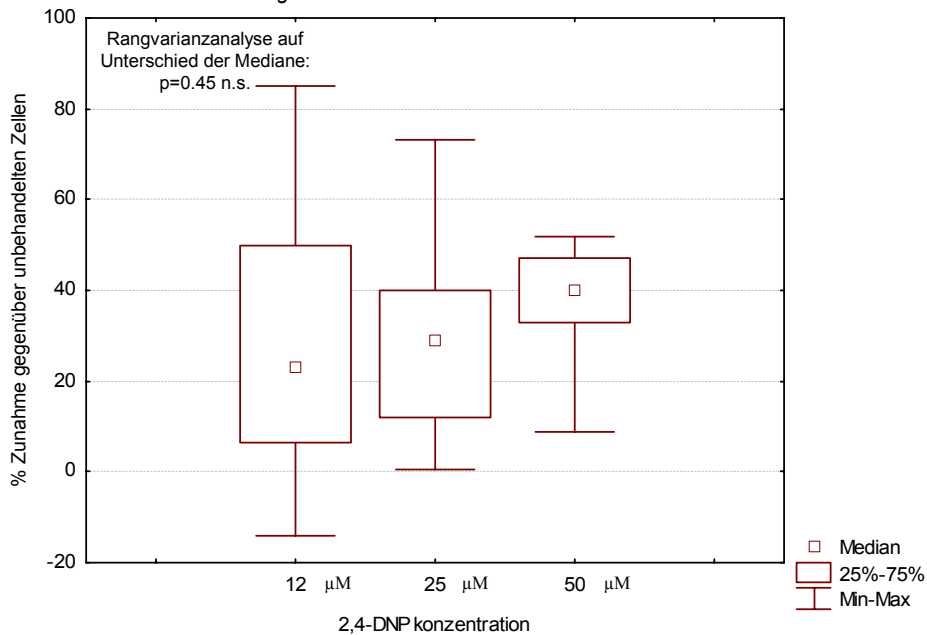


Abbildung 24: Vergleich der prozentualen Zunahme der absoluten Wärmefreisetzung gegenüber unbehandelten Zellen unter unterschiedlichen 2,4-DNP-Dosisstufen. Untersucht wurde das Zeitintervall 20.Min.-9.h. Ein Vergleich der Mediane ergab weder einen generellen noch lokalen Unterschied.

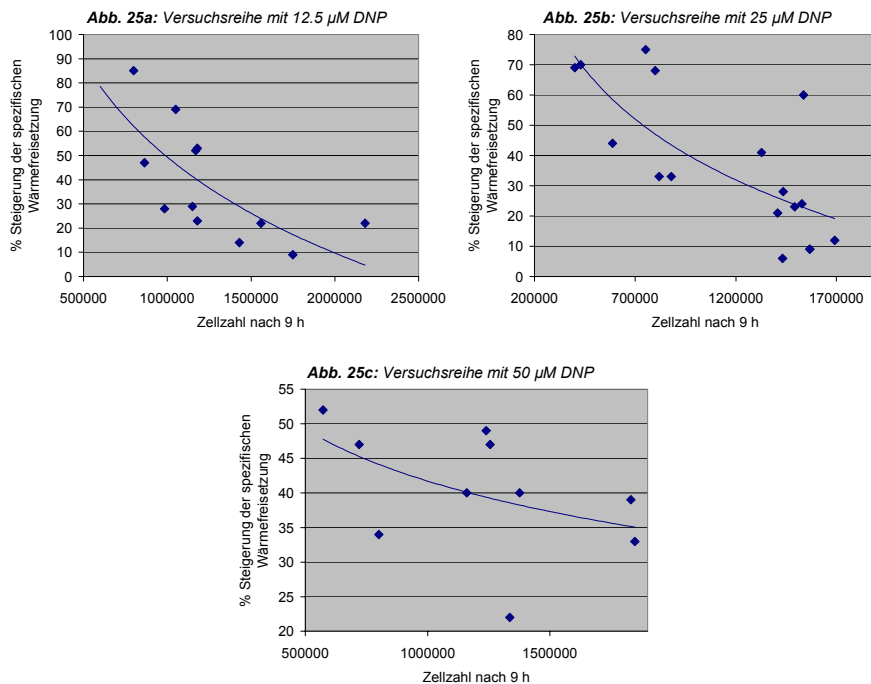


Abbildung 25 a bis c: Prozentuale Steigerung der Wärmefreisetzung unter 12.5 µM, 25 µM und 50 µM 2,4-DNP, jeweils dargestellt in Abhängigkeit der entsprechenden Zellzahl [pA1 Monolayer, Zeitintervall 20.Min - 9.h].

Die Graphiken in Abbildung 25 bestätigen folgende Vermutungen: 1: Die Plättchendichten der Monolayer schwanken wider Erwarten. 2: Es gibt offensichtlich einen Zusammenhang zwischen schwankenden Plättchendichten und dem Steigerungspotential von 2,4-DNP.

10.2.4. Diskussion

Eine Abhängigkeit der Steigerungspotentiale von der Zelldichte für die Ergebnisse der Versuchsreihen 12,5 μM und 25 μM 2,4-Dinitrophenol scheint gegeben: mit steigender Zellzahl fiel die prozentuale Steigerung der spezifischen Wärmefreisetzung ab. Ursache hierfür könnte ein bei höherer Zellzahl ausgezehrt Medium sein, aber auch eine bei höherer Zelldichte verschlechterte Diffusion von 2,4-Dinitrophenol in die Zellen wäre denkbar. Bei der Versuchsreihe mit 50 μM 2,4-Dinitrophenol schien eine solche Abhängigkeit nicht gegeben, was jedoch auf die in dieser Versuchsreihe geringeren Stichzahl zurückzuführen sein könnte. Berücksichtigt man jedoch auch die Ergebnisse der Abhängigkeitsuntersuchung ‚Steigerungspotential – Wärmefreisetzung Referenzkurve‘ aus Ansatz I, könnte eine Abhängigkeit angenommen werden.

Hinsichtlich der prozentualen Steigerung der spezifischen Wärmefreisetzung pro Zelle waren keine klaren Unterschiede unter den verschiedenen Versuchsreihen erkennbar. Dies schien, zumindest für die Versuchsreihe 12,5 μM 2,4-DNP im Vergleich zu den anderen zwei Versuchsreihen, nach Sicht der Rohdaten nicht realistisch. Zudem waren nach wie vor große Streuungen der Ergebnisse innerhalb der Versuchsreihen zu beobachten. Auch dieser Ansatz schien daher als nicht geeignet.

Es liegt die Vermutung nahe, dass das Problem der variierenden Plättchendichten nicht durch einfaches Einbeziehen des Störfaktors ‚Zellzahl‘ in die Berechnung behoben ist. Der Faktor Zellzahl scheint nicht eine starre Störgröße darzustellen (nämlich die der Zellzahl an sich), sondern eher eine variable, die um den Einfluss des sogenannten „crowding-Effekts“ erweitert werden muss. Auf Grund variierender Zelldichten auf den Plättchen und den dadurch variablen Einfluss des crowding-Effekts ist es daher nicht angebracht, einen Versuchsansatz als Einheit zu betrachten und diesen entsprechend auszuwerten. Es wurde daher anderer Weg in der Auswertung getestet, der die vermutete Störgröße in unserem Messsystem adäquat berücksichtigte.

Im folgenden Kapitel soll zuerst das Phänomen des crowding-Effekts näher untersucht werden, bevor dann im Kapitel 10.4. ein weiterer Ansatz zur Auswertung vorgestellt wird.

10.3. Der crowding-Effekt

Der crowding-Effekt beschreibt das Phänomen, dass mit zunehmender Zellzahl in einer Kultur die Stoffwechselrate einer Zelle – und somit auch die spezifische Wärmefreisetzung je Zelle - abnimmt. Dieser Begriff wurde erstmals von Esmann et al. geprägt, die bei der Messung des Sauerstoffverbrauchs bei Lymphozyten feststellten, dass dieser je Zelle um so niedriger ausfiel, je höher die Zellzahl im Messansatz war⁹⁹.

10.3.1. Methodische Überlegung

Um den vermuteten Zusammenhang zwischen crowding-Effekt und absoluter bzw. spezifischer Wärmeproduktion in dem etablierten Messsystem nachzuweisen, wurde in einem ersten Schritt die Wärmeproduktion aller unbehandelten Monolayer in Abhängigkeit der Zellzahl exemplarisch am Beispiel der pA1 Zelllinie graphisch dargestellt (siehe Abbildung 27a). In einem zweiten Schritt wurde schließlich die spezifische Wärmeproduktion in Abhängigkeit der Zellzahl in einem doppellogarithmierten Graphen dargestellt und eine Regressionsanalyse durchgeführt (siehe Abbildung 27b).

Um den Einfluss des crowding-Effektes auf die Wärmeproduktion für alle vier gemessenen Zelllinien zu quantifizieren, wurde das Zusammenhangsmaß zwischen Wärmefluss und Zellzahl für alle Versuchsreihen mit unbehandelten Versuchsansätzen nach dem Verfahren nach Spearman berechnet. Dieses Verfahren wurde für die Korrelationsanalyse ausgewählt, da trotz metrischer Skalierung beider untersuchten Merkmale ein linearer Zusammenhang zwischen Wärmefluss und Zellzahl aus fachlich-theoretischen Überlegungen nicht erwartet werden konnte. Aufgrund der kleinen Anzahl der Versuchsansätze sowie nicht zu erwartender Normalverteilung der Messdaten schied ein parametrisches Auswerteverfahren wie die Korrelationsanalyse nach Pearson aus.

Abschließend wurde der crowding-Effekt exemplarisch an zwei Beispielen quantifiziert, um eine Vorstellung vom Einfluss dieses Störfaktors auf die Messergebnisse zu bekommen. Im ersten Beispiel (siehe Abbildung 28) wurden den tatsächlichen Wärmeproduktionen von vier pA1-Monolayern mit unterschiedlichen Zelldichten die theoretisch berechneten Wärmeproduktionen gegenübergestellt. Diese theoretische Wärmeproduktionen wurden wie folgt kalkuliert: Die spezifische Wärmeproduktion der Zellen des am geringsten bewachsenen Monolayers wurde jeweils mit der Zellzahl der drei dichter besiedelten Plättchen multipliziert um so die theoretische Wärmeproduktion je Monolayer zu bekommen. Hierbei wurde in Kauf genommen, dass auch auf dem am dünnsten besiedelten Plättchen ein crowding-Effekt vorhanden war, welcher für die Berechnung jedoch als nicht vorhanden angenommen wurde.

Im einem weiteren Beispiel (siehe Abbildung 29) sollte zudem verdeutlicht werden, dass der crowding-Effekt auch innerhalb eines Versuches einen gewichtigen Einfluss auf die Wärmeproduktion hat: die initiale spezifische Wärmeproduktion pro Zelle wurde auf die am Versuchsende bestimmte Zellzahl extrapoliert. Die initiale Zellzahl wurde wie folgt bestimmt: insgesamt wurden 4 Monolayer inkubiert, wovon nur einer mikrokolorimetrisch untersucht wurde. Von den anderen 3 Monolayern wurden jeweils die Plättchendichten bestimmt. Das Mittel der ermittelten Zellzahlen wurde als die initiale Zellzahl des im Mikrokolorimeter gemessenen Monolayers angenommen.

10.3.2. Ergebnis

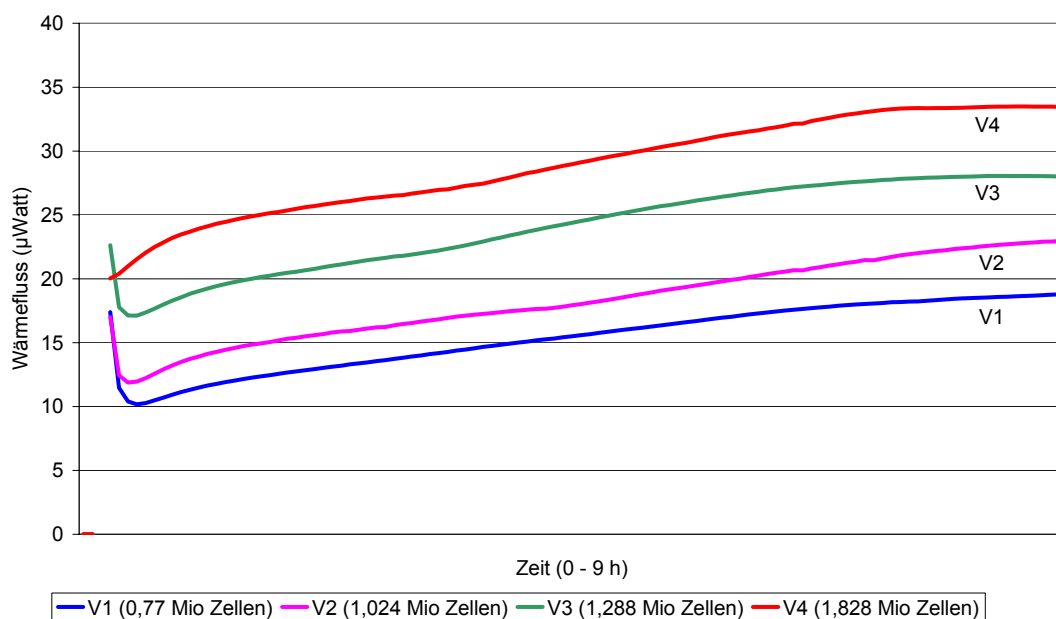


Abbildung 26: Wärmefluss von vier Monolayern mit unterschiedlichen Plättchendichten
Die Messungen entstammen einem Versuchsansatz, durchgeführt mit einem 4-Kanal-Mikrokolorimeter [pA1, unbehandelt].

Wie in Abbildung 26 am Beispiel von vier ausgewählten pA1 Plättchen mit unterschiedlichen Zelldichten zu erkennen ist, nimmt die Wärmeproduktion mit steigender Zellzahl auf den Plättchen zu. Eine Veranschaulichung des Zusammenhangs von mittlerer Wärmeproduktion / Monolayer und Zellzahl zeigt jedoch, dass der Anstieg der Wärmeproduktion nicht proportional zur Zellzahl verläuft (Abbildung 27a). Eine Analyse des Zusammenhangs spezifische Wärmeproduktion und Zellzahl erklärt die Ursache hierfür (Abbildung 27b): mit zunehmender Plättchendichte nimmt die spezifische Wärmeproduktion ab. Die Art des Zusammenhangs konnte mittels Regressionsanalyse in einem doppellogarithmierten Graphen mit der mathematischen Funktion $\lg Y = -0.83 \lg X + 6.31$ beschrieben werden; die Verlässlichkeit der Schätzung ist durch das errechnete Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0.9003$ gegeben.

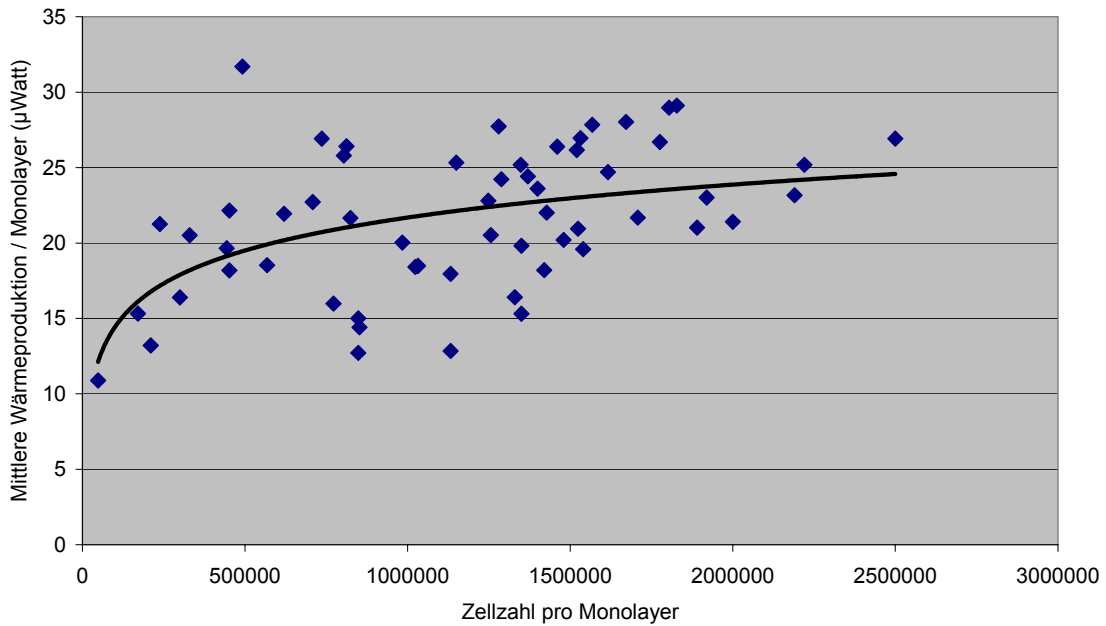


Abbildung 27a: Mittlere Wärmeproduktion pro Monolayer - dargestellt in Abhängigkeit der Zellzahl
 Höhere Zellzahlen bedingen eine höhere Wärmeproduktion - aber nicht in einem proportionalen Verhältnis: bei einer Zellzahl von einer Million Zellen pro mittlerem Plättchen beträgt die mittlere Wärmeproduktion pro Monolayer in etwa 22 Mikrowatt; bei zwei Millionen Zellen nur etwa 24 Mikrowatt. [pA1 - unbehandelte Zellen].

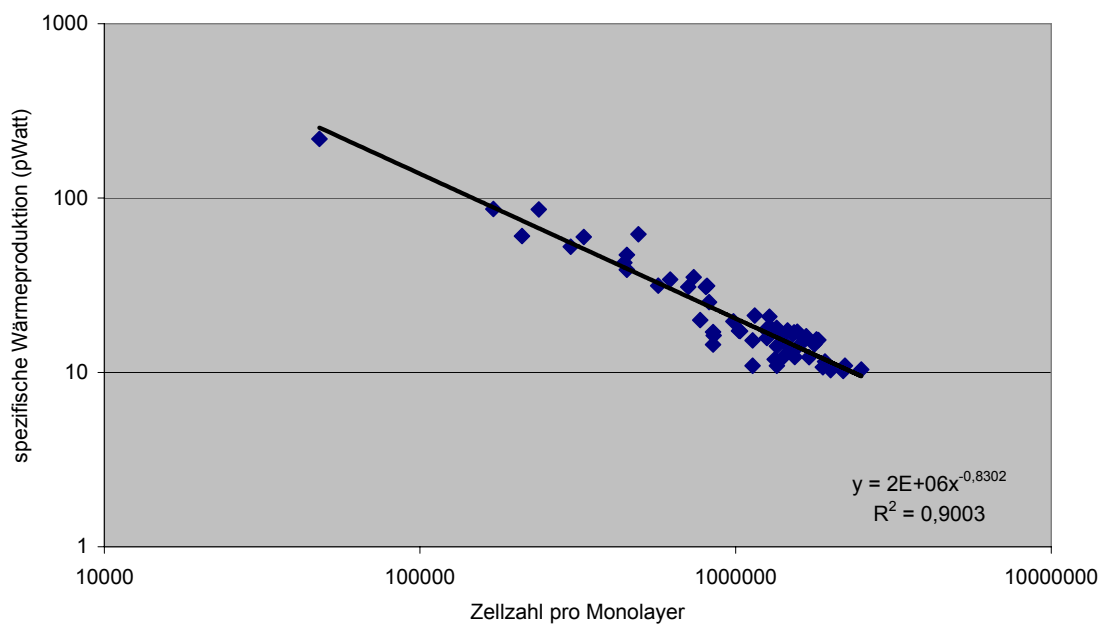


Abbildung 27b: Spezifische Wärmeproduktion - dargestellt in Abhängigkeit der Zellzahl [pA1 - unbehandelte Zellen] in einem doppellogarithmierten Graphen.
 Der Zusammenhang zwischen Zellzahl und spezifischer Wärmeproduktion kann mittels Regressionsanalyse mit der Funktion $\lg Y = -0.83 \lg X + 6.31$ beschrieben werden. Die Verlässlichkeit der Schätzung ist mit $R^2=0.9003$ gegeben.

pA1 (Korrelation nach Spearman)			Koeffizient	p-Wert	Fälle	Wertung der Korrelation
1 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.35	p<0.001 ***	n = 89	nicht verw.b. Korr.
2 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.36	p<0.001 ***	n = 89	nicht verw.b. Korr.
3 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.41	p<0.001 ***	n = 89	nicht verw.b. Korr.
4 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.47	p<0.001 ***	n = 89	nicht verw.b. Korr.
5 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.54	p<0.001 ***	n = 89	moderate Korr.
6 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.58	p<0.001 ***	n = 89	moderate Korr.
7 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.62	p<0.001 ***	n = 89	moderate Korr.
8 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.62	p<0.001 ***	n = 89	moderate Korr.
9 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.59	p<0.001 ***	n = 89	moderate Korr.

BT20 (Korrelation nach Spearman)			Koeffizient	p-Wert	Fälle	Wertung der Korrelation
1 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.63	p<0.001 ***	n = 54	moderate Korr.
2 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.64	p<0.001 ***	n = 54	moderate Korr.
3 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.62	p<0.001 ***	n = 54	moderate Korr.
4 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.63	p<0.001 ***	n = 54	moderate Korr.
5 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.63	p<0.001 ***	n = 54	moderate Korr.
6 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.64	p<0.001 ***	n = 54	moderate Korr.
7 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.64	p<0.001 ***	n = 54	moderate Korr.
8 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.66	p<0.001 ***	n = 54	moderate Korr.
9 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.69	p<0.001 ***	n = 51	moderate Korr.

HUVEC (Korrelation nach Spearman)			Koeffizient	p-Wert	Fälle	Wertung der Korrelation
1 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.22	p=0.22 n.s.	n = 32	kein Zus.
2 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.25	p=0.16 n.s.	n = 32	kein Zus.
3 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.26	p=0.15 n.s.	n = 32	kein Zus.
4 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.25	p=0.16 n.s.	n = 32	kein Zus.
5 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.31	p=0.09 n.s.	n = 32	kein Zus.
6 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.36	p=0.04 *	n = 32	nicht verw.b. Korr.
7 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.33	p=0.07 n.s.	n = 32	kein Zus.
8 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.29	p=0.10 n.s.	n = 32	kein Zus.
9 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.31	p=0.09 n.s.	n = 32	kein Zus.

KERA (Korrelation nach Spearman)			Koeffizient	p-Wert	Fälle	Wertung der Korrelation
1 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.79	p<0.001 ***	n = 31	hohe Korr.
2 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.81	p<0.001 ***	n = 31	hohe Korr.
3 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.82	p<0.001 ***	n = 31	hohe Korr.
4 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.83	p<0.001 ***	n = 31	hohe Korr.
5 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.84	p<0.001 ***	n = 31	hohe Korr.
6 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.83	p<0.001 ***	n = 31	hohe Korr.
7 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.85	p<0.001 ***	n = 31	hohe Korr.
8 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.86	p<0.001 ***	n = 31	hohe Korr.
9 h	in Korr. mit	Zellzahl	r = 0.88	p<0.001 ***	n = 31	hohe Korr.

Tabelle 1: Ergebnis der Korrelationsberechnungen (Korrelationskoeffizient nach Spearman zur Berechnung des Zusammenhangsmaßes zwischen Wärmefluss und Zellzahl).

Die Korrelationsanalyse nach Spearman bestätigte einen monotonen Zusammenhang (moderate Korrelation) für die Versuchsreihen mit pA1-Zellen und konnte zudem für BT20 Zellen eine moderate und für Keratinozyten eine hohe Korrelation von Wärmefluss und Zellzahl zeigen. Für die Versuche mit HUVEC-Zellen konnte hingegen keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen werden.

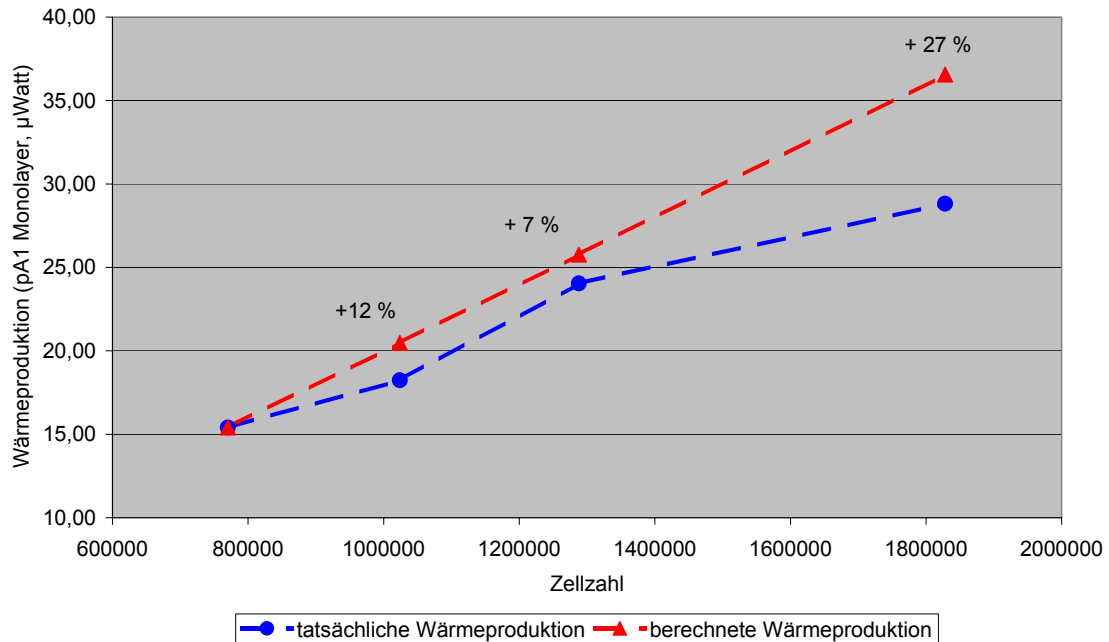


Abbildung 28: Demonstration des crowding-Effekts an ausgewählten Beispielen: Für vier Monolayer mit unterschiedlichen Plättchendichten ist die gemessene Wärmeproduktion angegeben. Die Extrapolation der berechneten spezifischen Wärmeproduktion des Plättchens mit dem geringsten Zellbewuchs auf die anderen drei Plättchen demonstriert den crowding-Effekt.

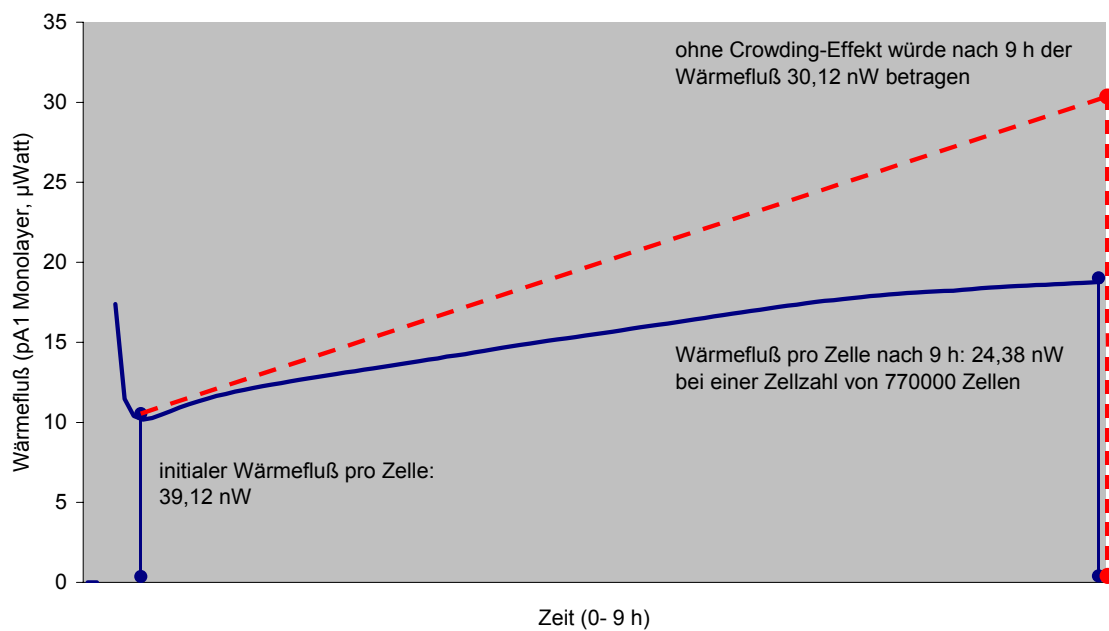


Abbildung 29: Exemplarische Demonstration des crowding-Effekts innerhalb eines Versuchs

Abbildung 28 zeigt für vier ausgewählte Monolayer mit unterschiedlichen Plättchendichten (770000, 1024000, 1288000 bzw. 1828000 Zellen) die gemessenen Wärmeproduktionen. Die Extrapolation der berechneten spezifischen Wärmeproduktion des Plättchens mit dem geringsten Zellbewuchs auf die anderen drei Plättchen demonstriert den crowding-Effekt: um 12 %, 7 % bzw. 27 % müsste in diesem konkreten Fall die Wärmeproduktion ohne einen (folgenden) crowding-Effekt höher ausfallen.

Abbildung 29 zeigt das (theoretisch ermittelte) Ausmaß des crowding-Effekts auf die Wärmeproduktion innerhalb eines Versuchs: es beträgt 24%.

10.3.3. Diskussion

Die für alle verwendeten Zelllinien durchgeführte Korrelationsanalyse bestätigte den vermuteten Zusammenhang von Wärmefluss und Zellzahl für die Zelllinien pA1, BT20 und Keratinozyten. Lediglich für die HUVEC-Zellen konnte keine Korrelation nachgewiesen werden. Dies könnte jedoch auf die im Vergleich zu den anderen Zellarten geringen Plättchendichten der Monolayer dieser benignen Zellart zurückzuführen sein.

Die graphische Darstellung der Wärmeproduktion aller pA1-Monolayer in Abhängigkeit der Plättchendichten zeigte, dass die absolute Wärmefreisetzung der unbehandelten Zellen eines Versuches– wie zu erwarten - um so höher war, je höher die Zellzahl auf den Plättchen war. Bei Zunahme der Zellzahl erhöhte sich jedoch die Wärmefreisetzung nicht proportional: mit steigender Zellzahl und somit größerer Zelldichte auf dem Plättchen reduzierte sich nämlich die spezifische Wärmefreisetzung. Es konnte somit am Beispiel der pA1-Zelllinie ein crowding-Effekt in dem Messsystem nachgewiesen werden.

Der crowding-Effekt wurde bereits im Rahmen anderer Untersuchungen bestätigt, wobei er jedoch meist bei Versuchen mit Zellsuspensionen beschrieben wurde. Einzig Nässberger et al. zeigten in Versuchen mit (Ratten-)Hepatozyten eine Abhängigkeit der spezifischen Wärmefreisetzung von der Zellzahl nicht nur für die Zellsuspension, sondern auch für Monolayer²⁵.

Gebreselassie et al. stellte in seinen mikrokalorimetrischen Untersuchungen (Rührampulle) über den Energiestoffwechsel von auf Mikrokarriern kultivierten benignen und Benzopyren-transformierten 3T3-Zellen ebenfalls eine klare Abhängigkeit der spezifischen Wärmefreisetzung von der Zellzahl fest¹⁰⁰.

Schön et al. konnten hingegen bei seinen Untersuchungen mit T-Lymphom-Zellen keine signifikante Änderung der Wärmefreisetzung pro Zelle mit steigender Zellzahl feststellen¹⁰¹. Die Zellzahl variiert in ihren Versuchen zwischen 1,5 und 3,5 Millionen - ein Bereich in dem eigentlich eine entsprechende Abhängigkeit zu erwarten wäre. Die von Schön et al. untersuchte Stichprobe ist aber auch mit 6 Einzelversuchen sehr gering.

Der crowding-Effekt ist nicht nur bei Zellen mit steigender Zellzahl zu beobachten, sondern auch bei Gewebe mit zunehmendem Gewicht, wie beispielsweise Singer et al. oder Asakawa et al. nachgewiesen haben ^{26,102}.

Eine eindeutige Ursachenzuweisung des crowding-Effekts ist in der Literatur nicht zu finden. Vielmehr werden unterschiedliche Hypothesen angeführt, von denen einige sich jedoch verknüpfen lassen. Im folgenden soll versucht werden, einen Überblick und Zusammenhänge der diskutierten Hypothesen aufzuzeigen:

- Morphologie: Gebreselassie et al. diskutieren als Ursache des crowding-Effekts ein bei hohen Zellzahlen geringeres Volumen sowie eine kleinere Oberfläche pro Zelle, was schließlich eine niedrigere Stoffwechselrate pro Zelle zur Konsequenz hat ¹⁰⁰.
- Stoffwechsel: Die von Gebreselassie et al. angeführte Überlegung kann mit der von Singer et al. verknüpft werden. Singer et al. postulieren bei zunehmender Zellzahl eine Veränderung des Stoffwechsels in der Hinsicht, dass damit der Anteil des anaeroben Stoffwechsels steigt- und somit die Wärmefreisetzung niedriger ausfällt ¹⁰². Ihre These wird von Untersuchungen gestützt, die eine beeinträchtigte Sauerstoffversorgung mit zunehmender Zellzahl nachweisen konnten ¹⁰³. Diese wiederum könnte durch eine veränderte Morphologie bedingt sein (siehe oben).
- Medium: Generell bedeutet eine höhere Zellzahl auch eine schnellere Auszehrung des Mediums. Eine entsprechend niedrigere Sauerstoffsättigung sowie eine Reduktion von Substraten wie Glucose oder Glutamin im Medium können somit die Stoffwechselrate der Zelle und damit die Wärmefreisetzung der Zelle reduzieren.

Insbesondere bei Verwendung eines geschlossenen Systems im Mikrokalorimeter – und damit einer nur begrenzten Möglichkeit der Sauerstoff-Aufsättigung über die verbleibende Gasphase in der Ampulle – und speziell bei Messung einer großen Anzahl von Zellen ist es nicht ausgeschlossen, dass die Sauerstoffkonzentration nicht zum limitierenden Faktor wird. Ferner ist bei großer Zellzahl eine starke Ansäuerung des Kulturmediums durch Stoffwechselprodukte nicht ausgeschlossen. Da ein abfallender pH die Wärmefreisetzung beeinflussen kann, sollte der pH bei Langzeit-Versuchen im Mikrokalorimeter unbedingt kontrolliert werden.

Schön und Wadsö konnten in mikrokalorimetrischen Versuchen mit T-Lymphom-Zellen eine lineare Abhängigkeit der spezifischen Wärmefreisetzung pro Zelle vom pH-Wert feststellen ¹⁰¹: von einem pH-Wert von 7.2 ausgehend verringerte sich pro Abnahme des pH um eine pH-Unit (0.1) die spezifische Wärmefreisetzung pro Zelle um 21%. Auch für andere Zellen wurde bereits eine Abhängigkeit der Wärmefreisetzung von einem abnehmendem pH beschrieben: humane Lymphozyten (78% pro pH-Unit), Adipocyten (60% pro pH-Unit), Erythrozyten (120% pro pH-Unit) ¹⁰¹. Gebreselassie et al. konnten in ihren Untersuchungen über den Energiestoffwechsel bei 3T3-Zellen keine Abhängigkeit der

Wärmefreisetzung im pH-Bereich 7-8 feststellen¹⁰⁰. Ab einem pH-Wert unter 7 war jedoch ein Abfall der Wärmefreisetzung pro Zelle um 18% pro pH-Unit festzustellen. Bei Benzopyren-transformierten 3T3-Zellen waren bereits im pH-Bereich 7-8 ein Abfall der Wärmefreisetzung pro Zelle um 34% pro pH-Unit zu beobachten. Die Ursache für die höhere pH-Abhängigkeit der transformierten 3T3-Zellen wurde in der starken pH-Abhängigkeit der Phosphofruktokinase vermutet.

Nässberger et al. konnten in ihren bereits schon weiter oben beschriebenen Untersuchungen den crowding-Effekt bei Monolayern auch für sehr niedrige Zellzahlen (10000 bis 70000 Zellen/ml) nachweisen²⁵. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden ebenfalls niedrige Zellzahlen verwendet, zudem waren die Zellen wie bei Nässberger et al. als Monolayer kultiviert, so dass als Ursache für den crowding-Effekt nur bedingt Änderung des Mediums oder der Zellmorphologie zu vermuten sind. Als mögliche spezifische Ursachen für den crowding-Effekt bei Monolayern wären daher zu diskutieren:

- Diffusionsprobleme bedingt durch ungerührtes Medium um die Glasplättchen herum oder wider Erwarten dreidimensionales Wachstum auf den Plättchen
- Wachstumsinhibition durch Kontakthemmung der Zellen auf den Plättchen

Insgesamt legt diese Untersuchung den Schluss nahe, dass die Einflussnahme der Zellzahl auf das Messergebnis als massiv zu werten ist und hier kein einfacher Störfaktor vorliegt, der nur am Rande oder nur partiell Einfluss nimmt. Schlussfolgernd fordern diese Berechnungen die direkte Berücksichtigung von Quotienten aus Wärmefluss und Zellzahl für alle weiteren Analysen, wie nachfolgend fortgeführt.

Der Nachweis des Störfaktors ‚crowding-Effekt‘ am Beispiel der pA1-Zelllinie lässt vermuten, dass dieser auch bei anderen Zelllinien auftritt. Die exemplarischen Demonstrationen des crowding-Effekts zeigen den zum Teil erheblichen Einfluss dessen auf die Wärmeproduktion. Auf Grund seiner Dynamik lässt sich der crowding-Effekt jedoch in dem bestehenden Modell nur schwer eliminieren. Es gibt jedoch Möglichkeiten, das Ausmaß des crowding-Effekts deutlich zu reduzieren, zum Beispiel durch kürzere Messzeiten. Diese würden eine geringere Proliferation der Zellen und somit nur gering zunehmende Plättchendichten bedingen. Das Ausmaß des crowding-Effekts könnte so erheblich reduziert werden. Ebenso würde die Definition einer bestimmten Plättchendichte als Einschlusskriterium für die Datenanalyse dazu beitragen.

10.4. Ansatz III: Vergleich der Versuchsreihen mittels Regressionsanalyse

10.4.1. Methodische Überlegung

Nachdem im vorherigen Kapitel der crowding-Effekt als Störfaktor identifiziert und Möglichkeiten einer Begrenzung seines Einflusses diskutiert wurden, wurde im folgenden der Versuch unternommen, den Störfaktor crowding-Effekt bei der Datenauswertung zu berücksichtigen. Unter Annahme der Unabhängigkeit der Daten wurden die ermittelten spezifischen Wärmefreisetzungen aller Versuchsreihen in Abhängigkeit der Zellzahl dargestellt. Von einer Unabhängigkeit der Daten wurde ausgegangen, da für jede Probe im Anschluss an die Messung die Zellzahl ermittelt wurde. Anschließend wurden für die in Abhängigkeit der Zellzahl dargestellten spezifischen Wärmefreisetzungen einer Versuchsreihe die Regressionsgeraden berechnet. Würde eine Regressionsanalyse die Regressionsgerade verlässlich schätzen, wäre es möglich, für ausgewählte Zellzahlen den Einfluss unterschiedlicher 2,4-DNP Konzentrationen zu bestimmen. Auf diese Weise würde der crowding-Effekt zwar nicht eliminiert werden, es könnten jedoch Aussagen über die Wirkung unterschiedlicher 2,4-DNP Dosisstufen für bestimmte Zellzahlen getroffen werden, ohne dass es zu Störungen durch den crowding-Effekt kommt.

10.4.2. Methodik

In analoger Weise wie in Kapitel 10.3.2. wurden die spezifischen Wärmefreisetzungen sämtlicher Versuchsreihen für das Zeitintervall 20. Minute – 9. Stunde berechnet. Unter der Annahme, dass sich die Zellzahl zwischen der dritten und der neunten Stunde nur vernachlässigbar verändert, wurde analog für den Zeitraum 20. Minute - 3. Stunde die spezifische Wärmefreisetzung berechnet.

Die vier durchgeführten Versuchsreihen mit den 2,4-Dinitrophenol Konzentrationen 12.5 μM , 25 μM , 50 μM und 100 μM konnten nicht unmittelbar miteinander verglichen werden, da die Bestimmung der Zellzahl der pA1-Monolayer der (zweiten) Versuchsreihe mit 100 μM 2,4-DNP deutlich niedrigere Zellzahlen ergab (0.1 Mio bis 0.8 Mio), als die der vorausgegangenen anderen drei Versuchsreihen (0.6 Mio bis 2.5 Mio). Ursächlich hierfür war vermutlich die Verwendung einer anderen Charge der pA1-Zellen für die Versuchsreihe mit 100 μM 2,4-DNP, in der die Zellen offensichtlich eine geringere Aktivität aufwiesen. Die Ergebnisse der Versuchsreihe mit 100 μM 2,4-DNP wurden daher gesondert betrachtet. Einen Überblick über die Datenlage gibt die nachstehende Tabelle:

Anzahl der durchgeführten Versuche pro Dosisstufe (pA1-Zelllinie):

<i>0 μM 2,4-DNP</i>	<i>0 μM 2,4-DNP</i>	<i>25 μM 2,4-DNP</i>	<i>50 μM 2,4-DNP</i>	<i>100 μM 2,4-DNP</i>
46	18	18	10	14

10.4.3. Ergebnis

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die in diesen Ansatz eingeflossenen Daten sowie die Ergebnisse der Regressionsanalysen:

Versuchsreihe	Anzahl der Messungen	Bestimmtheitsmaß der entsprechenden Regressionsgerade 20.Min.-3.h	Bestimmtheitsmaß der entsprechenden Regressionsgerade 20.Min.-9.h
0 µM 2,4-DNP(I) <small>(Referenzen Versuchsreihen 12.5-50 µM)</small>	46	0,538	0,6302
12.5 µM 2,4-DNP	18	0,4644	0,652
25 µM 2,4-DNP	18	0,5855	0,8074
50 µM 2,4-DNP	10	0,7377	0,9359

Versuchsreihe	Anzahl der Messungen	Bestimmtheitsmaß der entsprechenden Regressionsgerade 20.Min.-3.h	Bestimmtheitsmaß der entsprechenden Regressionsgerade 20.Min.-9.h
0 µM 2,4-DNP(II) <small>(Referenzen Versuchsreihe 100 µM)</small>	14	0,7599	0,8699
100 µM 2,4-DNP	14	0,9518	0,8219

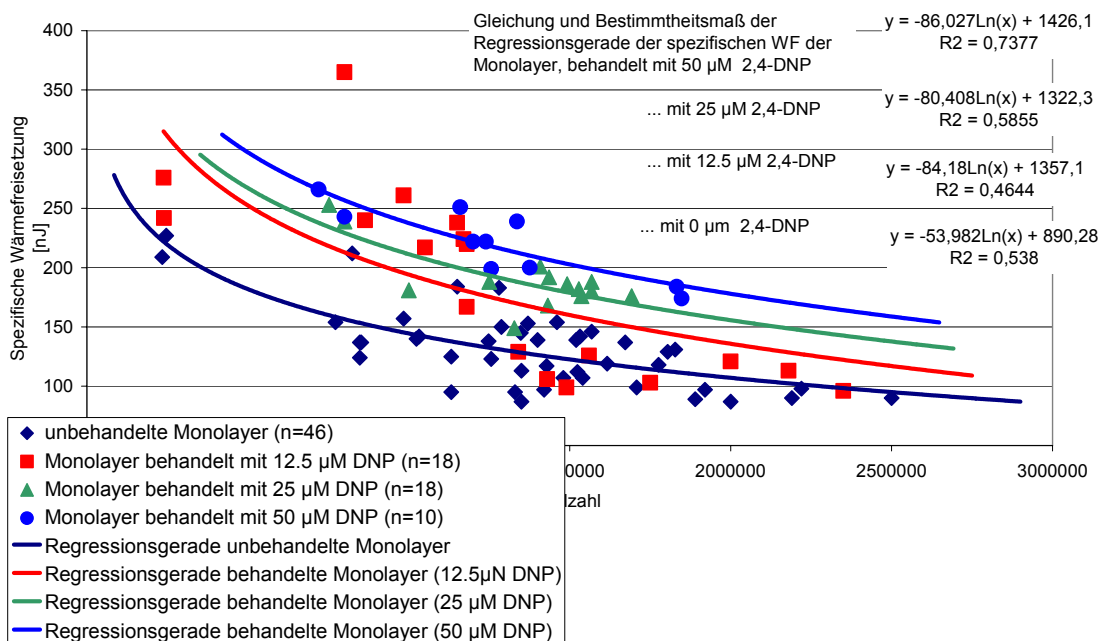


Abbildung 30a: Regressionsanalyse der mikrokolorimetrischen Analyse der pA1 Monolayer, behandelt mit 0, 12.5, 25 und 50 µM 2,4-DNP. Zeitintervall 20. Minute – 3. Stunde.

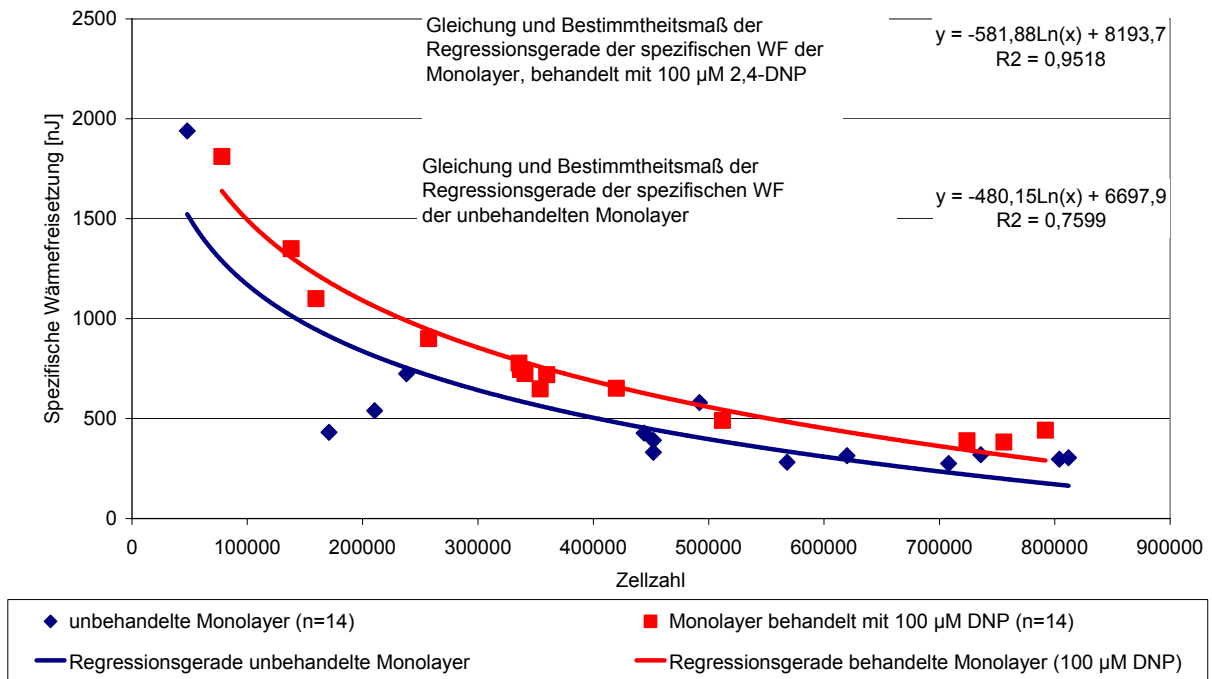


Abbildung 30b: Regressionsanalyse der mikrokolorimetrischen Analyse der pA1 Monolayer, behandelt 0 und 100 µM 2,4-DNP. Zeitintervall 20. Minute – 3. Stunde. Die Regressionsanalyse der 100 µM 2,4-DNP Versuche wurde gesondert durchgeführt, da die hier verwendeten Zellen aus einer anderen Charge stammten.

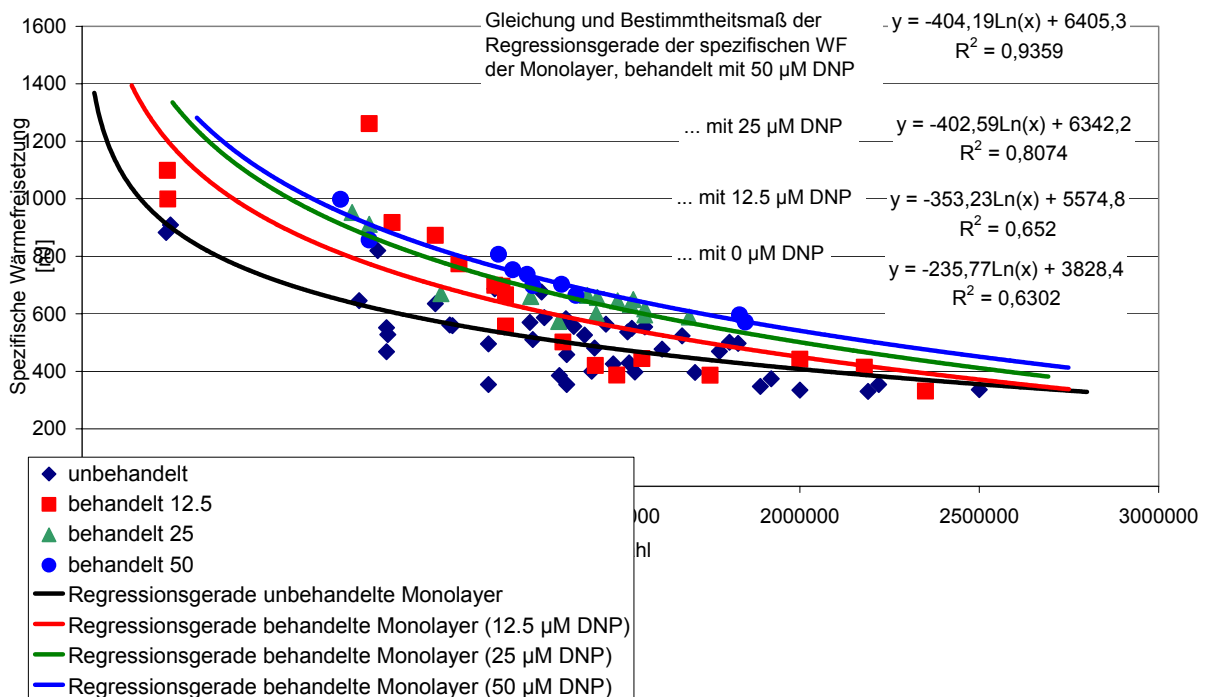


Abbildung 31: Regressionsanalyse der mikrokolorimetrischen Analyse der pA1 Monolayer, behandelt mit 0, 12,5, 25 und 50 µM 2,4-DNP. Zeitintervall 20. Minute – 9. Stunde

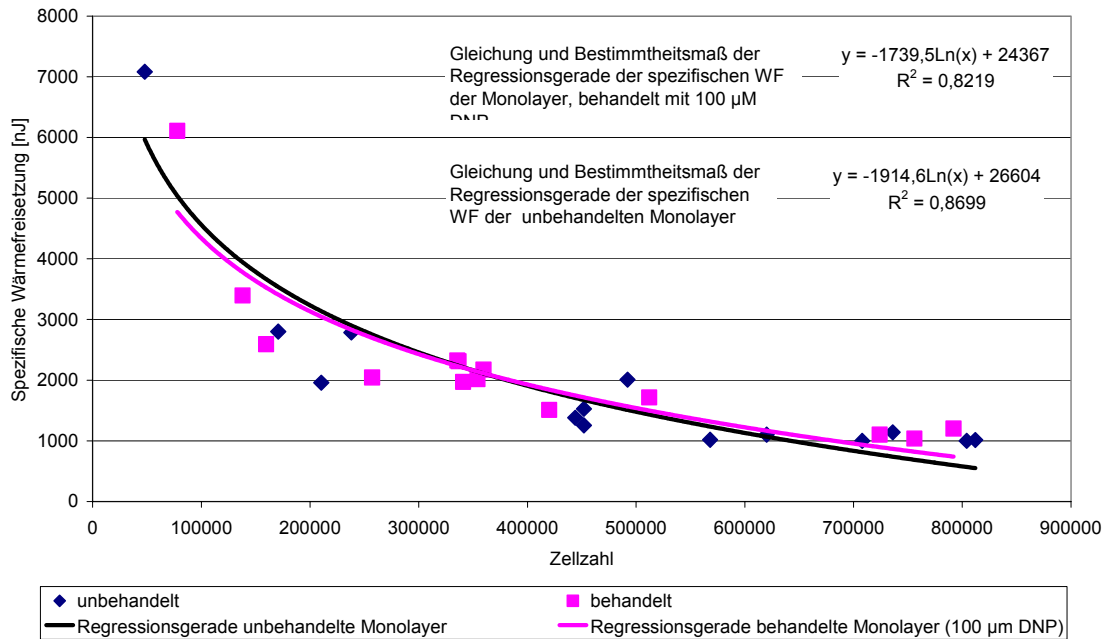


Abbildung 31b: Regressionsanalyse der mikrokolorimetrischen Analyse der pA1 Monolayer, behandelt mit 0 und 100 μM 2,4-DNP. Zeitintervall 20. Minute – 9. Stunde. Die Regressionsanalyse der 100 μM 2,4-DNP Versuche wurde gesondert durchgeführt, da die hier verwendeten Zellen aus einer anderen Charge stammten.

10.4.4. Diskussion

Wie aus den Ergebnistabellen abzulesen ist, ergaben die Regressionsanalysen keine verlässlichen Schätzungen der Regressionsgeraden. Insbesondere die Analysen für das Zeitintervall 20. Minute - 3. Stunde der Versuchsreihen 12.5 μM , 25 μM und 50 μM 2,4-DNP zeichneten sich durch besonders schlechte Schätzungen aus. Dies könnte entweder darauf zurückzuführen sein, dass die Annahme einer konstanten Plättchendichte zwischen der dritten und neunten Stunde falsch war, oder, dass der crowding-Effekt innerhalb der ersten Stunde keine besonders ausgeprägte Rolle spielt. Interessant im Zusammenhang mit letzterer Überlegung ist die Beobachtung, dass die für das Zeitintervall 20. Minute - 9. Stunde ermittelten Bestimmtheitsmaße als Maß der Verlässlichkeit der Schätzung mit zunehmender Dosisstufe und somit erhöhter Stoffwechselaktivität der Zellen zunehmen.

10.5. Ansatz IV: Analyse mittels hocheffizienter Testverfahren

10.5.1. Methodische Überlegung

Die bisherigen Ansätze, die Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen im Sinne der Fragestellung auszuwerten, waren ohne Erfolg, auch wenn durch die ersten Datenanalysen zwei Störfaktoren identifiziert werden konnten.

Auch nach Elimination des Störfaktors ‚variierende Plättchendichte‘ schienen ‚einfache‘ statistische Analysen auf Grund der Komplexität des Datensatzes überfordert. Dies erforderte daher methodische Instrumente, die dem multivariaten Charakter und dem Umfang der Daten gerecht wurden.

Da die Daten aus vielen unterschiedlichen Parametern bestehen (vier Zelllinien, getestet unter fünf verschiedenen 2,4-DNP-Konzentrationen über einen Zeitraum von neun Stunden) wurden im folgenden Ansatz die Daten mit zwei hocheffizienten Verfahren der modernen Biometrie analysiert, die im folgenden kurz vorgestellt werden sollen:

- Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als skalunenabhängiges Relevanzmaß für Gruppenunterschiede und
- Das multivariate Verfahren nach Wei und Lachin (generalisierter Wilcoxon-Test) mit seiner äußerst trennscharfen und verteilungsfreien Testung multipler Kriterien.

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert gibt Relevanzmaße für sämtliche Datentypen mit dem Vorteil an, vollständig skalunenabhängig und verteilungsfrei zu sein. Damit stellt dieses Verfahren gegenwärtig das universellste Werkzeug zur Darstellung von Gruppenunterschieden dar. Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert wird mit dem Vertrauensbereich zur Sicherheitswahrscheinlichkeit von 95% angegeben und kann Werte annehmen von 0 bis 1, die nach einem bestimmten Schema bewertet werden (siehe Kapitel 8.4). So kann schließlich ermittelt werden, ob beispielsweise die paarweise verglichenen Gruppen äquivalent sind oder ob eine Gruppe eine relevante Unter- oder Überlegenheit aufweist.

Mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert arbeitet auch das verteilungsfreie, skalunenabhängige, datentypunabhängige und gleichzeitig trennscharfe Verfahren nach Wei und Lachin. Als Ergebnis des Wei-Lachin-Tests erhält man neben dem p-Wert als Relevanzmaß den oben beschriebenen Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Effektgrößenmaß, sowie den zugehörigen Vertrauensbereich. Die Ergebnisse werden jeweils für die Einzelkriterien, aber auch für die gepoolten Kriterien geliefert.

In die Analysen floss grundsätzlich der ermittelte Wärmefluss ein, da dieser besser Auskunft als die vom Wärmefluss abgeleitete Wärmeproduktion gibt. Um die variierenden Plättchendichten zu berücksichtigen wurden jeweils der Wärmefluss pro 100000 Zellen analysiert.

In einem ersten Schritt wurde für jede der vier untersuchten Zelllinien der Einfluss verschiedener Dosierungen von 2,4-DNP auf den Wärmefluss (je 100000 Zellen) gegenüber der Nulldosis (= unbehandelte Zellen) untersucht (siehe Kapitel 10.5.3). Verglichen wurde jeweils der Wärmefluss zu jeder vollen Stunde sowie im gesamten Messzeitraum. Auf diese Weise war es möglich, eine eventuelle Dynamik der Wirkung von 2,4-DNP zu erfassen. Diese Untersuchung erlaubt somit eine Aussage, inwiefern eine bestimmte Dosierungsstufe den Wärmefluss einer Zelllinie spezifisch beeinflusst.

Um zu untersuchen, wie eine bestimmte Dosierungsstufe sich auf unterschiedliche Zelllinien auswirkt, mussten bei der Analyse die für die unterschiedlichen Zelllinien jeweils verschiedenen nativen Wärmeflüsse berücksichtigt werden. Entsprechend wurde in einem zweiten Schritt daher ein Nulldosis-normierter Vergleich der Zelllinien für die vier Dosierungsstufen durchgeführt (siehe Kapitel 10.5.4).

10.5.2. Methodik

Kriterien zur Erstellung der Datenmatrix

Die Daten wurden zuerst mit dem Ziel gesichtet, nicht verwertbare Versuche aus dem Datensatz zu eliminieren, um damit einen eventuell störenden Einfluss dieser auf die Auswertung von vornherein zu vermeiden. Als nicht verwertbar galten ausschließlich Versuche, die

- einen Wärmefluss < 5 Mikrowatt aufzeigten
- biologisch nicht erklärbare Schwankungen des Wärmeflusses aufzeigten
- auf Grund eines Systemabsturzes des Datenaufzeichnungsrechners nicht zu Ende geführt werden konnten (Messzeit < 9 Stunden)
- für die im Anschluss an die Messung keine Zellzahl ermittelt wurde
- keine Messzeit von 9 Stunden aufwiesen.

Einen Überblick über die verwendete Daten gibt die folgende Abbildung.

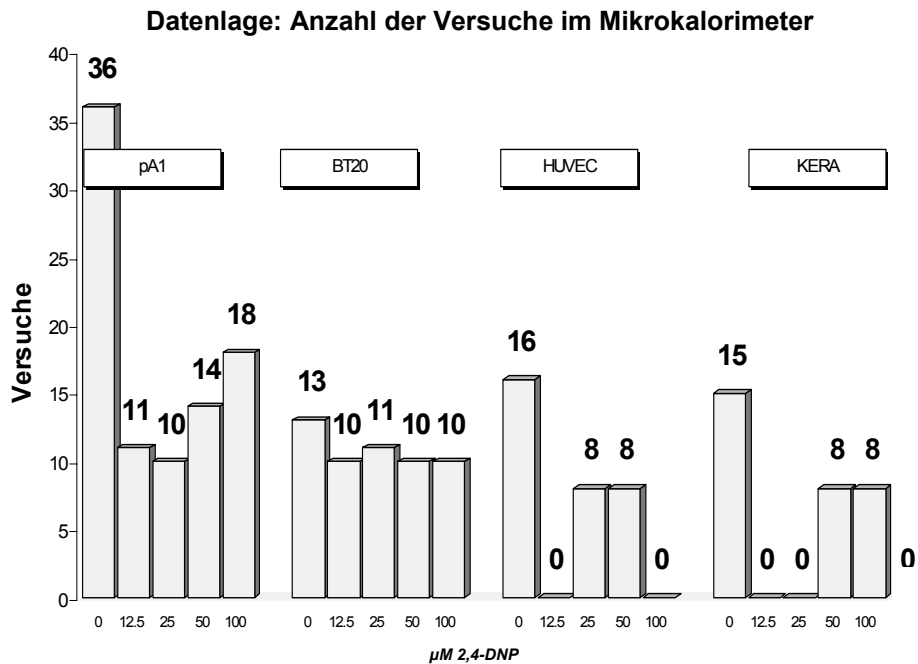


Abbildung 32: Ansatz IV zu Grunde liegende Versuche

PA1: Teratokarzinomzellen
 BT20: Mamma-Karzinom Zellen
 HUVEC: Nabelschnurendothelzellen
 KERA: Keratinozyten

Datenbasis und Datenverarbeitung

Insgesamt wurden die Daten von n=206 Versuchen statistisch ausgewertet.

Die statistischen Berechnungen wurden mittels SPSS 11.0 sowie alternativ mittels SAS Version 8 durchgeführt.

10.5.3. Analyse der zellinienspezifischen Wärmeflusseffekte von fünf Dosierungsstufen

In folgenden wurde für jede der vier untersuchten Zelllinien der zellzahlbereinigte Wärmefluss (μ Watt pro 100000 Zellen) in Abhängigkeit der vier unterschiedlichen Dosierungen von 2,4-DNP untersucht. Auf diese Weise war eine Aussage möglich, inwiefern eine bestimmte Dosierungsstufe den Wärmefluss einer Zelllinie spezifisch beeinflusst.

Angegeben sind jeweils die Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwerte sowie das Ergebnis der multivariate Befund des Verfahrens nach Wei und Lachin.

10.5.3.1. Analyse der Wärmeflusseffekte von 2,4-DNP auf pA1

Ergebnisse

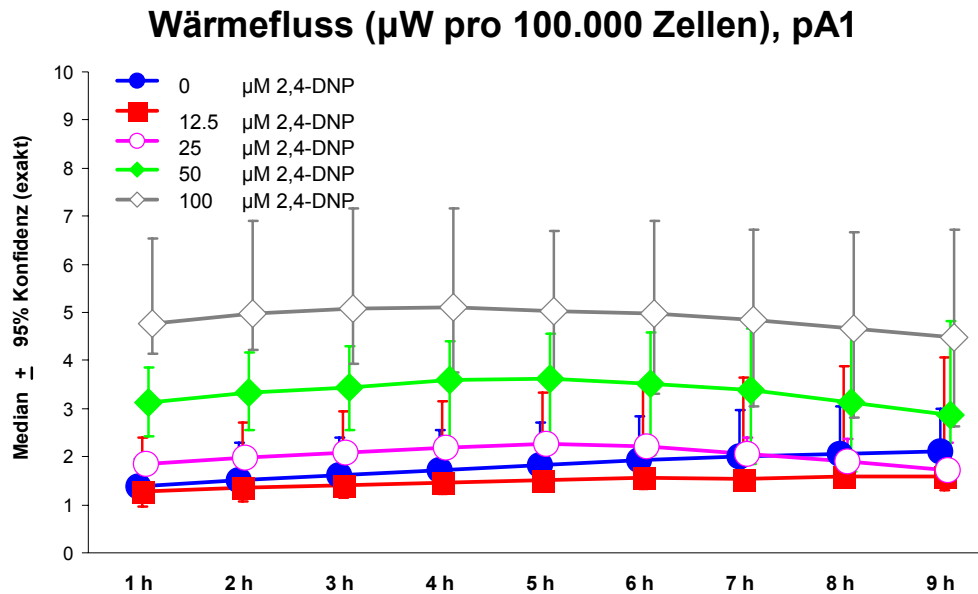


Abbildung 33: Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Analyse der pA1-Zelllinie unter 2,4-DNP. Angegeben sind jeweils die Medianwerte des Wärmeflusses (inklusive der exakten 95%-Konfidenzgrenzen) aller Versuche mit pA1 unter den angegebenen 2,4-DNP-Dosisstufen.

Ein erster Blick auf den Wärmefluss (siehe Abbildung 33) und eine statistische Wertung der Befunde mit Kontrastkoeffizienten (sogenannten Mann-Whitney-Koeffizienten) (siehe nachfolgende Abbildung 34) zeigte für die 12.5 μM 2,4-DNP Dosis keine signifikante generelle Abweichung von der Äquivalenzlinie im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen an ($p=0.165$ n.s., generalisierter Wilcoxon-Test). Schlussfolgernd kann somit festgehalten werden, dass die Dosis 12.5 μM 2,4-DNP weder lokal noch generell mit einem statistisch signifikant veränderten Wärmefluss einhergeht.

Auch die Dosis 25 μM 2,4-DNP zeigte keine statistisch signifikant höheren Wärmewerte, denn die Kontrastkoeffizienten und deren Konfidenzbereich verlassen die Äquivalenzlinie nicht (siehe Abbildung 35). Ein multivariater Test zeigt, dass diese Dosis der Nulldosis (=unbehandelte Zellen) auch generell nicht überlegen ist ($p=0.129$ n.s.).

pA1: 12.5 μ M vs. 0 μ M 2,4-DNP

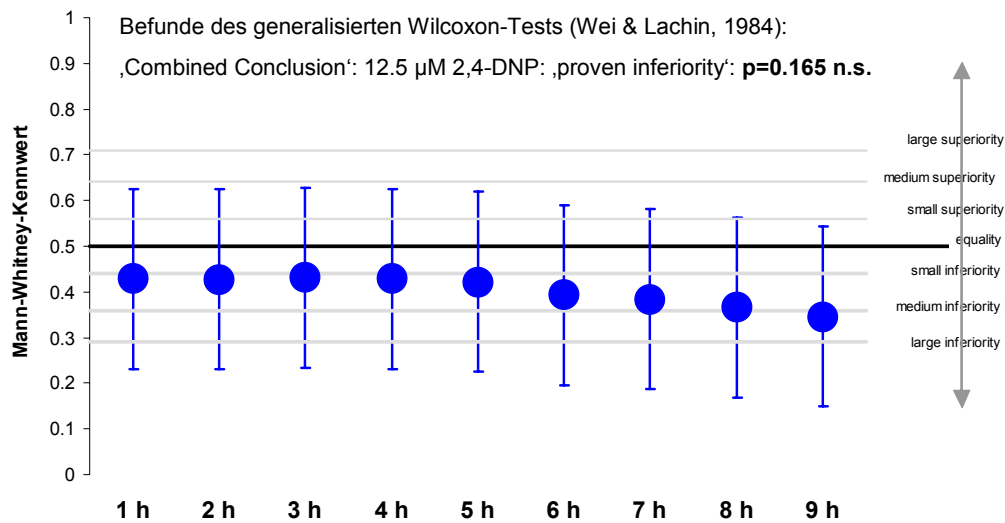


Abbildung 34

pA1: 25 μ M vs. 0 μ M 2,4-DNP

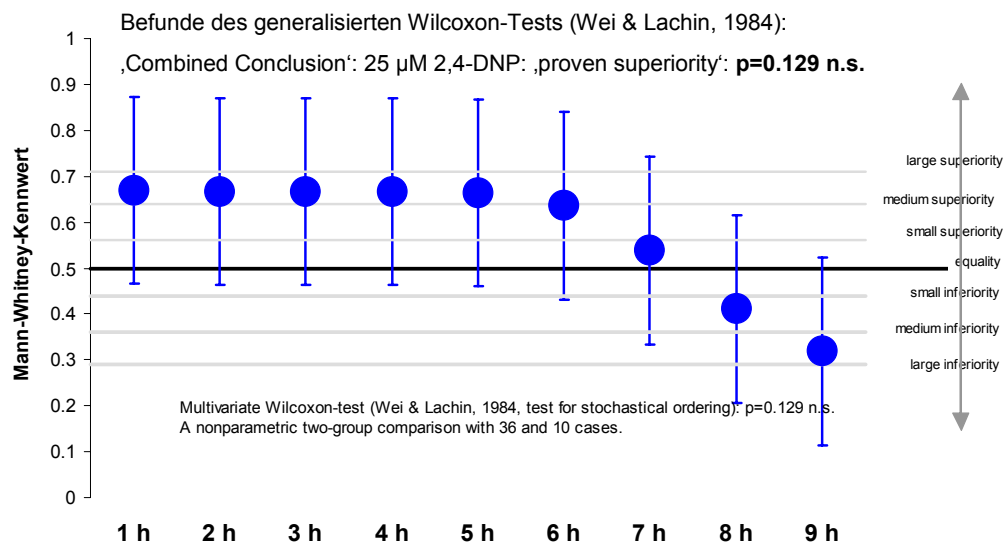


Abbildung 35

Abbildung 34 und 35: Analyse der Wirkung von 2,4-DNP auf den Wärmefluss:

Abbildung 34: 12.5 μ M vs. 0 μ M 2,4-DNP (pA1) ; Abbildung 35: 25 μ M vs. 0 μ M 2,4-DNP (pA1)

1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.

2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Die 50 μM Dosis zeigt hingegen statistisch gesehen Überlegenheit ($p=0.001$ **, generalisierter Wilcoxon-Test) über die Nulldosis, denn die meisten Kontrastkoeffizienten inklusive deren Konfidenzbereich in der nachfolgenden Abbildung liegen über der Äquivalenzlinie von 0.5. Wie in der Abbildung erkennbar, liegen die Kontrastkoeffizienten deutlich oberhalb der Äquivalenzlinie mit leicht abfallender Tendenz.

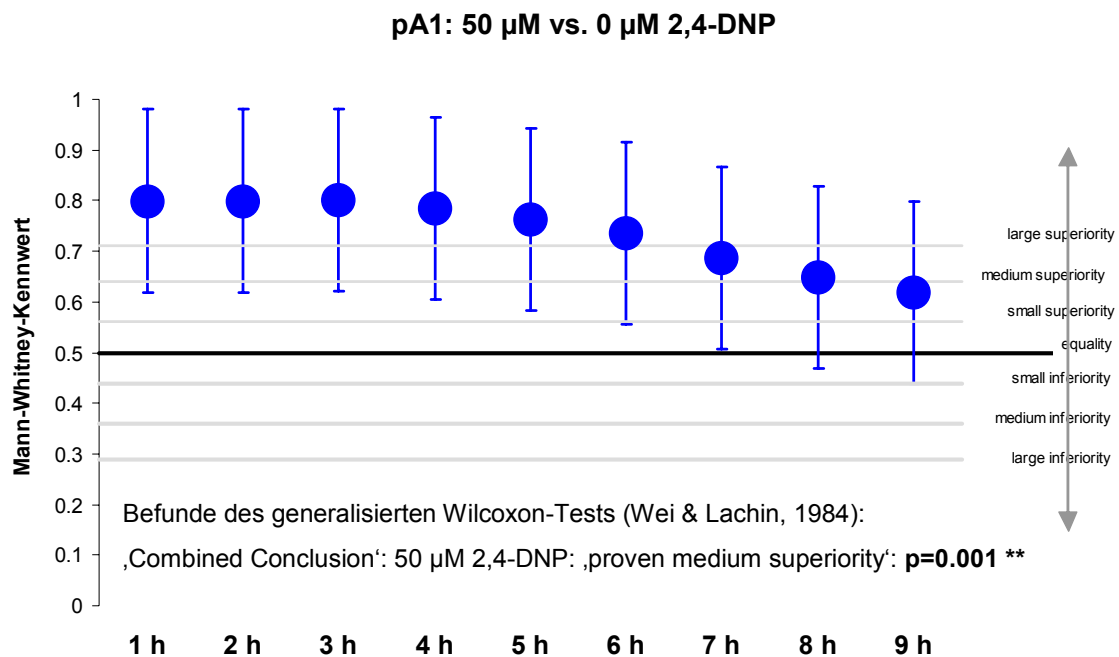


Abbildung 36: Analyse der Wirkung von 2,4-DNP auf den Wärmefluss: 50 μM vs. 0 μM (pA1)

1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.

2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Auch die 100 μM Dosis zeigt statistisch gesehen eine generelle Überlegenheit über die Nulldosis, denn - wie in Abbildung 37 zu sehen - liegen sämtliche Kontrastkoeffizienten inklusive deren Konfidenz oberhalb der Äquivalenzlinie. Generell kann somit behauptet werden, dass bei dieser Dosis ein signifikanter Anstieg der Wärmeproduktion gegenüber den unbehandelten Zellen vorliegt. ($p<0.001$ ***, generalisierter Wilcoxon-Test) ist. Auch hier liegen die Kontrastkoeffizienten deutlich oberhalb der Äquivalenzlinie mit leicht abfallender Tendenz.

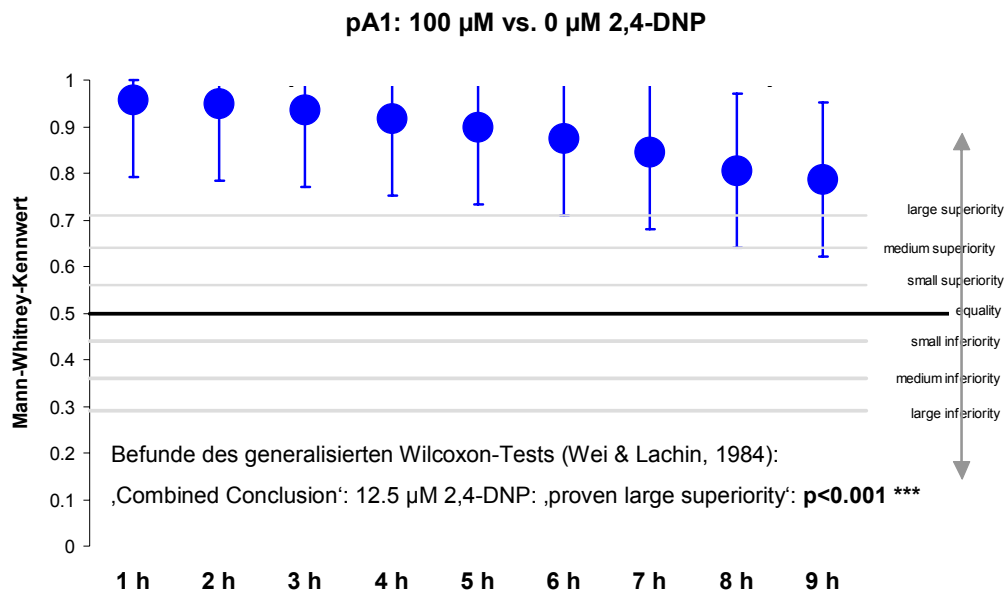


Abbildung 37: Analyse der Wirkung von 2,4-DNP auf den Wärmefluss: 100 μ M vs. 0 μ M (pA1)

- 1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.
- 2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Diskussion der Analyse der pA1 – Versuchsreihen

Zusammenfassung der Ergebnisse des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin:

Dosisstufe 2,4-DNP	Relevanz des generellen Unterschiedes gegenüber der Nulldosis	explorative Signifikanz
12.5 μ M	(proven inferiority)	n.s.
25 μ M	(proven superiority)	n.s.
50 μM	proven medium superiority	p=0.001 **
100 μM	proven large superiority	p<0.001 ***

Für die Versuchsreihen mit den pA1-Zellen ergab die statistische Analyse der Dosisstufen 50 und 100 μ M DNP eine generelle signifikante Erhöhung des Wärmeflusses gegenüber der Nulldosis, da die Kontrastkoeffizienten dieser Versuchsreihen deutlich oberhalb der Äquivalenzlinie liegen. Betrachtet man jeweils den Verlauf der Kontrastkoeffizienten, fällt auf, dass diese eine leicht abfallende Tendenz gegen Ende der Versuchsdauer zeigen. Dies könnte durch die auszehrende Wirkung des 2,4-DNP bedingt sein: Mit der Zeit werden von den behandelten Zellen entsprechend mehr Substrate verbraucht und somit

wird das Medium zum limitierenden Faktor: der Stoffwechsel wird herunterreguliert und/oder ein Teil der Zellen stirbt. Diese Überlegung wird von folgender Beobachtung unterstützt: Betrachtet man von dieser Versuchsreihe die Wärmeflüsse in Abhängigkeit der Zeit, so fällt auf, dass der Wärmefluß der behandelten Zellen sein Maximum vor der 9. Stunde erreicht, und zwar umso eher, je höher die Zellzahl und je höher die jeweilige 2,4-DNP Konzentration ist. Nach Erreichen des Maximums fällt der Wärmefluß grundsätzlich unter den der Referenzmessung, wobei der Referenzwärmefluß noch weiter ansteigt. Der generalisierte Wilcoxon-Test zeigt zudem, dass die Dosierung 100 μM 2,4-DNP der 50 μM 2,4-DNP Dosierung überlegen ist („proven large vs. proven medium superiority“).

Für die Versuchsreihen mit 12.5 und 25 μM 2,4-DNP konnte kein explorativ signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dennoch ist interessant festzuhalten, dass sämtliche Kontrastkoeffizienten der Versuchsreihe 12.5 μM DNP unterhalb der Äquivalenzlinie liegen. Folglich scheint der Wärmefluss – auch wenn statistisch nicht signifikant – unter geringer DNP- Konzentration niedriger zu sein. Die Datenanalyse der Versuchsreihe mit 25 μM DNP zeigte vor allem in den ersten 6 Stunden deutlich über der Äquivalenzlinie liegende Kontrastkoeffizienten. Wie in der Abbildung jedoch zu erkennen ist, schneiden die Konfidenzintervalle die Äquivalenzlinie, folglich ist der Befund nicht signifikant. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass in diesem Falle die Äquivalenzlinie nur knapp geschnitten wird und die fehlende Signifikanz bei einer Fallzahl von $n=10$ entsprechend durch eine zu niedrige Fallzahl bedingt sein könnte.

10.5.3.2. Analyse der Wärmeflusseffekte von 2,4-DNP auf BT20

Ergebnisse

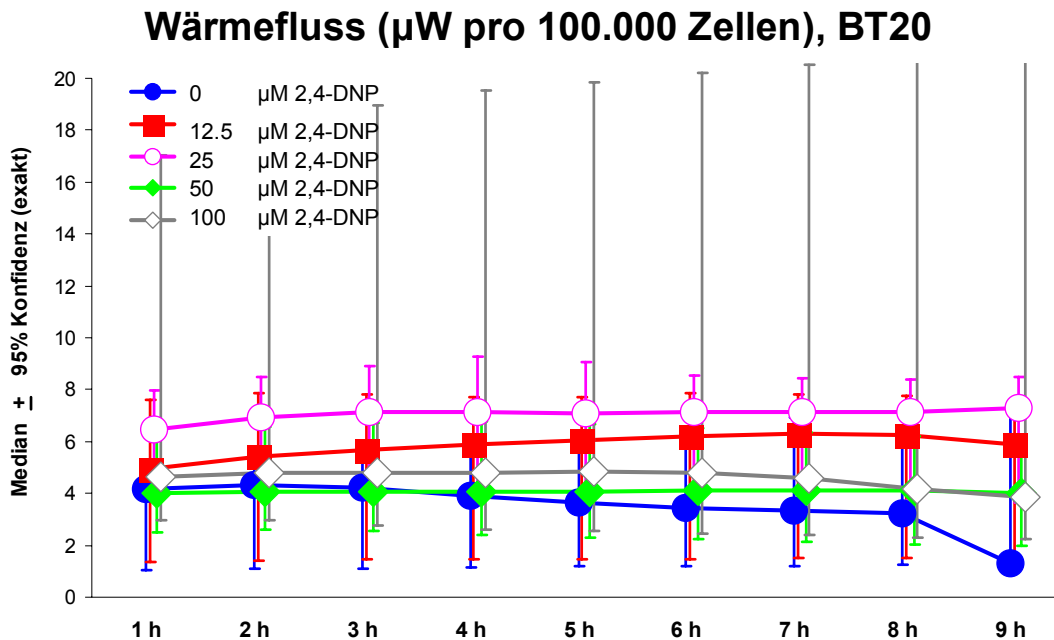


Abbildung 38: Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Analyse der BT20-Zelllinie unter 2,4-DNP. Angegeben sind jeweils die Medianwerte des Wärmeflusses (inklusive der exakten 95%-Konfidenzgrenzen) aller Versuche mit BT20 unter den angegebenen 2,4-DNP-Dosisstufen.

Eine bewertende statistische Betrachtung des Wärmeflusses unter BT20 zeigt eine generelle Überlegenheit der 12,5 μM Dosis, wie ein multivariater generalisierter Wilcoxon-Test zeigt ($p=0.035^*$). Im Einzelbefund (siehe Abbildung 39) fällt hingegen kein spezifischer Messzeitpunkt durch erhöhte Werte auf (alle Konfidenzen schneiden die Äquivalenzlinie). Obwohl der Effekt sich somit nicht einem Messzeitpunkt zuschreiben lässt, konnte dennoch gezeigt werden, dass die 12,5 μM Dosierung der Nulldosis überlegen ist.

Die Dosis 25 μM DNP zeigt für BT20-Zellen eine generelle Wärmeflusserhöhung, wie der multivariate Test belegt ($p=0.004^{**}$, generalisierter Wilcoxon-Test). Zudem kann der Effekt auch jeweils den einzelnen Messzeitpunkten zugeschrieben werden. Schlussfolgernd konnte für die Dosis 25 μM DNP eine generelle Erhöhung des Wärmeflusses identifiziert werden. Ein Blick auf den Verlauf der Kontrastkoeffizienten lässt erkennen, dass auch mit dieser Konzentration eine gleichbleibende Erhöhung des Wärmeflusses über das betrachtete Zeitintervall erzielt werden kann.

BT20: 12.5 μM vs. 0 μM 2,4-DNP

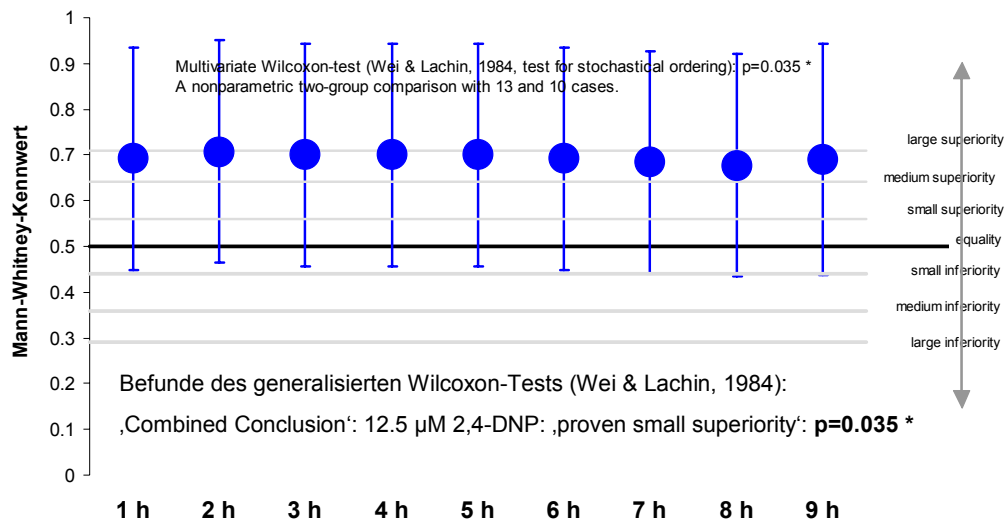


Abbildung 39

BT20: 25 μM vs. 0 μM 2,4-DNP

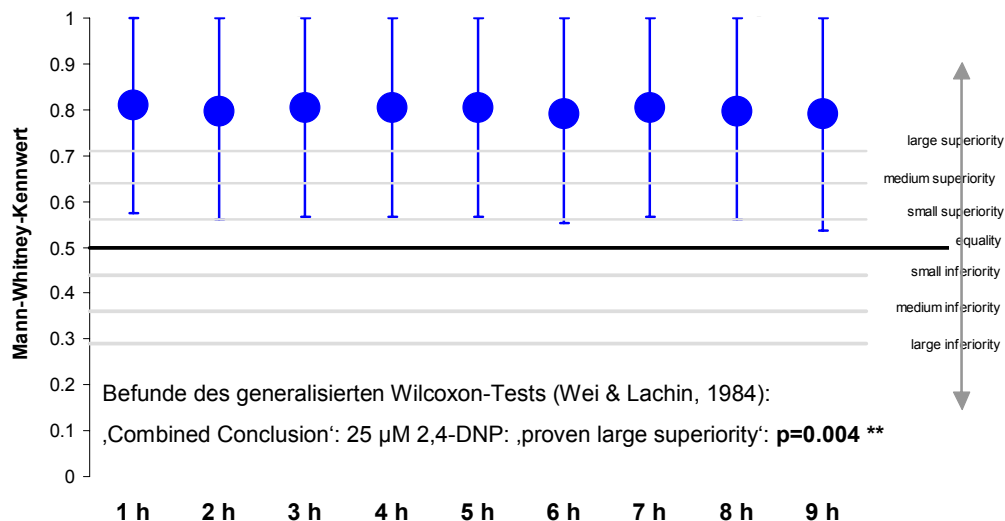


Abbildung 40

Abbildung 39 und 40: Analyse der Wirkung von 2,4-DNP auf den Wärmefluss:

Abbildung 39: 12.5 μM vs. 0 μM 2,4-DNP (BT20) ; Abbildung 40: 25 μM vs. 0 μM 2,4-DNP (BT20)

1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.

2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Die Dosis 50 μM DNP zeigt keine signifikante generelle oder lokale Erhöhung des Wärmeflusses ($p=0.122$ n.s., generalisierter Wilcoxon-Test), da die Konfidenzbereiche die Äquivalenzlinie schneiden.

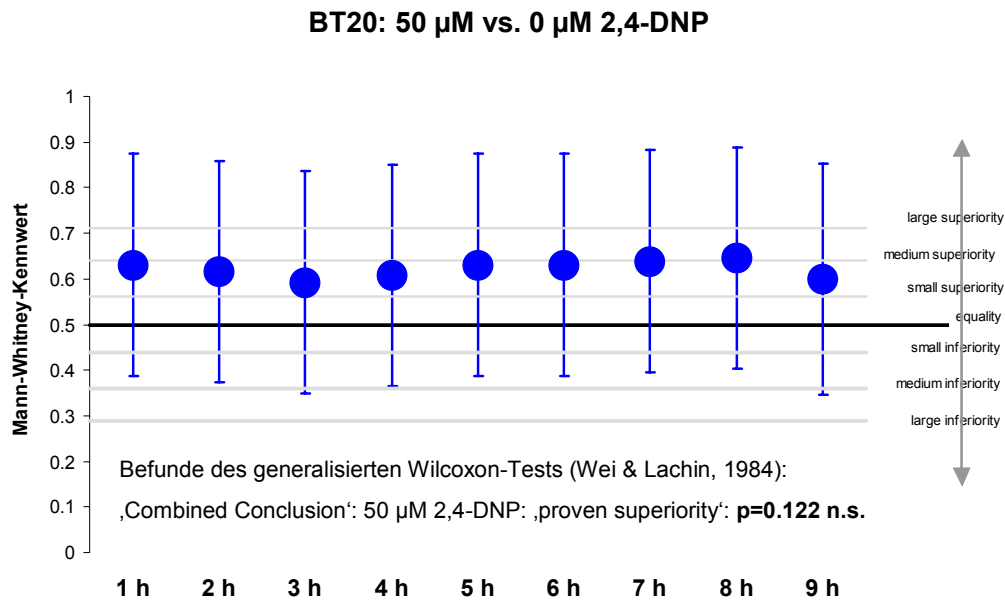


Abbildung 41 Analyse der Wirkung von 2,4-DNP auf den Wärmefluss: 50 μM vs. 0 μM (BT20)

1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.

2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Die bewertende statistische Betrachtung des Wärmeflusses dieser Versuchsreihe zeigt eine generelle Überlegenheit der 100 μM Dosis, wie ein multivariater generalisierter Wilcoxon-Test zeigt ($p=0.023^*$). Im Einzelbefund (siehe Abbildung 42) fällt hingegen, ähnlich wie in der Analyse der Versuchsreihe mit 12,5 μM DNP, kein spezifischer Messzeitpunkt durch erhöhte Werte auf (alle Konfidenzen schneiden die Äquivalenzlinie). Schlussfolgernd lässt sich der generell ermittelte Effekt aufgrund der breiten Konfidenzintervalle nicht einem Messzeitpunkt zuschreiben.

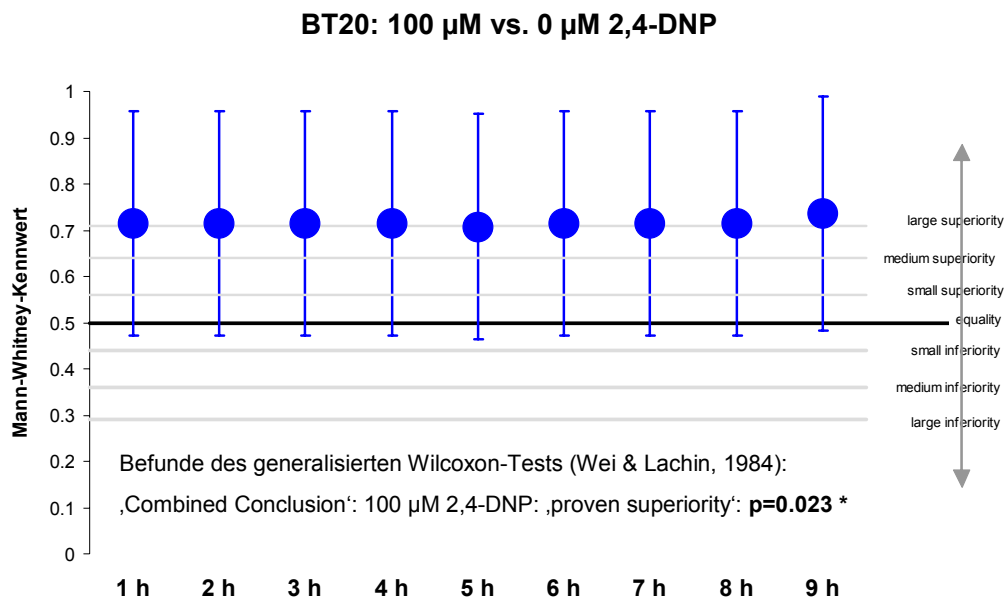


Abbildung 42: Analyse der Wirkung von 2,4-DNP auf den Wärmefluss: 100 µM vs. 0 µM (BT20)

- 1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.
- 2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Diskussion der Analyse der BT20 – Versuchsreihen

Zusammenfassung der Ergebnisse des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin:

Dosisstufe 2,4-DNP	Relevanz des generellen Unterschiedes gegenüber der Nulldosis	explorative Signifikanz
12.5 µM	proven small superiority	p=0.035 *
25 µM	proven large superiority	p=0.004 **
50 µM	(proven superiority)	n.s.
100 µM	proven small superiority	p=0.023 *

Die Dosierungen 12.5 µM (proven small superiority) und 25 µM 2,4-DNP (proven large superiority) zeigten eine statistische Überlegenheit gegenüber der Nulldosis, ebenso die Dosierung 100 µM 2,4-DNP (proven small superiority), die hinsichtlich ihres Wirkpotentials eher mit der 12.5 µM als mit der 25 µM 2,4-DNP Dosierung zu vergleichen ist. Als Ursache hierfür wäre ein (gleich von Beginn an) zytotoxischer Effekt dieser Dosisstufe denkbar, der entsprechend die Zelldichte der Plättchen reduziert, indem bei einem bestimmten Anteil der Zellen die hohe Dosis unmittelbar zu Apoptose bzw. Nekrose führt. Damit würde sich der

Anteil der lebenden Zellen und somit die registrierte Wärmefreisetzung der verbleibenden wenigen (lebenden) Zellen reduzieren.

Interessant festzuhalten ist insbesondere im Vergleich zu den Versuchreihen mit der pA1 Zelllinie, dass für alle vier getesteten Dosierungen kein Abfall der Kontrastkoeffizienten gegen Ende der Versuchszeit zu beobachten ist, obwohl die BT20 Monolayer höhere Plättchendichten aufwiesen. Folglich ist somit nicht von einer Substratlimitierung auszugehen und damit steht ein geringeres Ansprechen der BT20 Zelllinien auf 2,4-DNP zur Diskussion.

Rätselhaft scheint die Auswertung der Versuchsreihe mit 50 μM DNP: für diese Dosierung konnten weder ein genereller noch lokale Effekte beschrieben werden. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der 100 μM 2,4-DNP Versuchsreihe ist daher zu diskutieren, ob die auffallend breiten Konfidenzintervalle dieser Versuchsreihe nicht hierfür ursächlich sind und somit dem statistisch zwar signifikanten Ergebnis der Analyse mit 100 μM 2,4-DNP bei einer Interpretation im Kontext der Arbeit zu folgen ist.

10.5.3.3. Analyse der Wärmeflusseffekte von 2,4-DNP auf HUVEC

Ergebnisse

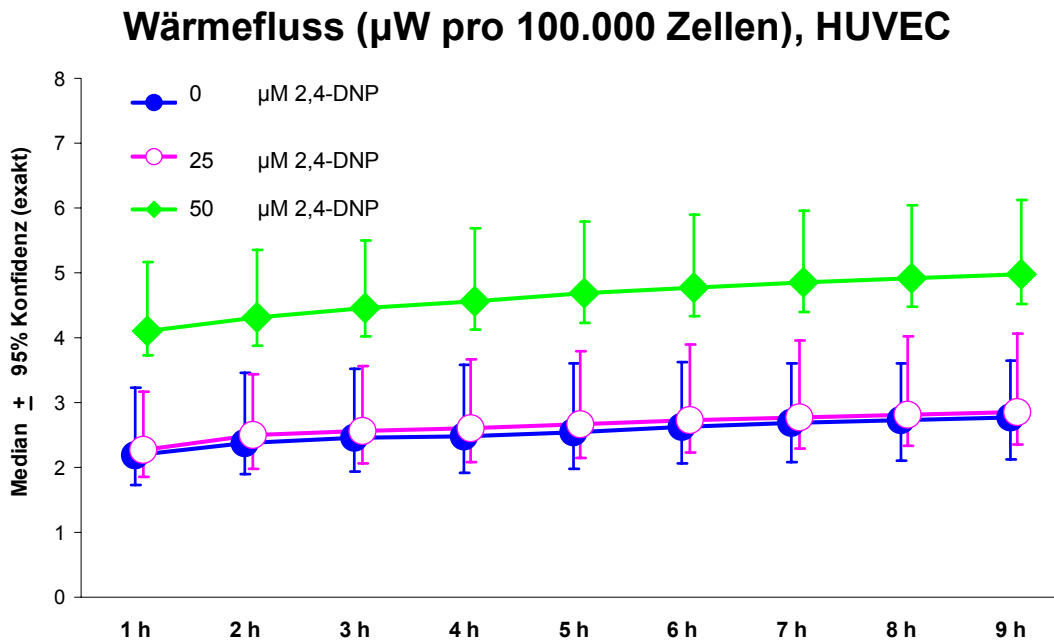


Abbildung 43: Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Analyse der HUVEC-Zelllinie unter 2,4-DNP. Angegeben sind jeweils die Medianwerte des Wärmeflusses (inklusive der exakten 95%-Konfidenzgrenzen) aller Versuche mit HUVEC unter den angegebenen 2,4-DNP-Dosisstufen.

25 μM 2,4-DNP im Medium führen bei HUVEC-Zellen noch nicht zu einer Steigerung des Wärmeflusses, weder generell ($p=0.420$ n.s., generalisierter Wilcoxontest) noch zu speziellen Messzeitpunkten, was dadurch begründet ist, dass die Kontrastkoeffizienten in Abbildung 44 die Äquivalenzlinie von 0.5 schneiden, so dass die Äquivalenz nicht verworfen werden kann. Schlussfolgernd zeigt diese Dosierungsstufe keine signifikanten Effekte.

Allerdings sind 50 μM 2,4-DNP signifikant in der Lage, wärmesteigernd auf HUVEC zu wirken ($p<0.001$ ***, generalisierter Wilcoxontest). Alle in Abbildung 45 aufgezeigten Kontrastkoeffizienten liegen inklusive ihres Konfidenzintervalles deutlich von der Äquivalenzlinie entfernt. Schlussfolgernd bewirkt die 50 μM 2,4-DNP Dosis eine signifikante und generelle, zu allen Messzeitpunkten gleichmäßig ausgeprägte Wärmesteigerung.

HUVEC: 25 μM vs. 0 μM 2,4-DNP

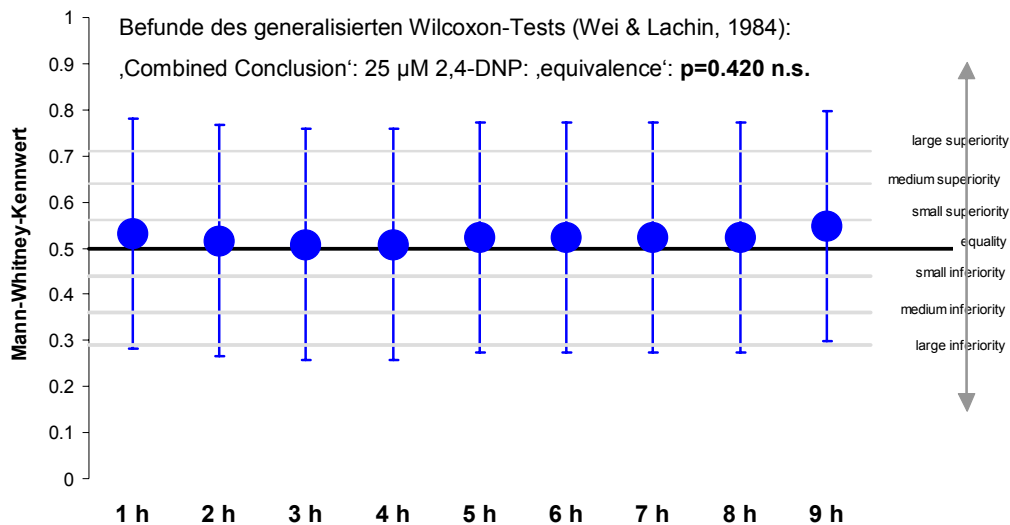


Abbildung 44

HUVEC: 50 μM vs. 0 μM 2,4-DNP

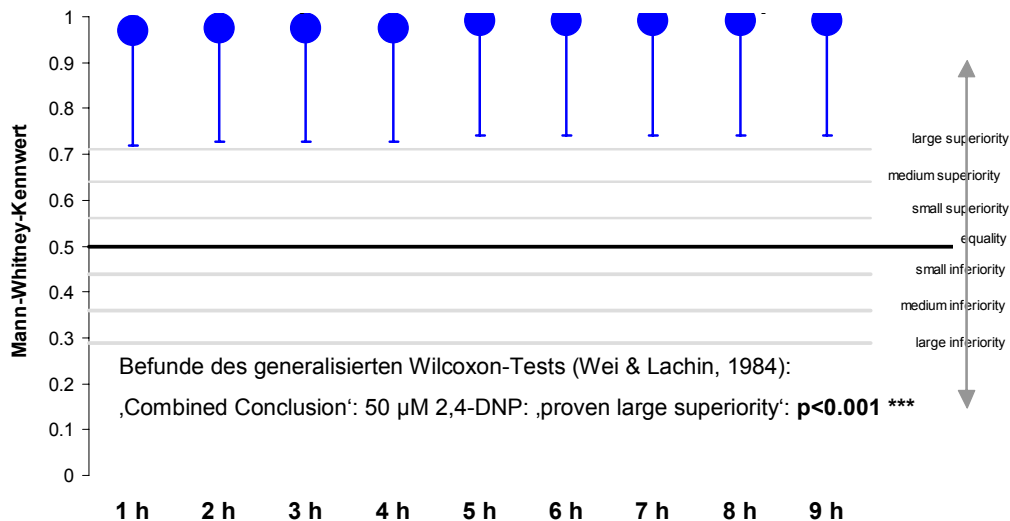


Abbildung 45

Abbildung 44 und 45: Analyse der Wirkung von 2,4-DNP auf den Wärmefluss:
 Abbildung 44: 25 μM vs. 0 μM 2,4-DNP (HUVEC); Abbildung 45: 50 μM vs. 0 μM 2,4-DNP (HUVEC)
 1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.
 2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Diskussion der Analyse der HUVEC – Versuchsreihen

Zusammenfassung der Ergebnisse des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin:

Dosisstufe 2,4-DNP	Relevanz des generellen Unterschiedes gegenüber der Nulldosis	explorative Signifikanz
25 μ M	(equivalence)	n.s.
50 μM	proven large superiority	p<0.001 ***

Wie Abbildung 44 eindrücklich demonstriert, zeigt die Dosierungsstufe 25 μ M 2,4-DNP keine Effekte auf den Wärmefluss, wohl aber die Dosierungsstufe 50 μ M 2,4-DNP, die sogar eine hohe Überlegenheit über den gesamten Messzeitraum aufweist. Auch in den HUVEC Versuchsreihen ist kein Abfall der Kontrastkoeffizienten gegen Ende des Messzeitraums zu beobachten. Folglich ist auch hier nicht von einer Substratlimitierung von 2,4-DNP auszugehen.

10.5.3.4. Analyse der Wärmeflusseffekte von 2,4-DNP auf KERA

Ergebnisse

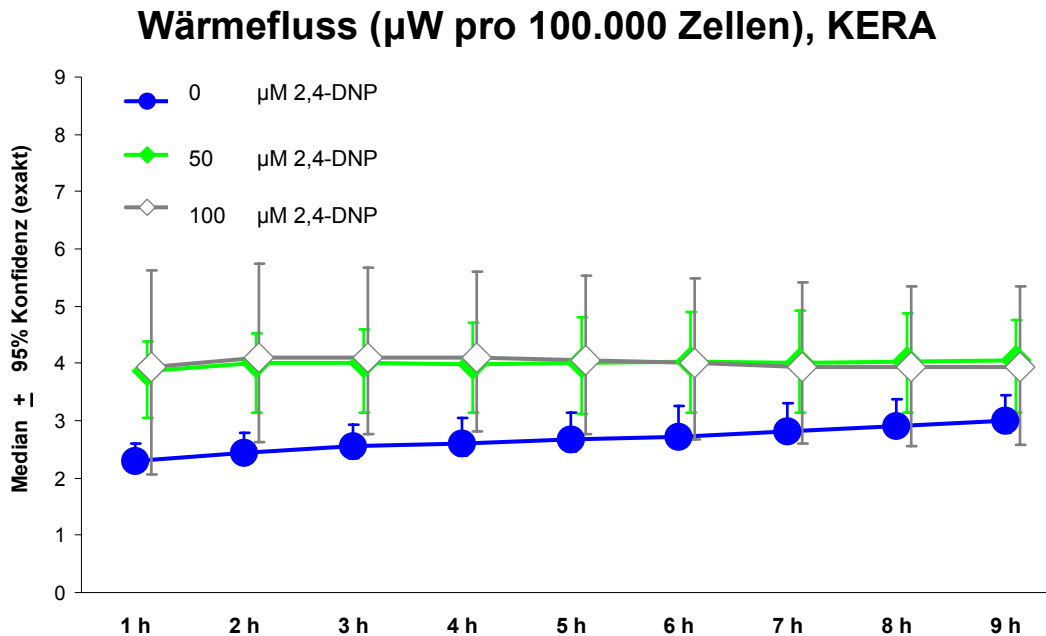


Abbildung 46: Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Analyse der KERA-Zelllinie unter 2,4-DNP. Angegeben sind jeweils die Medianwerte des Wärmeflusses (inklusive der exakten 95%-Konfidenzgrenzen) aller Versuche mit KERA unter den angegebenen 2,4-DNP-Dosisstufen.

Die Dosis 50 μM 2,4-DNP ist – statistisch gesehen – signifikant in der Lage, wärmesteigernd auf Keratinozyten zu wirken ($p < 0.001$ ***, generalisierter Wilcoxon-Test) und alle in Abbildung 47 aufgezeigten Kontrastkoeffizienten liegen inklusive ihres Konfidenzintervalles deutlich von der Äquivalenzlinie entfernt. Dies führt zur Schlussfolgerung, dass die 50 μM 2,4-DNP Dosis eine signifikante generelle und lokale, zu allen Messzeitpunkten nahezu gleichmäßig ausgeprägte Wärmesteigerung bewirkt.

Auch die 100 μM 2,4-DNP geht mit einer signifikanten generellen Wärmesteigerung in den Keratinozyten-Kulturen einher ($p = 0.001$ **, generalisierter Wilcoxon-Test), die sich ab der 6. Stunde jedoch abschwächt, denn die Konfidenzbereiche driften näher an die Äquivalenzlinie von 0.5 heran.

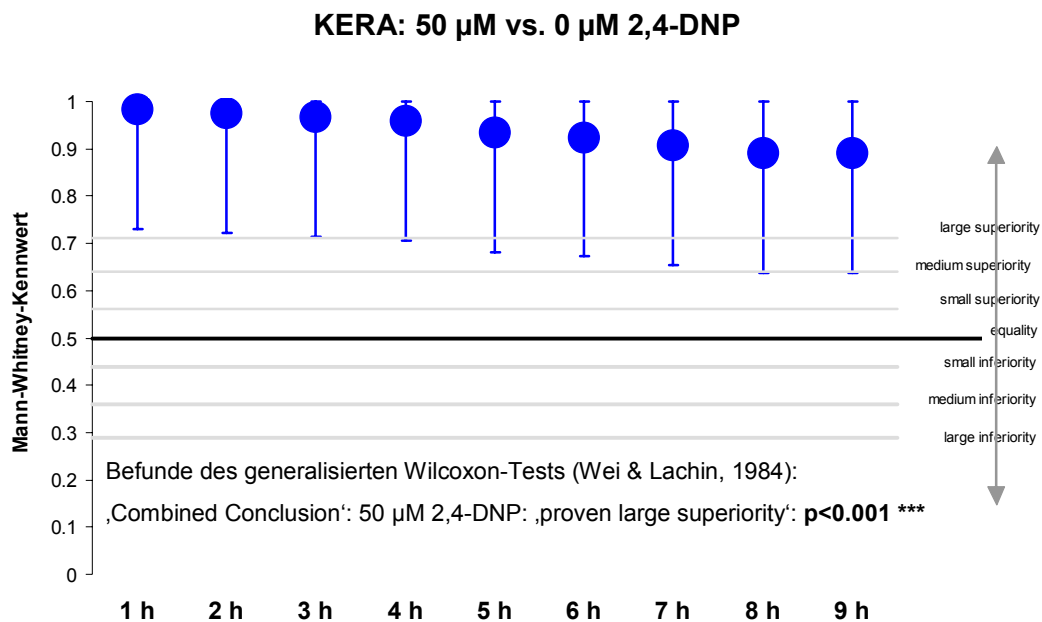


Abbildung 47

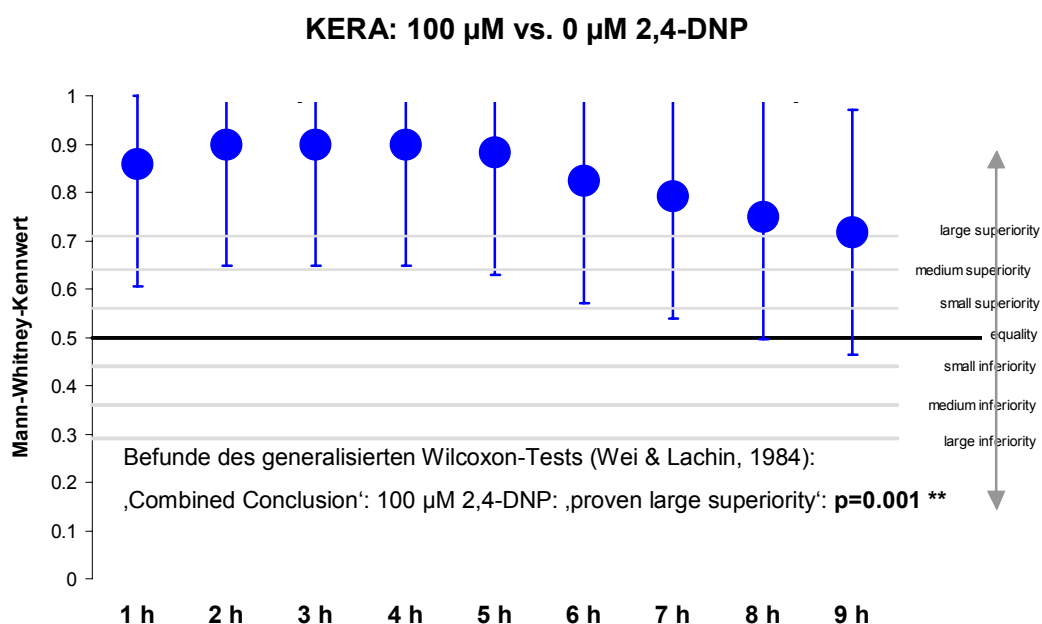


Abbildung 48

Abbildung 47 und 48: Analyse der Wirkung von 2,4-DNP auf den Wärmefluss:

Abbildung 47: 50 μ M vs. 0 μ M 2,4-DNP (KERA); Abbildung 48: 100 μ M vs. 0 μ M 2,4-DNP (KERA)

1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.

2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Diskussion der Analyse der KERA – Versuchsreihen

Zusammenfassung der Ergebnisse des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin:

Dosisstufe 2,4-DNP	Relevanz des generellen Unterschiedes gegenüber der Nulldosis	explorative Signifikanz
50 µM	proven large superiority	p<0.001 ***
100 µM	proven large superiority	p<0.001 ***

Beide Dosierungsstufen zeigen eine hohe Überlegenheit gegenüber der Nulldosis (proven large superiority), wobei der Effekt der 100 µM 2,4-DNP Dosis im Verlauf der Messung jedoch abschwächt, was auf eine Zytotoxizität der höheren Dosierung oder eine Substratlimitierung zurückzuführen sein könnte.

10.5.3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse (Kapitel 10.5.3)

Dosisstufe 2,4-DNP	pA1	BT20	HUVEC	KERA
12.5 µM	k.s.U.	small superiority	---	---
25 µM	k.s.U.	large superiority	k.s.U.	---
50 µM	medium superiority	k.s.U.	large superiority	large superiority
100 µM	large superiority	small superiority	---	large superiority

Legende: k.s.U. = kein (genereller) signifikanter Unterschied des Wärmeflusses unter der angegebenen Dosisstufe im Vergleich zur Nulldosis
 --- = hierfür wurden keine Versuchsreihen durchgeführt
 xx superiority = bezogen auf den generellen Befund; Signifikanz nachgewiesen

Die obenstehende Übersicht fasst die Ergebnisse der zelllinienspezifischen Befunde für die jeweiligen getesteten Dosisstufen zusammen. Ein direkter Vergleich unter den verschiedenen Zelllinien ist nicht statthaft, da diese jeweils unterschiedliche Plättchendichten aufweisen. Folglich ist für einen Vergleich der Wärmeflusseffekte einer bestimmten Dosisstufe eine Nulldosis-Normierung erforderlich, wie im nachfolgenden Kapitel ausgeführt.

10.5.4. Nulldosis-normierter Vergleich der Zelllinien hinsichtlich der 4 getesteten Dosisstufen 2,4-DNP

In folgenden sollte untersucht werden, wie eine bestimmte Dosierungsstufe sich auf unterschiedliche Zelllinien auswirkt. Da jede Zelllinie ihren spezifischen nativen Wärmefluss aufweist, wurden die Berechnungen mit Abweichungswerten vom Medianwert der Null-Dosis der jeweiligen Zelllinie durchgeführt.

10.5.4.1. Analyse der Dosisstufe 12.5 µM 2,4-DNP

Ergebnisse

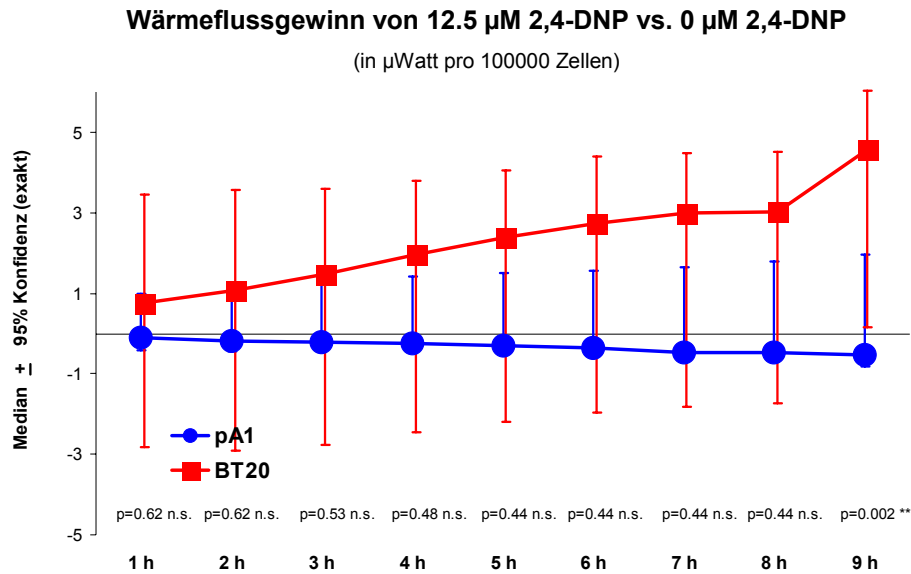


Abbildung 49: Nulldosis-normierter Vergleich der Zelllinien unter 12.5 µM 2,4-DNP
Angabe sind jeweils die Medianwerte des Wärmeflussgewinns von pA1 und BT20 (inklusive der exakten 95%-Konfidenzgrenzen) unter 12.5 µM 2,4-DNP.

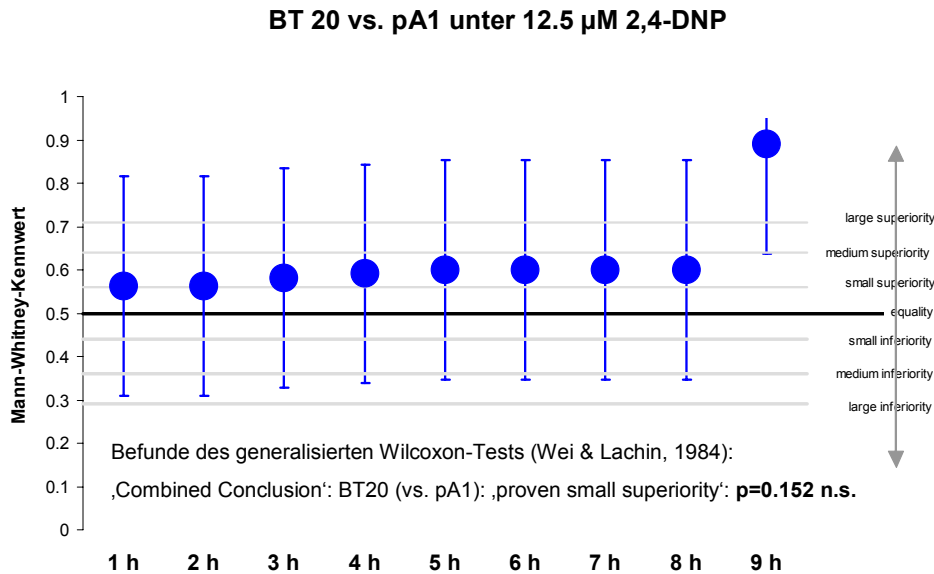


Abbildung 50: Analyse des Wärmeflussgewinns unter 12.5 µM 2,4-DNP von BT20 und pA1.

- 1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.
- 2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Der Vergleich unter 12,5 µM 2,4-DNP zeigt keinen signifikanten generellen Unterschied ($p=0.152$ n.s) der beiden untersuchten Zelllinien pA1 und BT20, denn fast alle Konfidenzintervalle schneiden die Äquivalenzlinie.

Diskussion der Analyse der Dosierungsstufe 12,5 µM 2,4-DNP

Ergebnisse der Analyse der zelllinienspezifischen Wärmeflusseffekte (aus Kapitel 10.5.3): Diese Dosierungsstufe erhöht bei BT20 im Vergleich zur Nulldosis den Wärmefluss signifikant. Nicht jedoch bei pA1.

Ergebnisse des Nulldosis-normierten Vergleichs der Dosisstufe 12.5 µM 2,4-DNP:

Dosisstufe 2,4-DNP	Zelllinie	Relevanz des generellen Unterschieds	explorative Signifikanz
12.5 µM	BT20 (vs. pA1)	(proven small superiority)	n.s.

Der Vergleich des Nulldosis-normierten Wärmeflussgewinns der beiden Zelllinien BT20 versus pA1 für die Dosierungsstufe 12,5 µM 2,4-DNP ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied, auch wenn in Abbildung 49 eine sehr ausgeprägte Wirkung auf BT20 im Vergleich zu pA1 zu sehen ist.

Auch wenn im vorherigen Kapitel die Analyse des Wärmeflusseffektes von 12,5 µM 2,4-DNP auf die BT20 Zelllinie einen im Gegensatz zur pA1 Zelllinie signifikanten generellen Unterschied gegenüber der Nulldosis ergab („proven small superiority“, $p=0.035$ *), konnte dieser im direkten Vergleich mit der pA1 Zelllinie nicht bestätigt werden. Dies könnte auf die nachgewiesene, nur geringe Überlegenheit dieser Dosierungsstufe gegenüber der Nulldosis zurückzuführen sein.

10.5.4.2. Analyse der Dosisstufe 25 µM 2,4-DNP

Ergebnisse

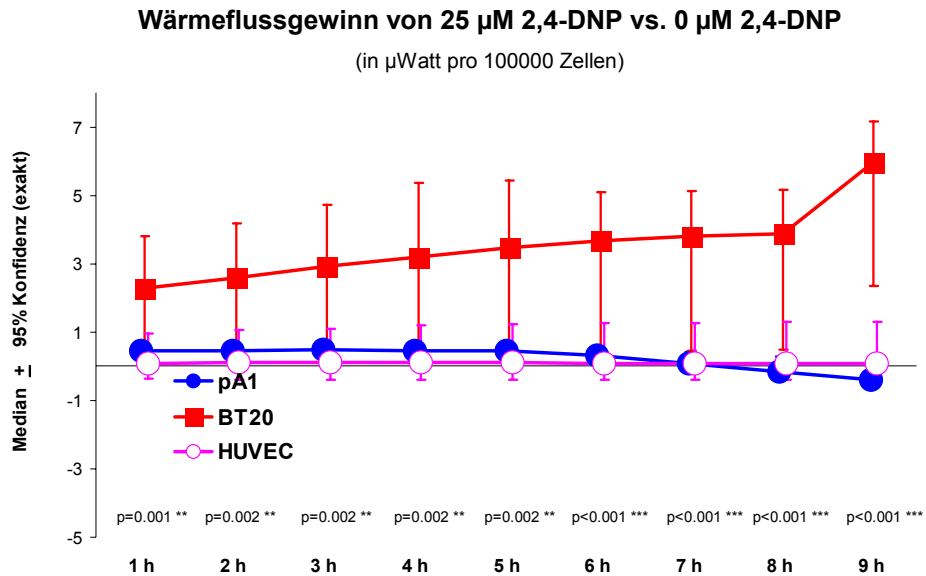


Abbildung 51: Nulldosis-normierter Vergleich der Zelllinien unter 25 µM 2,4-DNP

Angegeben sind jeweils die Medianwerte des Wärmeflussgewinns von pA1, BT20 und HUVEC (inklusive der exakten 95%-Konfidenzgrenzen) unter 25 µM 2,4-DNP.

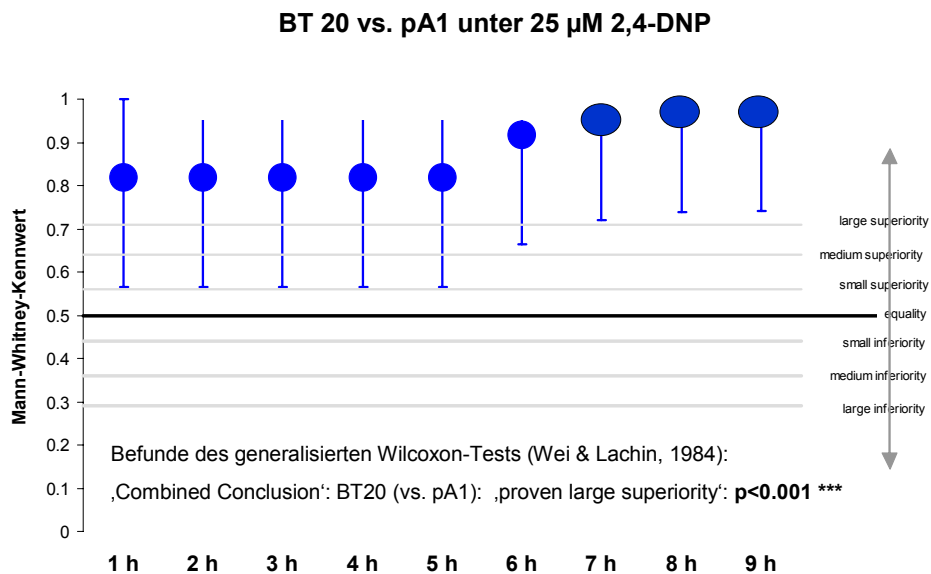


Abbildung 52: Analyse des Wärmeflussgewinns unter 25 µM 2,4-DNP von BT20 und pA1.

1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.

2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

HUVEC vs. pA1 unter 25 µM 2,4-DNP

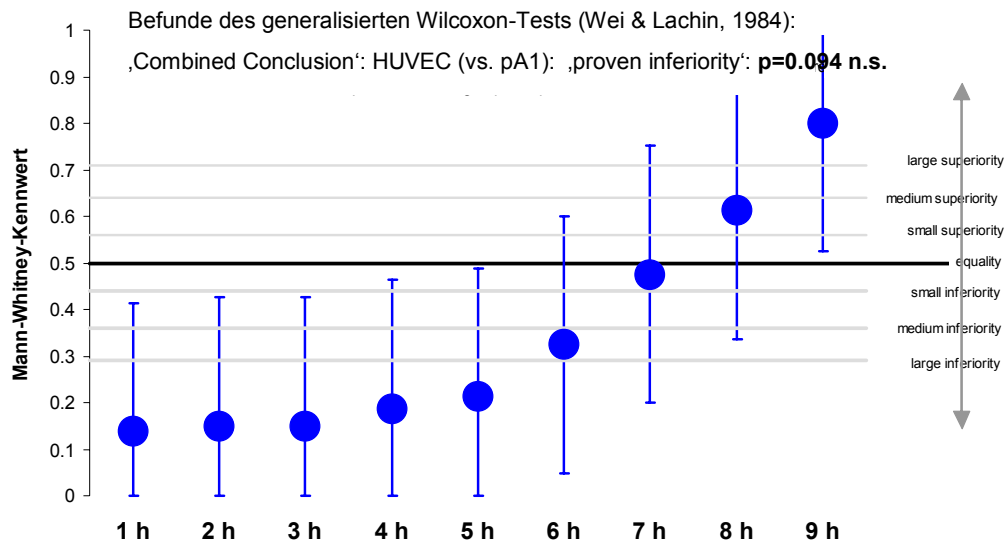


Abbildung 53

HUVEC vs. BT 20 unter 25 µM 2,4-DNP

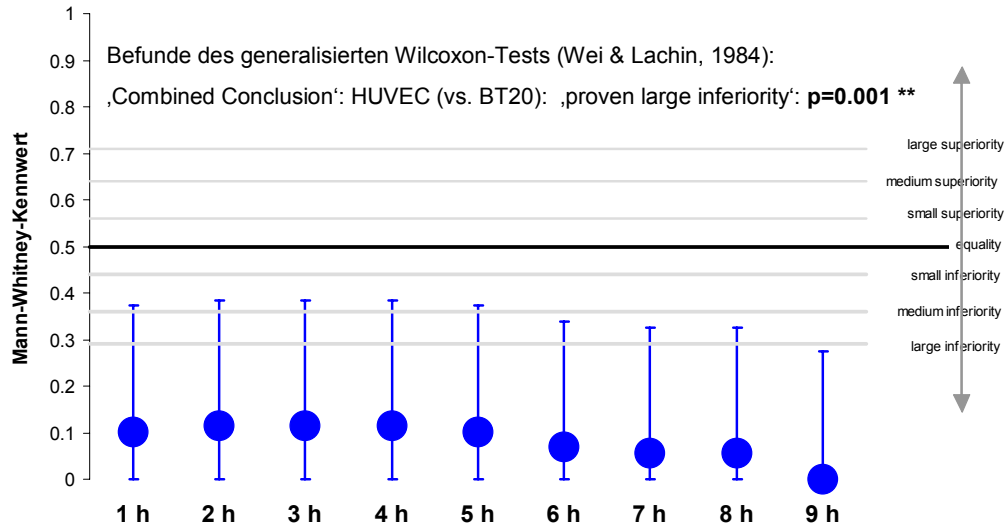


Abbildung 54

Abbildung 53 und 54: Analyse des Wärmeflussgewinns unter 25 µM 2,4-DNP von HUVEC und pA1 (Abbildung 53) sowie von HUVEC und BT20 (Abbildung 54).

1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.

2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Ein direkter Vergleich liefert generelle Unterschiede bedingt durch höhere Werte unter BT20. Keine generellen Unterschiede fanden sich zwischen HUVEC und pA1. Alle übrigen Unterschiede können als generell signifikant und lokalisierbar (d.h. zuordenbar zu Stundenwerten) bezeichnet werden (die Kontrastkoeffizienten und deren Konfidenz schneiden nicht die Äquivalenzlinie).

Diskussion der Analyse der Dosierungsstufe 25 µM 2,4-DNP

Ergebnisse der Analyse der zelllinienspezifischen Wärmeflusseffekte (aus Kapitel 10.5.3): Diese Dosierungsstufe erhöht nur bei BT20 im Vergleich zur Nulldosis den Wärmefluss signifikant. Nicht jedoch bei pA1 und HUVEC.

Ergebnisse des Nulldosis-normierten Vergleichs der Dosisstufe 25 µM 2,4-DNP:

Dosisstufe 2,4-DNP	Zelllinie	Relevanz des generellen Unterschieds	explorative Signifikanz
25 µM	BT20 (vs. pA1)	proven large superiority	p<0.001 ***
25 µM	HUVEC (vs. BT20)	proven large inferiority	p=0.001 **
25 µM	HUVEC (vs. pA1)	(proven inferiority)	n.s.

Der Vergleich des Nulldosis-normierten Wärmeflussgewinns der beiden Zelllinien HUVEC versus pA1 für die Dosierungsstufe 25 µM 2,4-DNP ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Wie der Grafik zu entnehmen ist, liegt in den Stunden 1-5 der Wärmeflussgewinn von HUVEC signifikant unter dem von pA1. Die generell fehlende Signifikanz erklärt sich durch den in Abbildung 53 zu beobachtenden Effekt, dass in der Versuchsreihe mit 25 µM 2,4-DNP der Wärmefluss der pA1 Zelllinie ab der 5. Stunde abfällt, was als Folge von Mediumauszehrung diskutiert wurde. Des weiteren ergibt die Analyse, dass der Wärmeflussgewinn von BT20 im Vergleich sowohl zu pA1 als auch zu HUVEC unter einer 2,4-DNP Konzentration von 25 µM signifikant höher ausfällt, und zwar generell signifikant als auch lokalisierbar. Schlussfolgernd kann somit festgehalten werden, dass BT20 unter 25 µM 2,4-DNP deutlich mehr Wärme als pA1 und HUVEC produziert, die sich hinsichtlich eines Wärmeflussgewinns zumindest unter dieser 2,4-DNP Dosierungsstufe nicht unterscheiden. Für dieses Phänomen kommen zwei mögliche Ursachen in Frage: entweder reagieren BT20 sensibler auf 2,4-DNP und bedingen so eine höhere Wärmefreisetzung, oder, für pA1 und HUVEC ist diese Dosierungsstufe bereits zytotoxisch: Zellen sterben ab und so wird insgesamt weniger Wärme produziert. Im Kontext mit den Ergebnissen aus Kapitel 10.5.3 erscheint diese Überlegung jedoch als unwahrscheinlich, da in der zelllinienspezifischen Analyse gezeigt werden konnte, dass HUVEC und pA1 erst ab höheren Konzentrationen einen im Vergleich zur Nulldosis höheren Wärmefluss aufwiesen.

10.5.4.3. Analyse der Dosisstufe 50 µM 2,4-DNP

Ergebnisse

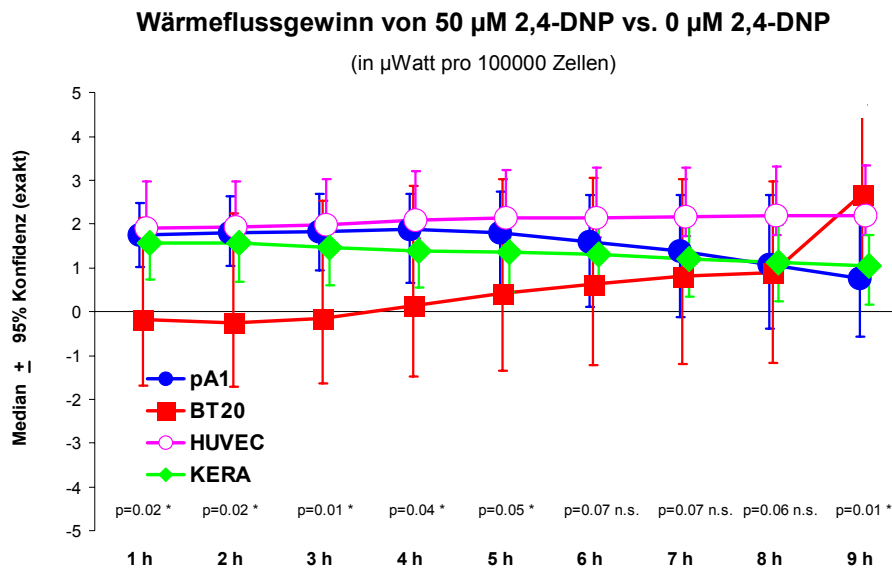


Abbildung 55: Nulldosis-normierter Vergleich der Zelllinien unter 50 µM 2,4-DNP

Angegeben sind jeweils die Medianwerte des Wärmeflussgewinns von pA1, BT20, KERA und HUVEC (inklusive der exakten 95%-Konfidenzgrenzen) unter 50 µM 2,4-DNP.

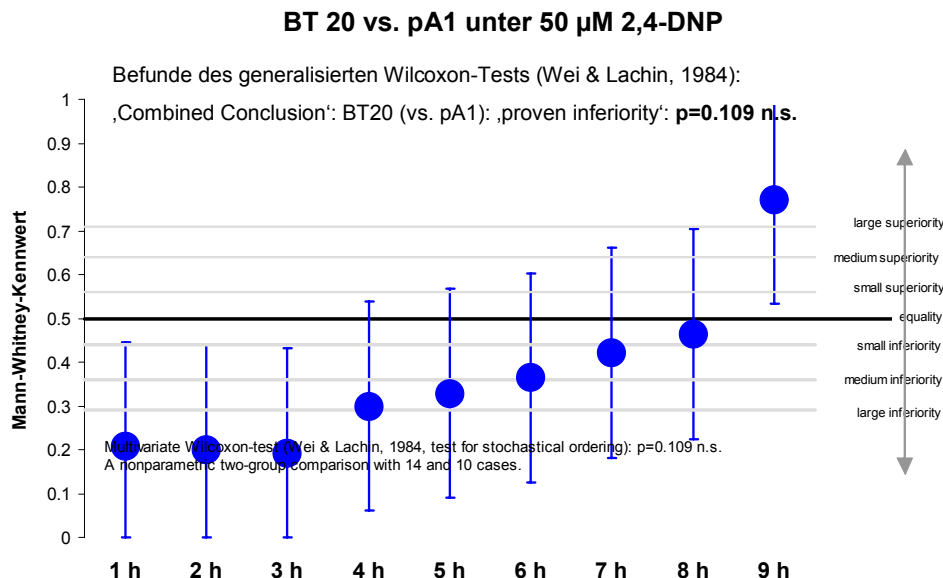


Abbildung 56: Analyse des Wärmeflussgewinns unter 50 µM 2,4-DNP von BT20 und pA1.

- 1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.
- 2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

HUVEC vs. pA1 unter 50 µM 2,4-DNP

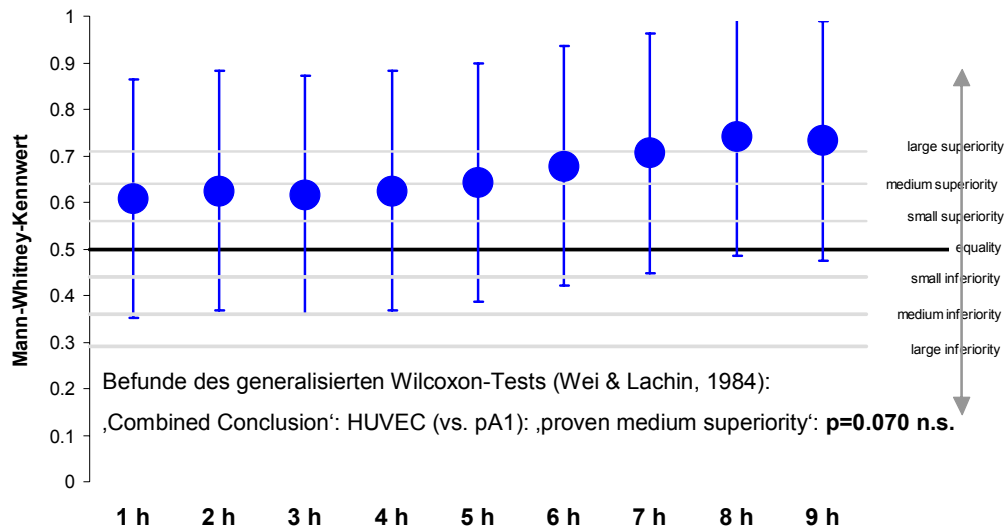


Abbildung 57

KERA vs. pA1 unter 50 µM 2,4-DNP

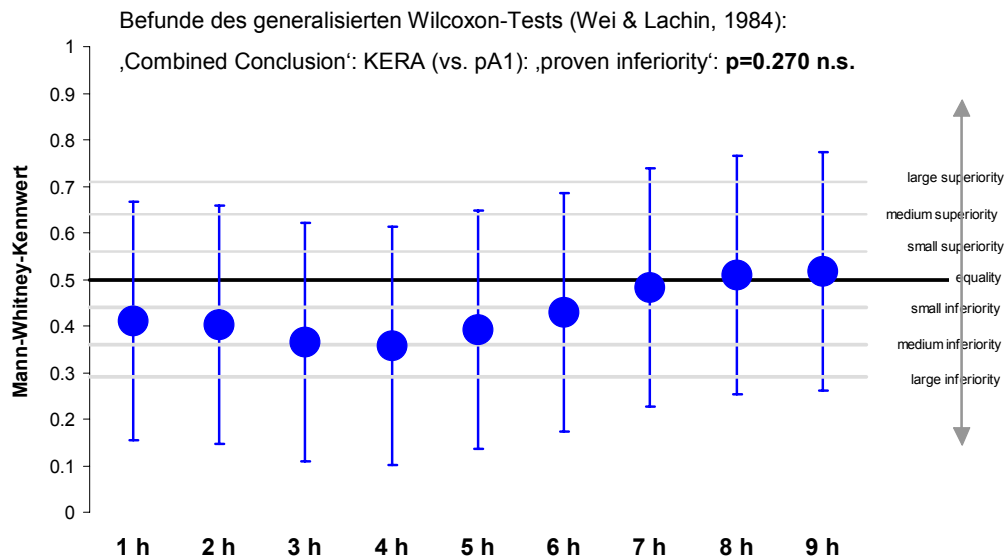


Abbildung 58

Abbildung 57 und 58: Analyse des Wärmeflussgewinns unter 50 µM 2,4-DNP von HUVEC und pA1 (Abbildung 57) sowie von KERA und pA1 (Abbildung 58).

1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.

2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

HUVEC vs. BT20 unter 50 µM 2,4-DNP

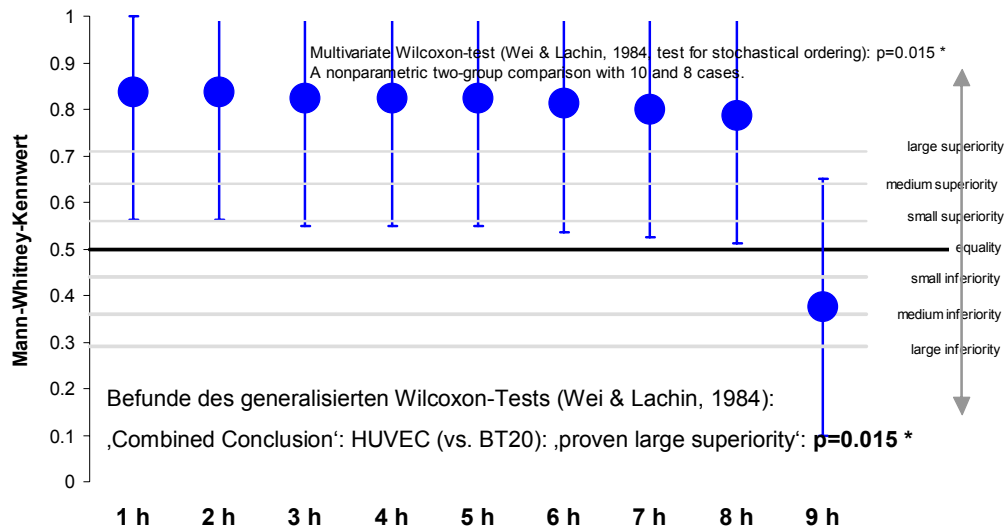


Abbildung 59

KERA vs. BT 20 unter 50 µM 2,4-DNP

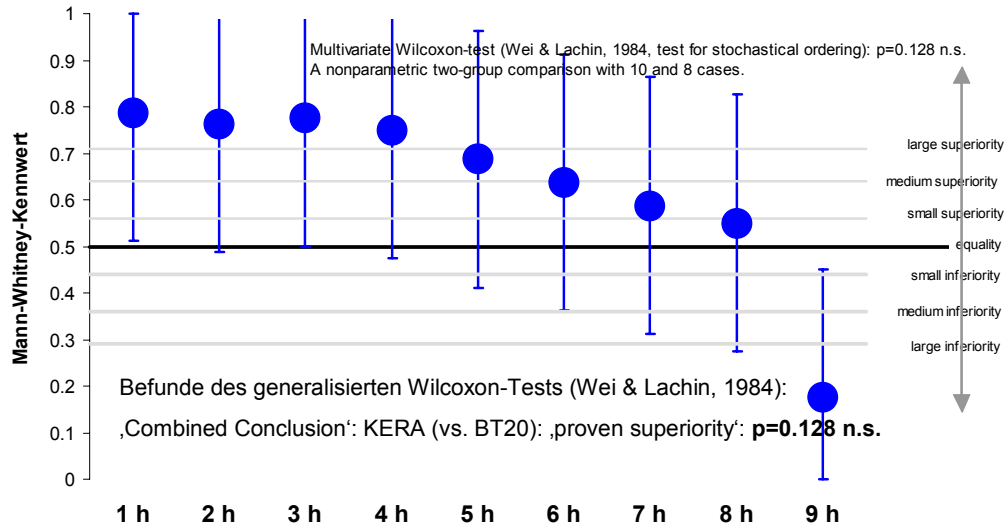


Abbildung 60

Abbildung 59 und 60: Analyse des Wärmeflussgewinns unter 50 µM 2,4-DNP von HUVEC und BT20 (Abbildung 59) sowie von KERA und BT20 (Abbildung 60).

1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.

2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

KERA vs. HUVEC unter 50 µM 2,4-DNP

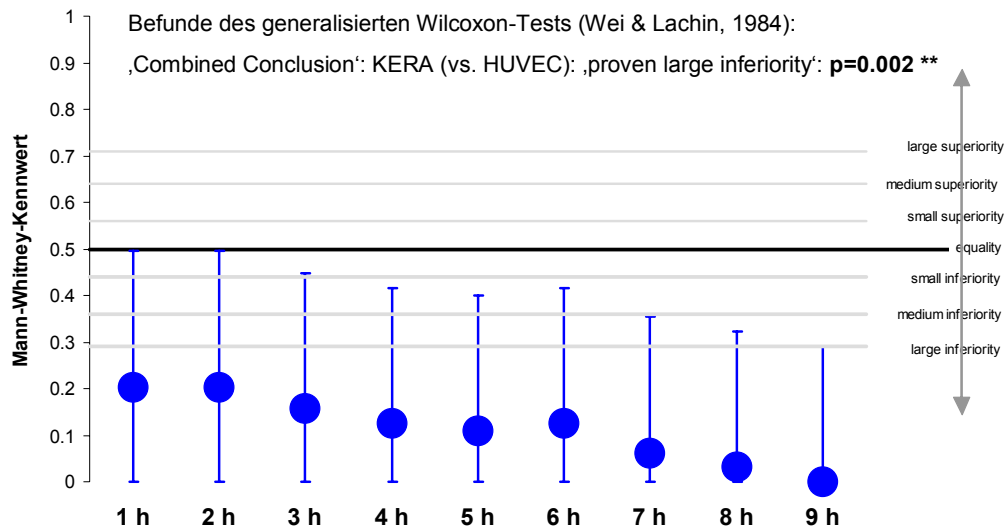


Abbildung 61: Analyse des Wärmeflussgewinns unter 50 µM 2,4-DNP von KERA und HUVEC.

- 1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.
- 2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Zusammenfassend zeigt die Analyse der 50 µM 2,4-DNP Versuchsreihen Unterschiede zwischen HUVEC und BT20 ($p=0.015$ *) sowie HUVEC und KERA ($p=0.002$ **). In beiden Fällen ist HUVEC überlegen.

Diskussion der Analyse der Dosierungsstufe 50 µM 2,4-DNP

Ergebnisse der Analyse der zelllinienspezifischen Wärmeflusseffekte (aus Kapitel 10.5.3):

Die Dosierungsstufe 50 µM 2,4-DNP erhöht bei pA1, HUVEC und KERA im Vergleich zur Nulldosis den Wärmefluss signifikant. Nicht jedoch bei BT20.

Ergebnisse des Nulldosis-normierten Vergleichs der Dosisstufe 50 µM 2,4-DNP:

Dosisstufe 2,4-DNP	Zelllinie	Relevanz des generellen Unterschieds	explorative Signifikanz
50 µM	BT20 (vs. pA1)	(proven inferiority)	n.s
50 µM	KERA (vs. pA1)	(proven inferiority)	n.s
50 µM	HUVEC (vs. pA1)	(proven medium superiority)	n.s
50 µM	KERA (vs. BT20)	(proven superiority)	n.s
50 µM	HUVEC (vs. BT20)	proven large superiority	p=0.015 *
50 µM	KERA (vs. HUVEC)	proven large inferiority	p=0.002 **

Der Vergleich des Nulldosis-normierten Wärmeflussgewinns der Zelllinien BT20 versus pA1, KERA versus pA1, HUVEC versus pA1 sowie KERA versus BT20 für die Dosierungsstufe 50 μM 2,4-DNP ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Im Vergleich HUVEC versus BT20 konnte für die untersuchte Dosierungsstufe hingegen ein deutlicher Wärmeflussgewinn von HUVEC festgestellt werden. Der Vergleich KERA versus HUVEC zeigte, dass KERA unter 50 μM 2,4-DNP weniger Wärme produzieren als HUVEC. In der Dosierungsstufe 50 μM 2,4-DNP sind somit vor allem die HUVEC Zellen aufgefallen: im Vergleich mit BT20 und KERA sind sie in der Lage, deutlich mehr Wärme unter der Dosierung zu produzieren und scheinen daher unter dieser Dosierungsstufe sensibler zu reagieren. Interessant ist die Tatsache, dass HUVEC bei 50 μM 2,4-DNP in Sachen Wärmeflussgewinn BT20 überlegen ist, nicht jedoch bei 25 μM 2,4-DNP, wo BT20 eine stärkere Reaktion auf 2,4-DNP zeigt. Vermutlich ist dies auf den fehlenden Wärmeflusseffekt von BT20 durch die Dosierungsstufe 50 μM 2,4-DNP bedingt.

10.5.4.4. Analyse der Dosisstufe 100 µM 2,4-DNP

Ergebnisse

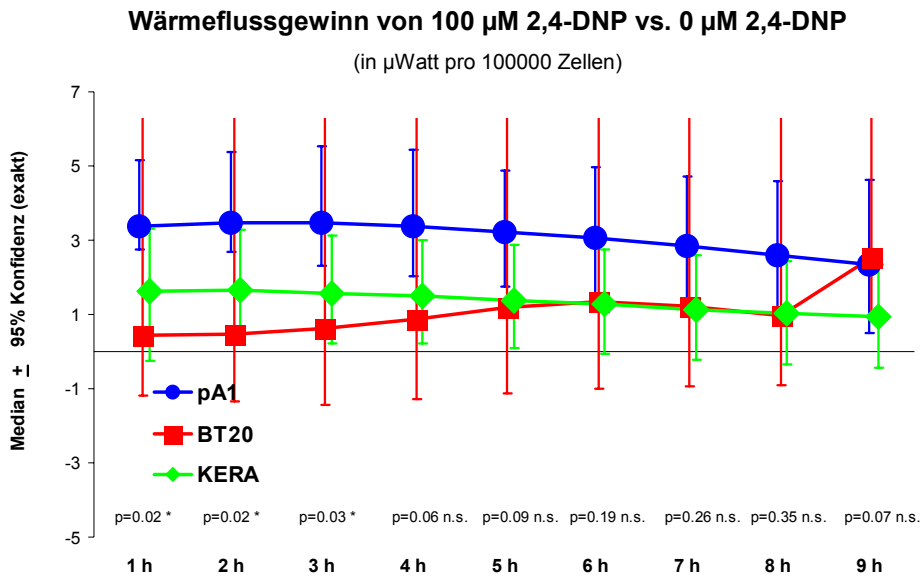


Abbildung 62: Nulldosis-normierter Vergleich der Zelllinien unter 100 µM 2,4-DNP

Angegeben sind jeweils die Medianwerte des Wärmeflussgewinns von pA1, BT20 und KERA (inklusive der exakten 95%-Konfidenzgrenzen) unter 100 µM 2,4-DNP.

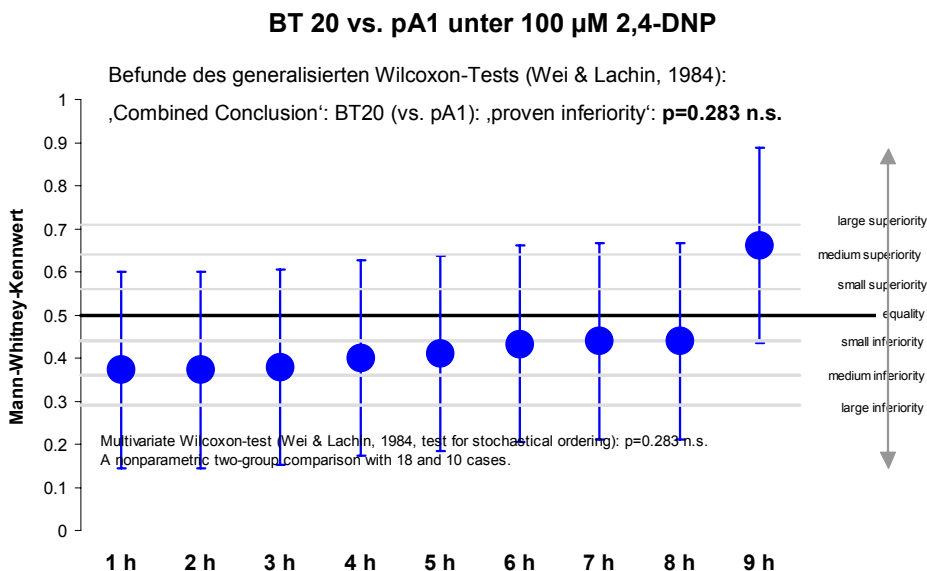


Abbildung 63: Analyse des Wärmeflussgewinns unter 100 µM 2,4-DNP von BT20 und pA1.

1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.

2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

KERA vs. pA1 unter 100 µM 2,4-DNP

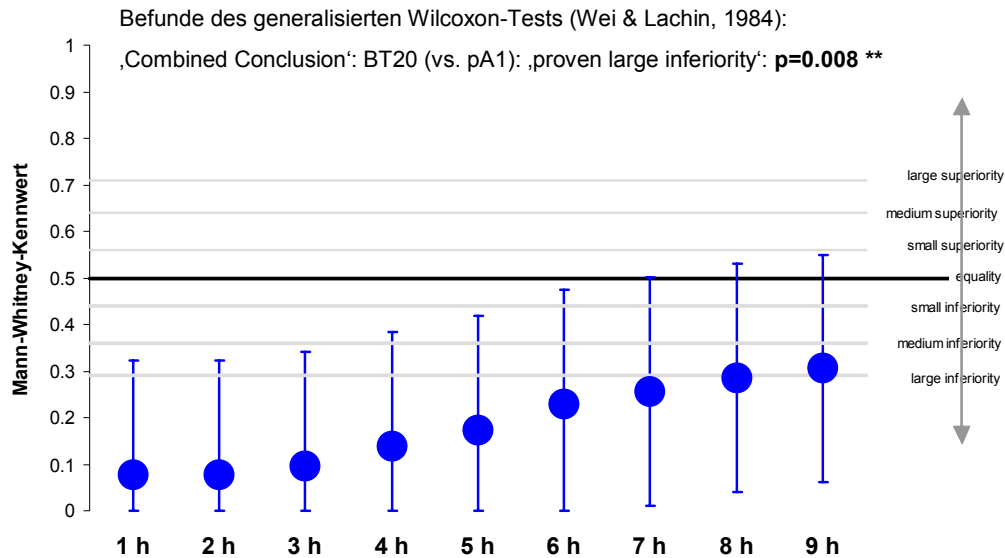


Abbildung 64

KERA vs. BT 20 unter 100 µM 2,4-DNP

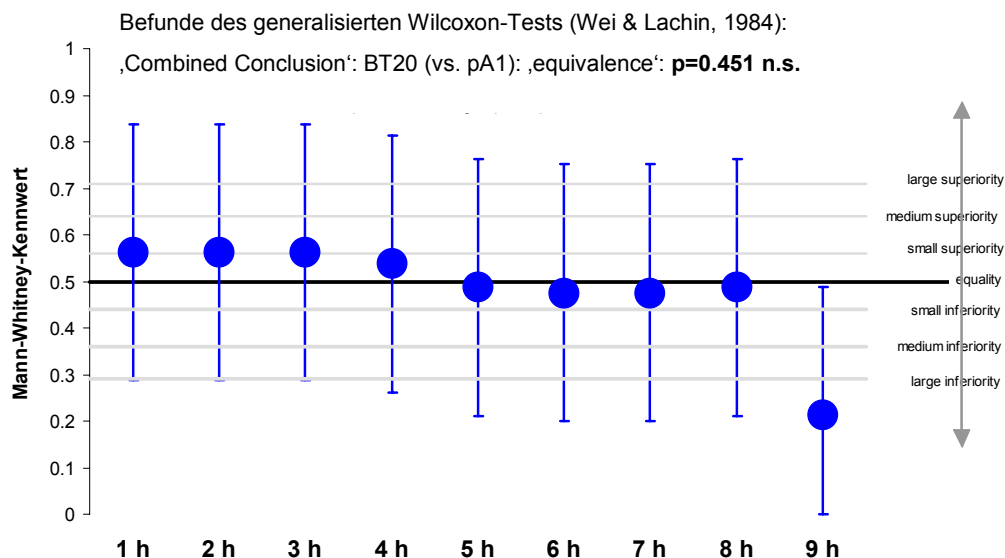


Abbildung 65

Abbildung 64 und 65: Analyse des Wärmeflussgewinns unter 100 µM 2,4-DNP von KERA und pA1 (Abbildung 64) sowie von KERA und BT20 (Abbildung 65).

1.) Prüfung auf lokalen (d.h. zu jeder vollen Stunde) Unterschied mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert als Maß für Relevanz eines Unterschieds. Konfidenzen, die die Äquivalenzlinie *nicht* schneiden, verweisen auf einen explorativ signifikanten lokalen Unterschied.

2.) Prüfung auf einen generellen (d.h. im gesamten Messzeitraum) Unterschied mittels des generalisierten Wilcoxon-Tests nach Wei & Lachin. Der p-Wert in der Graphik gibt den multivariaten Befund wieder. Ist er signifikant, liegt ein genereller Unterschied vor.

Ein direkter Vergleich aller Zelllinien der 100 µM 2,4-DNP Versuchsreihen zeigte nur generelle Unterschiede zwischen KERA und pA1 ($p=0.008$ **), weitere Unterschiede wurden statistisch nicht bedeutsam, da die Variabilitäten (siehe die Breite der Konfidenzintervalle für die BT20- Daten) zu groß ausfielen.

Diskussion der Analyse der Dosierungsstufe 100 µM 2,4-DNP

Ergebnisse der Analyse der zelllinienspezifischen Wärmeflusseffekte (aus Kapitel 10.5.3): Die Dosierungsstufe 100 µM 2,4-DNP erhöht bei jeweils bei pA1, BT20 und KERA im Vergleich zur Nulldosis den Wärmefluss signifikant.

Ergebnisse des Nulldosis-normierten Vergleichs der Dosisstufe 50 µM 2,4-DNP:

Dosisstufe 2,4-DNP	Zelllinie	Relevanz des generellen Unterschieds	explorative Signifikanz
100 µM	BT20 (vs. pA1)	(proven inferiority)	n.s
100 µM	KERA (vs. BT20)	(equivalence)	n.s
100 µM	KERA (vs. pA1)	proven large inferiority	p=0.008 **

Der Vergleich des Nulldosis-normierten Wärmeflussgewinns der Zelllinien BT20 versus pA1 sowie BT20 versus KERA für diese Dosierungsstufe ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Im Vergleich KERA versus pA1 konnte jedoch für KERA eine Unterlegenheit der Dosisstufe 100 µM 2,4-DNP im Vergleich zu pA1 zeigen. KERA produziert also signifikant weniger Wärme unter 100 µM 2,4-DNP als pA1.

10.5.4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse (Kapitel 10.5.4)

Obwohl der Testdurchlauf mit vier Zelllinien für eine Beantwortung der Fragestellung im Sinne des Forschungsprojektes nicht ausreicht, soll dennoch im folgenden ein Vergleich der bereits untersuchten malignen (pA1 und BT20) mit den benignen Zelllinien (HUVEC und KERA) erstellt werden:

Dosisstufe	BT20 vs. KERA	BT20 vs. HUVEC	pA1 vs. KERA	pA1 vs. HUVEC
100 µM 2,4-DNP	k.s.U.	---	pA1 überlegen	---
50 µM 2,4-DNP	k.s.U.	BT20 unterlegen	k.s.U.	k.s.U.
25 µM 2,4-DNP	---	BT20 überlegen	---	k.s.U.
12.5 µM 2,4-DNP	---	---	---	---

Legende: k.s.U. = kein (genereller) signifikanter Unterschied des Wärmeflussgewinns zwischen den getesteten Zelllinien unter der angegebenen 2,4-DNP Dosisstufe
--- = hierfür wurden keine Versuchsreihen durchgeführt
xx überlegen = der Wärmefluss gewinn unter der angegebenen 2,4-DNP-Dosisstufe fällt für diese Zelllinie höher aus
xx unterlegen = der Wärmefluss gewinn unter der angegebenen 2,4-DNP-Dosisstufe fällt für diese Zelllinie niedriger aus

BT20 vs. KERA:

Für die durchgeführten Versuchsreihen mit den Dosisstufen 50 µM 2,4-DNP und 100 µM 2,4-DNP wurde kein signifikanter Unterschied des Wärmeflussgewinns festgestellt.

BT20 vs. HUVEC:

Mit der Dosisstufe 25 µM 2,4-DNP ist BT20 überlegen, produziert also mehr Wärme als HUVEC. Bei höheren Konzentrationen scheint hingegen HUVEC überlegen zu sein.

pA1 vs. KERA:

Ein signifikanter Unterschied konnte erst bei Dosisstufe 100 µM 2,4-DNP festgestellt werden: hier fiel der Wärmeflussgewinn unter 100 µM 2,4-DNP höher als bei KERA aus.

pA1-HUVEC:

Für die durchgeführten Versuchsreihen mit den Dosisstufen 25 µM 2,4-DNP und 50 µM 2,4-DNP wurde kein signifikanter Unterschied des Wärmeflussgewinns festgestellt.

Aufgrund der heterogen durchgeführten Versuche kann somit noch keine abschließende Aussage hinsichtlich einer generellen Abhängigkeit der Wärmeproduktion in Reaktion auf 2,4-DNP und dem Malignitätsgrad der getesteten Zelllinien getroffen werden. Interessant scheinen jedoch aufgrund der vorliegenden Ergebnisse vor allem die niedrigeren Dosierungen für weitergehende Versuche.

10.6. Abschließende Diskussion zu Kapitel 10

Ziel der Arbeit war, für das in Kapitel 1 vorgestellte Forschungsprojekt ein Modell für eine mikrokolorimetrische Untersuchung zu entwickeln, das es gestattet, eine Vielzahl an Zelllinien unter dem Einfluss von 2,4-DNP zu untersuchen. Hiermit sollte die Frage beantwortet werden, ob maligne Zelllinien unter 2,4-DNP eine höhere Wärmeproduktion als benigne Zelllinien aufweisen.

Nachdem ein Messsystem erfolgreich etabliert war, wurden zur Überprüfung des Modells insgesamt vier Zelllinien unter vier verschiedenen Dosisstufen 2,4-DNP (zuzüglich der Nulldosis) analysiert. Außerdem sollte mit diesem Testdurchlauf eine adäquate Methodik für eine Datenanalyse etabliert werden.

In bisher publizierten Arbeiten auf dem Gebiet der Mikrokolorimetrie wurde von den meisten Autoren, die Zellen in unterschiedlichen Kontexten im Mikrokolorimeter untersucht haben ^{27,28,32,34,35}, die Analyse des Wärmeflusses bzw. seines Integrals vorgenommen. Allerdings waren diese Arbeiten von nur geringem, zum Teil sogar sehr geringem Stichprobenumfang (n=3). So konnte nur bedingt auf etablierte Methodiken für eine adäquate Analyse unserer Daten (n=206) zurückgegriffen werden, die dem großen Stichprobenumfang und dem multivariaten Charakter der Daten gerecht wurde.

Erste Ansätze einer Datenanalyse, die die Wirkung von 2,4-DNP an Hand des Parameters Wärmeproduktion untersuchten, wiesen auf Störfaktoren in dem Modell hin und mussten verworfen werden. Nachdem zumindest ein Störfaktor eliminiert werden konnte, wurde versucht, mit einem Ansatz der Regressionsanalyse unter Beachtung des zweiten Störfaktors die Daten auszuwerten, was jedoch auf Grund statistischer Probleme nicht zu leisten war.

Die Daten des Testdurchlaufs wurden schließlich mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert und dem Verfahren nach Wei und Lachin analysiert. Gegenstand der Untersuchungen war der gemessene Wärmefluss. Dieser wurde ausgewählt, da er unmittelbar den Effekt von 2,4-Dinitrophenol widerspiegelt.

In einem ersten Schritt wurde für die jede Zelllinie der Einfluss verschiedener Dosisstufen 2,4-DNP auf den Wärmefluss gegenüber der Nulldosis verglichen. Der zuvor im Rahmen erster Versuche einer Datenanalyse identifizierte Störfaktor ‚variierende Plättchendichte‘ wurde hierbei durch den Einbezug des Quotienten aus Wärmefluss und Zellzahl in die Kalkulationen berücksichtigt. Der ebenfalls identifizierte Störfaktor ‚crowding-Effekt‘ ist hingegen in den vorliegenden Berechnungen noch enthalten. Wie im Kapitel 10.3.3 erläutert, ist eine Elimination dieses Störfaktors schwierig. Es gelang jedoch Möglichkeiten

zur Reduktion des Einflusses dieses Störfaktors aufzuzeigen, so dass das Modell optimiert werden konnte. Allerdings konnte eine Minimierung des crowding-Effekts im Rahmen der vorliegenden Versuchsreihen nicht umgesetzt werden, da diese als Grundlage für die Kalkulation des Effektes bereits weitestgehend abgeschlossen waren.

Die durchgeführte statistische Analytik erlaubte Aussagen sowohl zu generellen (bezogen auf den gesamten Untersuchungszeitraum von 9 Stunden) als auch lokalen (bezogen auf jede volle Stunde) Effekten von 2,4-DNP auf den Wärmefluss. Als Maß für den Effekt von 2,4-DNP wurde ein Kennwert ermittelt, der die Relevanz eines Unterschiedes zwischen den überprüften Gruppen (z.B. Wärmefluss unter 0 und 50 μM 2,4-DNP) angibt. Nach Prüfung auf Signifikanz konnte auf diese Weise eine Aussage getroffen werden, inwiefern zum Beispiel eine bestimmte Dosisstufe der Nulldosis über- oder unterlegen ist, und mit welcher ‚power‘ der Effekt vorliegt.

In einem zweiten Schritt wurde ein Nulldosis-normierter Vergleich der Zelllinien für die getesteten Dosisstufen durchgeführt, um die verschiedenen Dosisstufen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die unterschiedlichen Zelllinien zu vergleichen. Die Nulldosis-Normierung war erforderlich, da insbesondere die benignen Zelllinien niedrigere Plättchendichten als die malignen Zelllinien aufwiesen. Auch hier gestattete die statistische Analytik Aussagen sowohl zu generellen als auch lokalen Unterschieden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass eine geeignete Methodik für eine aussagekräftige Datenanalyse erfolgreich etabliert werden konnte, die dem multivariaten Charakter und dem großen Umfang der Daten gerecht wird. Zudem gelang durch den Testdurchlauf die Identifikation zweier unerwarteter Störfaktoren, für deren Elimination bzw. Minimierung Möglichkeiten aufgezeigt wurden, so dass das Modell optimiert werden konnte.

11. Ergänzende Datenanalysen

Im vorherigen Kapitel wurde für die Analyse der Wirkung unterschiedlicher Dosisstufen von 2,4-DNP auf verschiedene Zelllinien der Parameter Wärmefluss in Abhängigkeit der Zeit untersucht. In einem ersten Schritt wurden die Kurvenverläufe des Wärmeflusses unter verschiedenen 2,4-DNP-Dosisstufen für jede getestete Zelllinie ausgewertet, in einem zweiten Schritt wurde ein Nulldosis-normierter Vergleich des Wärmeflussgewinns der verschiedenen Zelllinien für die vier getesteten 2,4-DNP-Dosisstufen durchgeführt.

Dies ermöglichte zum einen Aussagen, wie sich unterschiedliche Dosisstufen 2,4-DNP in Abhängigkeit der Zeit auf den Wärmefluss einer Zelllinie auswirken. Zum anderen gestattete dies einen Vergleich der Wirkung einer bestimmten Dosisstufe unter verschiedenen Zelllinien. Die Anforderungen an das Modell hinsichtlich einer Beantwortung der Fragestellung des Forschungsprojektes sind somit erfüllt.

Im Rahmen der Arbeit ergaben sich jedoch Fragen, die mit der bisherigen Datenauswertung nicht beantwortet werden konnten:

Die Messungen begannen messtechnisch-bedingt erst ca. 20 Minuten nach Zugabe von 2,4-DNP. Es stellte sich daher die Frage, was in dieser Zeit passiert. Hierfür wurde für die pA1-Versuchsreihen der initiale Wärmefluss untersucht, da dieser Kurvenparameter einen Hinweis auf das Wirkpotential von 2,4-DNP in den ersten, nicht gemessenen Minuten geben könnte. Es wurde erwartet, dass der initiale Wärmefluss umso höher ausfällt, je höher die 2,4-DNP-Konzentration ist.

Desweiteren war ungeklärt, wie sich 2,4-DNP in zeitlicher Hinsicht auf den Wärmefluss auswirkt. Daher wurde die prozentuale Steigerung des Wärmeflusses in den ersten 3 Stunden untersucht. Unter Annahme einer gleichmäßigen Kinetik von 2,4-DNP in den unterschiedlichen Konzentrationen wurde vermutet, dass hohe 2,4-DNP-Konzentration einen entsprechend stärkeren Anstieg des Wärmeflusses bedingen.

Aus den graphischen Darstellungen des Wärmeflusses in Abhängigkeit der Zeit wurde der Eindruck vermittelt, dass das Maximum bei höheren Konzentrationen von 2,4-DNP eher erreicht wurde als mit niedrigeren Konzentrationen. Dies sollte am Beispiel der pA1-Versuchsreihen überprüft werden, da dies letztlich Auskunft über die Wirkdauer von 2,4-DNP geben kann.

11.1. Methodische Überlegung

Die Beantwortung der Fragen erfolgte mit den Daten des pA1-Versuchspools, da für die Zelllinie pA1 Versuchsreihen mit allen Dosisstufen vorlagen.

Aus den vorherigen Analysen war bekannt, dass die Plättchendichten variierten und dies einen erheblichen Störfaktor darstellte, der zudem den Störfaktor crowding-Effekt potenzierte. Es erhob sich daher die Frage, wie die Störfaktoren bei der geplanten Untersuchung berücksichtigt werden könnten. Für den Kurvenparameter ‚Zeit bis zum maximalen Wärmefluss‘ ist ein Umrechnen auf eine ‚pro Zellzahl –Einheit‘ nicht möglich, und, ein Bezug der nach 9 Stunden ermittelten Zellzahl auf den Kurvenparameter ‚initialer Wärmefluss‘ kann nicht erfolgen, da in einem Zeitraum von 9 Stunden von einer Proliferation der Zellen auszugehen ist. Die Analyse der vorgestellten Kurvenparameter konnte somit nicht mit einer *unmittelbaren* Berücksichtigung der Plättchendichten erfolgen (d.h. keine Analysen mit Quotienten aus Kurvenparameter und Zellzahl). Dennoch mussten die bestehenden Variationen der Plättchendichten berücksichtigt werden.

Da für die Versuche die gleiche Passage pA1 verwendet wurde, wurde davon ausgegangen, dass ähnliche Plättchendichten in etwa gleich viel Wärme produzieren. Als Einschlusskriterium für eine Datenauswahl wurde daher ein per Ansicht ähnlicher Kurvenverlauf des Wärmeflusses definiert. Auf diese Weise wurde der Störfaktor Zellzahl *mittelbar* berücksichtigt und der Störfaktor crowding-Effekt wie in Kapitel 10.3.3 vorgeschlagen durch Beschränkung auf einen Zellzahlbereich minimiert.

Da hier gezielten Fragen nachgegangen werden sollte, wurde durch die andere Datenauswahl in Kauf genommen, dass die Ergebnisse dieser Untersuchung somit nicht zu denen aus Kapitel 10 in Bezug gesetzt werden können. Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Datenlage:

Versuchsreihe	12.5 µM 2,4-DNP	25 µM 2,4-DNP	50 µM 2,4-DNP	100 µM 2,4-DNP
Anzahl Versuche	9	8	12	11

Für jede Versuchsreihe wurden jeweils die Mediane der zu untersuchenden Kurvenparameter ermittelt. Anschließend wurden diese auf generelle Unterschiede hin mit einer Rangvarianzanalyse überprüft sowie paarweise Vergleiche der Dosischwerpunkte (Mediane) mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

11.2. Initialer Wärmefluss

11.2.1. Ergebnis

Wie Abbildung 66 zeigt, unterscheiden sich die untersuchten Dosisstufen hinsichtlich des initialen Wärmeflusses sowohl generell als auch paarweise, wobei aber höhere Dosisstufen nicht entsprechend einen höheren initialen Wärmefluss aufweisen: so zeigt zwar die Dosisstufe 12,5 μM 2,4-DNP den niedrigsten und die Dosisgruppe 100 μM 2,4-DNP den höchsten initialen Wärmefluss, die Dosisgruppe 25 μM 2,4-DNP zeigt jedoch einen höheren initialen Wärmefluss als die Dosisgruppe 50 μM 2,4-DNP.

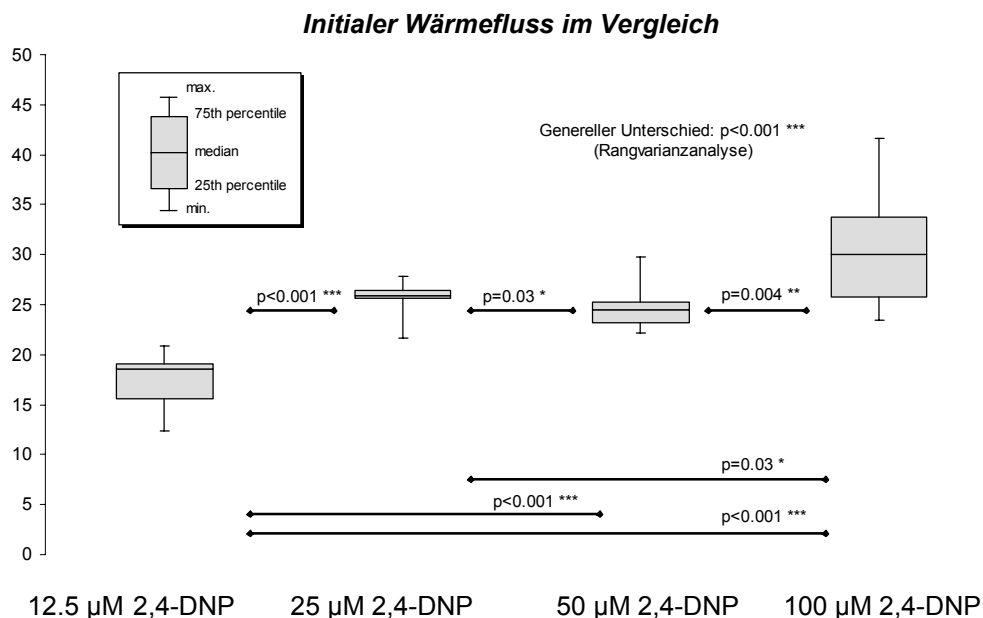


Abbildung 66: Vergleich des initialen Wärmeflusses verschiedener 2,4-DNP-Dosisstufen (pA1). Wichtigster Kennwert für den Vergleich zwischen den Dosisstufen ist der Median. Test auf generellen Unterschied: Rangvarianzanalyse. Paarweise Vergleiche der Dosisstufen (Mediane) mittels Mann-Whitney-U-Test.

11.2.2. Diskussion

Die Ergebnisse bestätigen, dass bereits in den ersten 20 Minuten nach Zugabe von 2,4-DNP, in denen noch keine mikrokolorimetrische Messung technisch möglich war, die Wirkung von 2,4-DNP einsetzt. Je nach Dosisstufe ist der Wärmefluss entsprechend gesteigert. Nicht zu erklären ist in diesem Zusammenhang die Überlegenheit der 25 μM 2,4-DNP gegenüber der 50 μM 2,4-DNP Dosisstufe.

11.3. Prozentuale Steigerung des Wärmeflusses in den ersten 3 Stunden

11.3.1. Ergebnis

Hinsichtlich der prozentualen Steigerung des Wärmeflusses in den ersten 3 Stunden lassen sich in beiden untersuchten Zeitintervallen keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Dosisstufen feststellen.

**Prozentuale Steigerung des Wärmeflusses in den ersten 3 Stunden –
ein Vergleich**

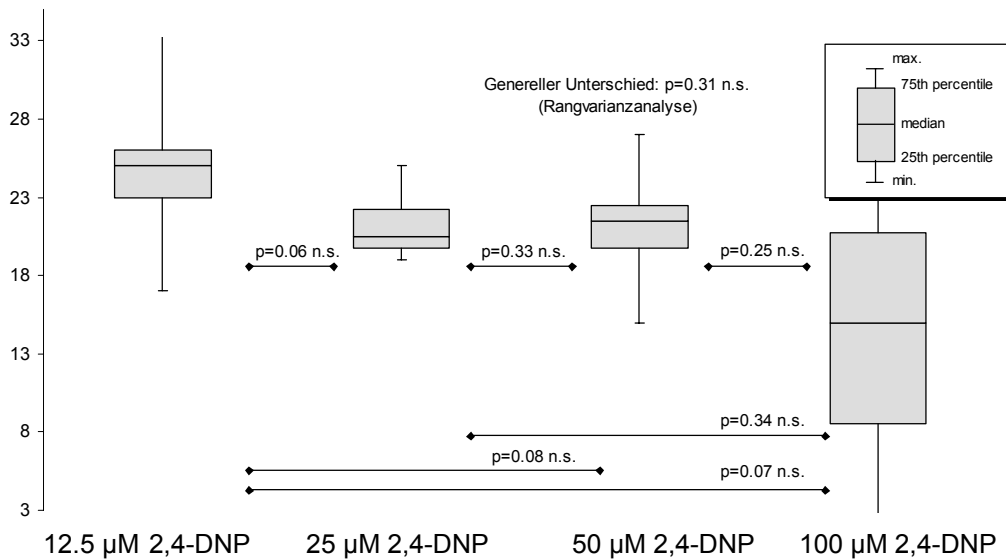


Abbildung 67: Vergleich der prozentualen Steigerung des Wärmeflusses in den ersten 3 Stunden unter verschiedenen 2,4-DNP-Dosisstufen (pA1)

Wichtigster Kennwert für den Vergleich zwischen den Dosisstufen ist der Median. Test auf generellen Unterschied: Rangvarianzanalyse. Paarweise Vergleiche der Dosisstufen (Mediane) mittels Mann-Whitney-U-Test.

11.3.2. Diskussion

Wie im vorherigen Kapitel nachgewiesen wurde, ist 2,4-DNP bei pA1 Zellen in höheren Dosierungen in der Lage, den Wärmefluss zu steigern. Die Auswertung des Einflusses von 2,4-DNP auf den initialen Wärmefluss ergab, dass 2,4-DNP diesen dosisabhängig erhöht. Die Untersuchung, ob 2,4-DNP die prozentuale Steigerung des Wärmeflusses ebenfalls dosisabhängig erhöht, konnte jedoch keine Unterschiede zwischen den getesteten Dosisstufen feststellen. Aus pharmakodynamischen Gesichtspunkten sind diese Befunde interessant: Dies muss bedeuten, dass 2,4-DNP vermutlich direkt nach Zugabe eine sofortige, je nach Dosisstufe ausgeprägte Erhöhung der basalen Stoffwechselrate und somit des Wärmeflusses bedingt. Die folgenden prozentualen Steigerungen des Wärmeflusses sind jedoch unabhängig von der Dosisstufe.

11.4. Zeit bis zum Erreichen des maximalen Wärmeflusses

11.4.1. Ergebnis

Wie die Abbildung 68 erkennen lässt, verkürzt sich die Zeit bis zum Erreichen des Maximums mit steigender Dosierung.

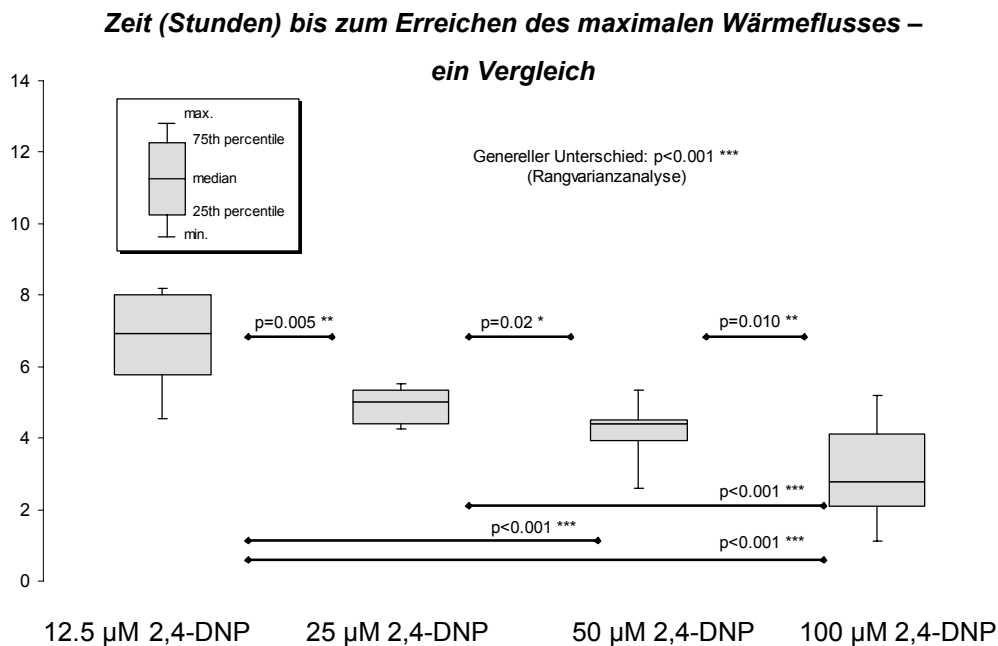


Abbildung 68: Vergleich der Zeit (in Stunden) bis zum Erreichen des maximalen Wärmeflusses unter verschiedenen 2,4-DNP-Dosisstufen (pA1)

Wichtigster Kennwert für den Vergleich zwischen den Dosisstufen ist der Median. Test auf generellen Unterschied: Rangvarianzanalyse. Paarweise Vergleiche der Dosisstufen (Mediane) mittels Mann-Whitney-U-Test (p -Werte < 0.05 weisen auf einen explorativ signifikanten Unterschied hin).

11.4.2. Diskussion pA1

Wie bereits aus den graphischen Darstellungen des Wärmeflusses in Abhängigkeit der Zeit vermutet, haben höhere Dosisstufen in dem Messsystem eine verkürzte Wirkdauer. Generell kommen theoretisch mehrere Ursachen für das Erreichen des Maximums des Wärmeflusses innerhalb des Versuchszeitraums in Frage:

- Ab einer gewissen Dauer wirkt 2,4-DNP zytotoxisch, so dass vermehrt Zellen absterben und somit weniger Wärme produziert wird, der Wärmefluss also schließlich abfällt,
- die 2,4-DNP-Wirkung ist ab einem bestimmten Zeitpunkt erschöpft,
- der Abfall des Wärmeflusses vor Beendigung des Versuchs ist durch eine Substratlimitierung bzw. Mediumveränderungen bedingt.

Für eine abschließende Ursachenklärung sind daher weitere Untersuchungen notwendig.

Eine generelle Substratlimitierung kann auf Grund der im folgenden Kapitel vorgestellten Ergebnisse der Analyse ausgewählter Mediumparameter als unwahrscheinlich eingeschätzt werden. Diese ergab nämlich, dass zumindest das Substrat Glucose nach 9 Stunden unter der Dosisstufe 100 μM 2,4-DNP noch ausreichend vorhanden ist, auch wenn maligne Zellen eine Vielzahl an Nährstoffen verstoffwechseln können^{70,71,76,77,104}, deren Bestand nicht überprüft wurde. pO_2 und pCO_2 sowie der pH des Mediums waren in allen Dosisstufen unverändert, so dass eine Mediumveränderung als Ursache ausgeschlossen werden kann. Auch wenn somit eine generelle Substratlimitierung / Mediumveränderung als Ursache ausschließbar scheint, kann jedoch - wie in Kapitel 10.3.3 diskutiert - eine zumindest lokale Substratlimitierung / Mediumveränderung in direkter Umgebung des Monolayers in Folge von Diffusionsproblemen Ursache für das Erreichen des maximalen Wärmeflusses sein.

Die Frage, ob die Wirkung von 2,4-DNP ab einem bestimmten Zeitpunkt erschöpft ist, ließe sich sehr elegant mit den Methoden der sogenannten offenen Mikrokalorimetrie klären (siehe Kapitel 2.1). Mit dieser Methode wäre es möglich, nach Erreichen des Maximums erneut 2,4-DNP dem Medium zuzugeben und somit die Reaktionsfähigkeit der Zellen auf wiederholte Zugabe des Entkopplers zu untersuchen.

Untersuchungen von mit 2,4-DNP behandelten Zellkulturen zeigten deutlich apoptotische Zellen, insbesondere unter höheren Dosen. Eine Zytotoxizität als Ursache für eine begrenzte Wirkung von 2,4-DNP scheint daher momentan am wahrscheinlichsten, so dass für die unterschiedlichen Dosisstufen Zytotoxizitätassays durchgeführt werden sollten, um dies weiter abzuklären.

11.5. Abschließende Diskussion zu Kapitel 11

Die Analyse von initialem Wärmefluss und prozentualer Steigerung des Wärmeflusses in den ersten 3 Stunden gab interessante Hinweise zur Pharmakodynamik von 2,4-DNP: Offensichtlich bewirkt 2,4-DNP unmittelbar nach Zugabe von 2,4-DNP je nach Dosisstufe eine entsprechend gesteigerte Stoffwechselaktivität. Diese wird dann - bereinigt um Wärmeflusseffekte der Proliferationstätigkeit - kontinuierlich aufrechterhalten, bis schließlich das Maximum der Wirkung erreicht ist.

Der durch die Untersuchung des Kurvenparameters ‚Zeit bis zum Erreichen des maximalen Wärmeflusses‘ aufgezeigte Einfluss der Dosis auf die Wirkdauer könnte zudem als ein Marker für die Toxizität dienen, auch wenn, wie bereits erläutert, hierfür noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden müssten. Anzumerken bleibt, dass dieser Parameter jedoch nur für Vergleiche unterschiedlicher Dosisstufen innerhalb einer Versuchsreihe geeignet wäre, da variierende Plättchendichten insbesondere unter verschiedenen Zelllinien nicht berücksichtigt werden können.

Insgesamt werfen diese Untersuchungen zudem die Frage auf, ob das etablierte Modell unter Umständen vereinfacht bzw. optimiert werden könnte.

Zum einen stellt sich die Frage, ob überhaupt lange Messungen im Mikrokalorimeter für Aussagen hinsichtlich des Wirkpotentials von 2,4-DNP erforderlich sind, wenn offenbar bereits am initialen Wärmefluss die Wirkung von 2,4-DNP bemessen werden kann. Dies könnte wie folgt abgeklärt werden: Daten aus einem Versuchspool müssten zum einen hinsichtlich des initialen Wärmeflusses, andererseits analog wie in Kapitel 10 untersucht und die Ergebnisse verglichen werden.

Zum anderen könnten die Messzeiträume verkürzt werden: da ja vor allem die Frage nach dem Steigerungspotential auf die Wärmefreisetzung interessiert, würde es ausreichen, nach Bestimmung der kürzesten Dauer bis zum Erreichen des maximalen Wärmeflusses aller zu prüfenden Zelllinien und Dosisstufen diese als Messzeitraum auszuwählen. Würde zudem, wie in Kapitel 10.3.3 zur Minimierung des crowding-Effekts vorgeschlagen, eine bestimmte Plättchendichte als Einschlusskriterium für die Datenauswahl definiert werden, wäre es eventuell sogar auf Grund eines geringeren und vereinfachten Datenumfangs möglich, die Datenanalyse an Hand eines einfachen Vergleichs der unterschiedlichen Wärmeproduktionen (pro Plättchendichte-Einheiten) durchzuführen.

12. Ergänzende Untersuchung von Stoffwechselfparametern

Im Kapitel 2 wurde bereits darauf hingewiesen, dass für eine kritische Interpretation der mikrokalorimetrischen Messergebnisse ergänzende Untersuchungen im entsprechenden Kontext der Experimente unabdingbar sind ²².

Prinzipiell ist es möglich, derartige Untersuchungen jeweils nach den mikrokalorimetrischen Messungen zu untersuchen. Es ist jedoch sinnvoll, wenn bereits zu Beginn der Untersuchungen Erkenntnisse vor allem über eventuelle Störfaktoren vorliegen. Zudem sollten die Untersuchungen unabhängig vom Ablauf der Messungen im Mikrokalorimeter durchführbar sein. Es wurde daher mit einem Wärmebad ein Modell etabliert (siehe Kapitel 8.2.5), das es gestattete, das Mikrokalorimeter zu ‚simulieren‘.

Dadurch war es möglich, unter gleichen Messbedingungen wie im Mikrokalorimeter Stoffwechseluntersuchungen sowie Messungen am Medium vorzunehmen.

Im Rahmen der Zusatzuntersuchungen dieser Arbeit sollten folgende Hypothesen überprüft bzw. folgende mögliche Störfaktoren identifiziert werden:

- 2,4-DNP steigert den Stoffwechselumsatz. Unabhängig davon, ob dies über einen aeroben oder anaeroben Stoffwechselweg geschieht, kann folglich davon ausgegangen werden, dass auch der Verbrauch an Substraten ansteigen muss. Dies sollte am Beispiel des Glucose-Verbrauchs überprüft werden.
- Es ist davon auszugehen, dass auf Grund des Wirkmechanismus von 2,4-DNP die Stoffwechselsteigerung eher oxidativ bedingt ist, also über einen gesteigerten aeroben Stoffwechselweg erfolgt. Um eine verstärkte Aktivierung des anaeroben Stoffwechselwegs unter 2,4-DNP auszuschließen, wurde zusätzlich die Laktatproduktion bestimmt.
- Änderungen des pH-Wertes oder der Sauerstoffsättigung während einer mikrokalorimetrischen Untersuchung können einen (unter Umständen erheblichen) Einfluss auf die Wärmefreisetzung haben und so das Ergebnis verfälschen ^{35,36}. Um daher eventuelle Störfaktoren wie einen abfallenden pH oder gravierende Veränderungen der Sauerstoffsättigung des Mediums auszuschließen, wurde außerdem der pH, die pO_2 bzw. pCO_2 des Mediums nach den 9-Stunden Messungen bestimmt und unter den zwei Dosisstufen auf Unterschiede hin überprüft.

12.1. Methodische Überlegungen

Datenlage

Für die Durchführung der Zusatzuntersuchungen wurden insgesamt 36 Versuche im Wärmebad ‚simuliert‘. Zum Vergleich gegenüber der Nulldosis wurde die Dosisstufe 100 μM 2,4-DNP ausgewählt. Da diese Dosisstufe in den mikrokalorimetrischen Untersuchungen die höchste verwendete Dosis war, wurden somit die ‚Eckpfeiler‘ der in dieser Arbeit verwendeten Dosisstufen überprüft. Ein weiterer Auswahlgrund war die Überlegung, dass für die Bestimmung der Stoffwechselfparameter im Medium keine hochsensitiven Verfahren zur Verfügung standen und die durchschnittliche Plättchendichte von 800000 Zellen für diese Zwecke relativ gering war.

Aus den mikrokalorimetrischen Untersuchungen mit 100 μM 2,4-DNP war bekannt, dass die Dosisstufe 100 μM 2,4-DNP eine hohe initiale Stoffwechselsteigerung bedingt. Diese fällt jedoch nach kurzer Zeit stark ab. Um folglich adäquate Rückschlüsse auf den Stoffwechsel in diesen ersten Stunden ziehen zu können, wurden für die Untersuchung der Stoffwechselfparameter Glucose und Laktat Versuche im Wärmebad mit einer Dauer von nur 3 Stunden durchgeführt. Zum Ausschluß möglicher Störfaktoren durch Veränderungen von pH, $p\text{O}_2$ bzw. $p\text{CO}_2$ wurden unter den ‚Eckpfeilern‘ der Dosisstufen Versuche mit einer Dauer von 9 Stunden simuliert. Einen Überblick über Datenlage gibt die nachfolgende Tabelle:

Zelllinie:pA1 Messdauer	Anzahl der Versuche mit ...	
	0 μM DNP	100 μM DNP
3 h	6	6
9 h	12	12

Datenauswertung:

Von einer Unabhängigkeit der Daten wurde ausgegangen, da für jede Probe im Anschluss an die Messung die Zellzahl ermittelt wurde.

Spezifischer Glucoseverbrauch und die spezifische Laktatproduktion wurden jeweils in Abhängigkeit der Zellzahl dargestellt. Anschließend wurde auf Grundlage der ermittelten Regressionsgeraden für ausgewählte Zellzahlen der spezifische Glucoseverbrauch bzw. die spezifische Laktatproduktion in den zwei getesteten Dosisstufen verglichen.

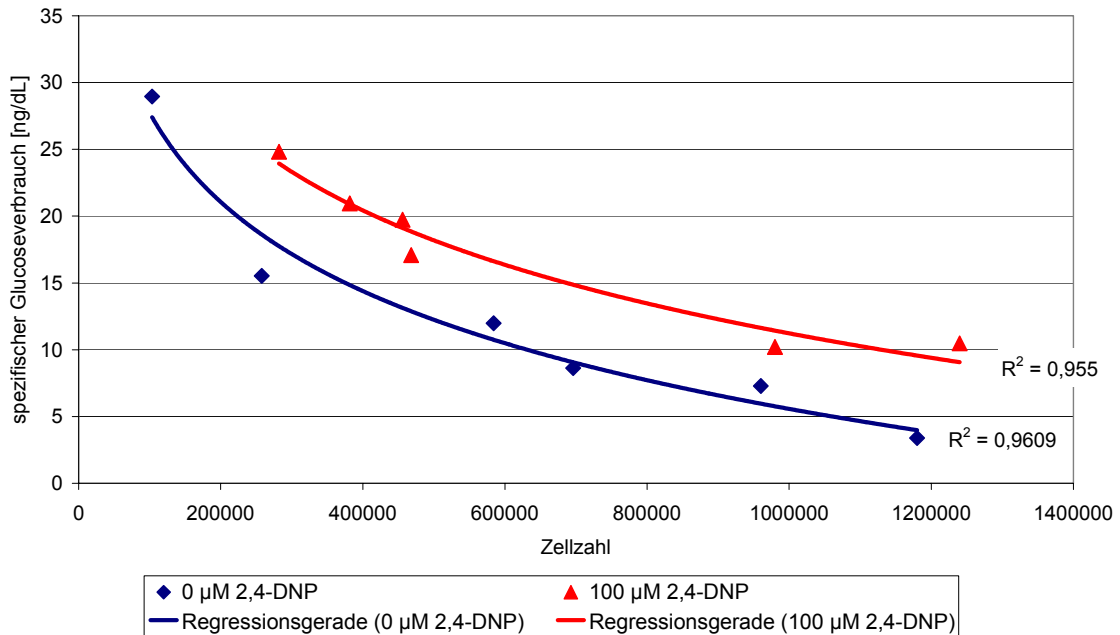
Ob ein signifikanter Unterschied von pH, $p\text{O}_2$ bzw. $p\text{CO}_2$ bei Verwendung der 100 μM 2,4-DNP Dosisstufe im Vergleich zur Nulldosis vorliegt, wurde wie folgt geprüft:

Die Mediane von pH, $p\text{O}_2$ bzw. $p\text{CO}_2$ der jeweiligen Versuchsreihen wurden berechnet und mittels Mann-Whitney-U-Test auf einen signifikanten Unterschied hin überprüft.

12.2. Ergebnisse

Untersuchung der Stoffwechselfparameter Glucose und Laktat

Die Regressionsanalyse der Daten ergab adäquate Korrelationen. Der spezifische Glucoseverbrauch ist mit 100 µM im Vergleich zur Nulldosis deutlich höher. Für drei ausgewählte Zellzahlen wurde der spezifische Glucose-Verbrauch unter 0 µM und 100 µM 2,4-DNP auf Grundlage der Regressionsgeraden berechnet.



Zellzahl	spezifischer Glucoseverbrauch	
	0 µM 2,4 DNP	100 µM 2,4 DNP
0.4 Mio	15 ng/dL	21 ng/dL d.h. + 42 %
0.6 Mio	11 ng/dL	16 ng/dL d.h. + 54 %
0.8 Mio	8 ng/dL	14 ng/dL d.h. + 73 %

Abbildung 69: Regressionsanalyse des spezifischen Glucoseverbrauchs

Der spezifische Glucoseverbrauch ist unter 100 µM 2,4-DNP im Vergleich zur Nulldosis deutlich erhöht. Die adäquaten Korrelationen ($R^2=0.9609$ für die unbehandelten Versuche sowie $R^2=0.955$ für die Versuche der Dosisstufe 100 µM 2,4-DNP) ermöglichen auf Grundlage der Regressionsgeraden die Berechnung des jeweiligen spezifischen Glucoseverbrauchs.

Die spezifischen Laktatproduktionen unterschieden sich nicht in den zwei getesteten Dosisstufen (siehe Abbildung 70).

Im Kapitel 10.3 wurde das Phänomen des crowding-Effekts beschrieben: mit steigender Zellzahl nahm die spezifische Wärmeproduktion ab. Wie in den Abbildungen zu erkennen ist, geht mit höheren Plättchendichten auch ein niedrigerer Verbrauch an Glucose bzw. eine niedrigere Produktion von Laktat einher.

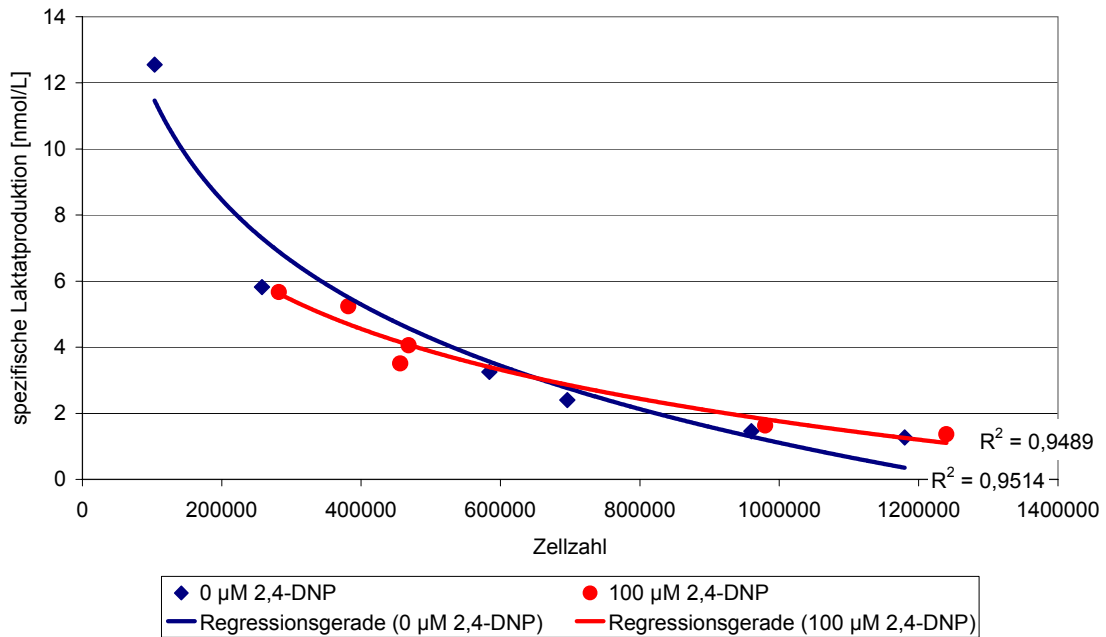


Abbildung 70: Regressionsanalyse der spezifischen Laktatproduktion

Die spezifische Laktatproduktion unterscheidet sich nicht zwischen den beiden Dosisstufen 0 µM und 100 µM 2,4-DNP.

Untersuchung von pH, pO₂ bzw. pCO₂

Auch unter 100 µM 2,4-DNP kommt es im Vergleich zur Nulldosis im Messzeitraum von 9 Stunden zu keiner Änderung des pH, pO₂ bzw. pCO₂.

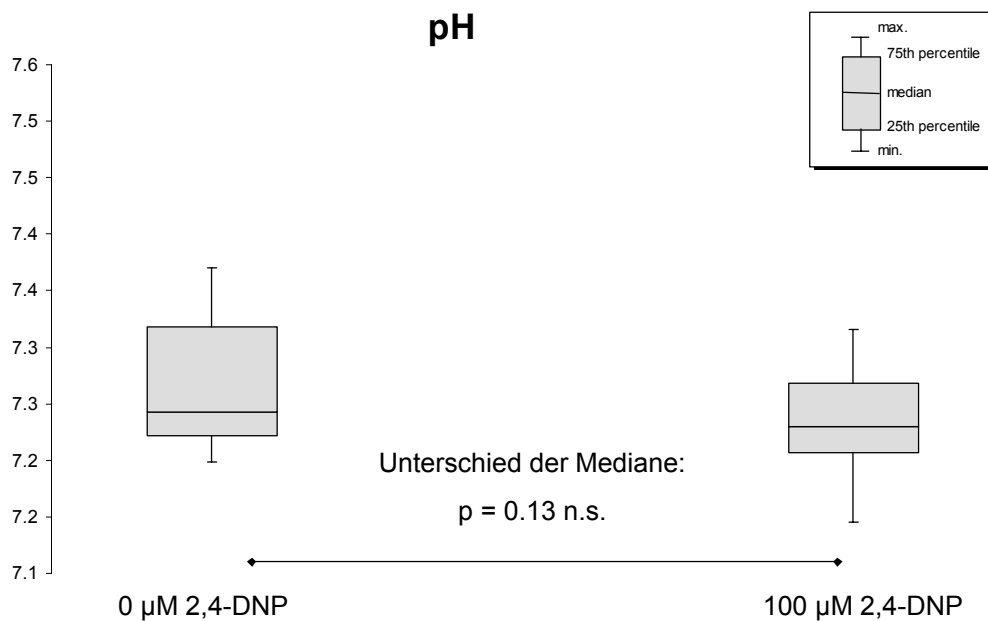


Abbildung 71: Vergleich der Mediane mittels Mann-Whitney-U-Test

Der pH unterscheidet sich nicht in den zwei getesteten Dosisstufen 0 µM und 100 µM 2,4-DNP.

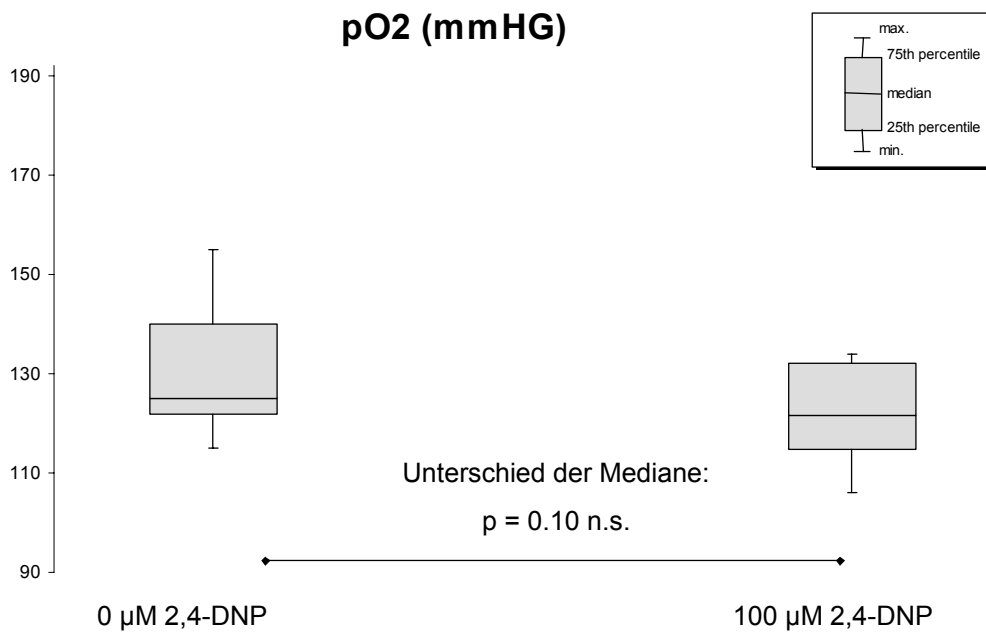


Abbildung 72: Vergleich der Mediane mittels Mann-Whitney-U-Test
Der pO₂ unterscheidet sich nicht in den zwei getesteten Dosisstufen 0 μM und 100 μM 2,4-DNP.

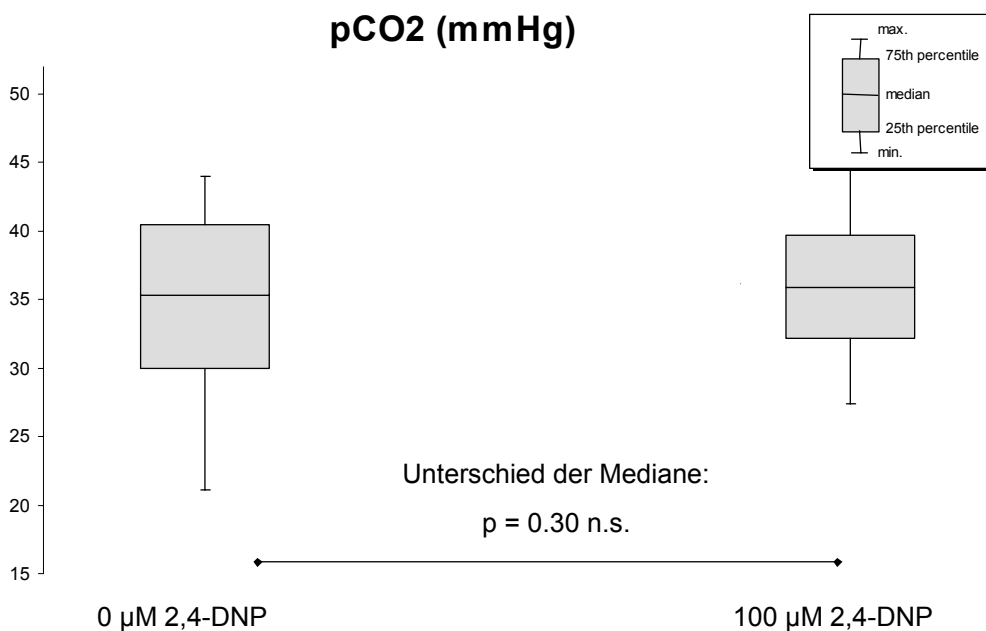


Abbildung 73: Vergleich der Mediane mittels Mann-Whitney-U-Test
Der pH unterscheidet sich nicht in den zwei getesteten Dosisstufen 0 μM und 100 μM 2,4-DNP.

12.3. Diskussion

Im Kapitel 10.3 wurde das Phänomen des crowding-Effekts beschrieben: mit steigender Zellzahl nahm die spezifische Wärmeproduktion ab. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass der spezifische Glucoseverbrauch bzw. die spezifische Laktatproduktion mit höheren Plättchendichten abnimmt (siehe Abbildungen 69 und 70). Folglich lässt sich auch beim Substratverbrauch bzw. der Substratproduktion ein crowding-Effekt beschreiben. Als Ursache für den crowding-Effekt wurde in Kapitel 10.3 u.a. eine Mediaumauszehrung diskutiert. Dies scheint allerdings angesichts der relativ hohen Restbestände an Glucose im Medium auch nach einer Messdauer von 9 Stunden unwahrscheinlich. Viel eher stützt die Beobachtung die These einer Substratlimitierung bedingt durch Diffusionsprobleme, die durch ungerührtes Medium um die Glasplättchen herum oder durch wider Erwarten dreidimensionales Wachstum auf den Plättchen entstehen.

Auf Grund der guten Korrelationen der Regressionsanalyse konnte das Steigerungspotential von 2,4-DNP auf den Glucoseverbrauch für drei ausgewählte Zellzahlen berechnet werden. Der um gut 50% gestiegene spezifische Glucoseverbrauch unter 100 μM 2,4-DNP weist auf den Wirkmechanismus des Entkopplers hin: der Zusammenbruch des Protonengradienten bedingt den Verlust der Atmungskontrolle. Folglich läuft der Substratverbrauch auf einem hohen Niveau.

Die Laktatproduktion hingegen zeigte keine Abhängigkeit von der 100 μM 2,4-DNP-Konzentration. Es ist daher davon auszugehen, dass die Wirkung von 2,4-DNP maßgeblich über den aeroben Stoffwechselweg generiert wird.

Da bei den Untersuchungen mit einem gepufferten Medium gearbeitet wurde, ist wie zu erwarten von keinem Einfluß des 2,4-DNP auf den pH des Mediums auszugehen. Der pH beträgt in beiden Dosisstufen nach 9 Stunden etwa 7,26.

Der O_2 bzw. pCO_2 Partialdruck im Medium zeigte auch nach 2,4-DNP Behandlung keine Veränderung. Somit scheint die Gasphase in den Ampullen im Verlauf der Messungen für ausreichend Nachschub während des gesteigerten Stoffwechselumsatzes zu sorgen.

13. Zusammenfassung

Krebs durch gezielte Zerstörung seiner Energien zu besiegen, ist einer von mehreren vielversprechenden neuen experimentellen Therapieansätzen, die insbesondere in den letzten Jahren in den Fokus des Interesses gerückt sind.

Das Forschungsprojekt *Investigation of representative tumor- and normal cell lines to estimate the influence of an uncoupling agent for the oxidative phosphorylation* versucht zu klären, inwiefern sich 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP), ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, für eine gezielte Störung des Energiehaushaltes von malignen Zellen eignet. 2,4-DNP führt zu einem Zusammenbruch des elektrochemischen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran und stört so die ATP-Produktion und damit die energieabhängigen Funktionen der Zelle. Entsprechend wird die über verschiedenen Stoffwechselwege verfügbar gemachte Energie nicht konserviert, sondern als Wärme frei. Es wird postuliert, dass Entkoppler im allgemeinen in malignen Zellen auf Grund des höheren Membranpotentials stärker angereichert werden als in benignen Zellen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, ein Modell zu entwickeln, mit dem die Wirkung von 2,4-DNP auf den Wärmehaushalt einer Vielzahl an benignen und malignen Zelllinien mit der Methode der Mikrokolorimetrie analysiert werden kann.

Nach zahlreichen Vorversuchen konnte schließlich ein adäquates Messsystem definiert werden, das den Anforderungen eines großen Stichprobenumfangs gerecht wurde: die zu untersuchenden Zellen wurden auf 200 mm² großen Glasplättchen als Monolayer kultiviert und in sonderangefertigten Stahllampullen in einem Mediumvolumen von 3.6 ml unter Verwendung eines geschlossenen Mikrokolorimetriesystems hinsichtlich ihrer Wärmeproduktion für eine Dauer von 9 Stunden untersucht. Störfaktoren wie insbesondere Mediumveränderungen oder Substratlimitierungen konnten durch ergänzende Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Die Vorversuche und erste Datenanalysen der Versuchsreihen mit der pA1-Zelllinie identifizierten einen unerwarteten Störfaktor: die Plättchendichten variierten trotz strikter Standardisierung bei der Kultivierung der Monolayer erheblich. Um diesen Störfaktor in den Datenanalysen zu berücksichtigen, wurde daher eine verlässliche und exakte Methode zur Ermittlung der Plättchendichten gesucht. 3 verschiedenen Methoden wurden hierfür auf ihre Eignung überprüft, bis schließlich der LDH-Test als adäquates Verfahren zur Bestimmung der Plättchendichten ausgewählt wurde.

Anschließend erfolgte ein Testdurchlauf mit 4 Zelllinien und 4 unterschiedlichen Dosisstufen 2,4-DNP (zuzüglich der Nulldosis). Nach Durchführung der ersten Versuchsreihen mit der pA1 Zelllinie konnte ein weiterer Störfaktor identifiziert werden: der ‚crowding-Effekt‘. Dieser beschreibt das Phänomen, dass mit zunehmender Zellzahl in einer Kultur die Stoffwechselrate und somit auch die Wärmeproduktion einer Zelle abnimmt. Der crowding-Effekt wurde im Rahmen mikrokalorimetrischer Arbeiten unter Verwendung offener Systeme und somit Zellsuspensionen mehrfach beschrieben und diskutiert. Die vorliegende Arbeit konnte einen crowding-Effekt nun auch für Monolayer nachweisen. Für die vorliegenden Daten konnte der Zusammenhang zwischen Wärmeproduktion und Zellzahl mittels Regressionsanalyse mit der mathematischen Funktion $\lg Y = -0.83 \lg X + 6.31$ bei einer Verlässlichkeit der Schätzung von $R^2 = 0.9003$ beschrieben werden. Als spezifische Ursachen für einen crowding-Effekt bei Monolayern wurden angenommen:

- Diffusionsprobleme bedingt durch ungerührtes Medium um die Plättchen herum,
- wider Erwarten dreidimensionales Wachstum auf den Plättchen, oder,
- Wachstumsinhibition durch Kontakthemmung der Zellen auf den Plättchen.

Der Störfaktor crowding-Effekt ist auf Grund seines dynamischen Charakters schwierig zu eliminieren. Dennoch konnten Möglichkeiten aufgezeigt werden, das Ausmaß des crowding-Effekts deutlich zu reduzieren, so dass das Modell optimiert werden konnte.

Der multivariate Charakter sowie der große Umfang der Daten stellte hohe Anforderungen an eine geeignete Methodik für eine Auswertung der Daten. Auf Erfahrungen anderer Arbeiten konnte nicht zurückgegriffen werden, da bis dato keine Arbeiten von solch großem Stichprobenumfang durchgeführt wurden. Einfache statistische Analysen stellten sich als nicht geeignet heraus. Mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Kennwert und dem Verfahren nach Wei und Lachin konnten jedoch schließlich zwei Instrumente für eine adäquate Datenanalytik bestimmt werden, die eine Datenanalyse im Sinne der Fragestellung des Projektes umfassend erlauben. Eine erste Auswertung der Daten des Testdurchlaufs zeigte, dass vor allem niedrigere Dosisstufen im Konzentrationsbereich bis 50 μM 2,4-DNP interessant sind.

Ergänzende Datenanalysen wiesen darauf hin, dass 2,4-DNP offenbar die Stoffwechselaktivität von Zellen unmittelbar nach Zugabe um einen bestimmten Betrag erhöht und diese dann auf diesem Niveau kontinuierlich für eine bestimmte Zeit anhält, bis schließlich ein Wirkmaximum erreicht wird, das von der Höhe der Dosis abhängt. Als Ursachen für die je nach Dosisstufe unterschiedlich lange Wirkung von 2,4-DNP wurden

verschiedene Ursachen diskutiert, die es weiter abzuklären gilt. Wahrscheinlich scheint jedoch eine Zytotoxizität höherer Dosierungen.

Für die ergänzende Untersuchungen von Stoffwechselfparametern im Medium wurde mit einem Wärmebad ein Modell etabliert, das es durch Simulation gleicher Bedingungen wie im Mikrokalorimeter erlaubt, Zusatzuntersuchungen unabhängig von der Mikrokalorimetrie und zudem in großem Umfang durchzuführen.

Durch die ergänzende Analytik bestimmter Stoffwechselfparameter gelang es, den crowding-Effekt auch für den spezifischen Glucose-Verbrauch nachzuweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass 2,4-DNP nicht nur durch Kurzschluss des Protonengradienten die Wärmeproduktion erhöht, sondern auch den Substratverbrauch der Zelle steigert: bei einer Konzentration von 100 μM 2,4-DNP erhöhte sich der spezifische Glucoseverbrauch um etwa 50%. Untersuchungen der Laktatproduktion ließen außerdem vermuten, dass die Stoffwechselsteigerung von 2,4-DNP eher oxidativ bedingt ist.

Durch die vorliegende Arbeit konnte erfolgreich ein geeignetes Messsystem für die mikrokalorimetrische Analyse einer Vielzahl an Zellen etabliert werden. Durch einen anschließenden Testdurchlauf mit 4 unterschiedlichen Zelllinien konnte zudem das System optimiert und eine adäquate Methodik für eine aussagekräftige Datenanalyse bestimmt werden. Es steht somit ein Modell zur Verfügung, mit dem die Wärmeproduktion einer Vielzahl an Zelllinien auf die Wirkung von 2,4-DNP, aber auch von anderen Substanzen, untersucht werden kann, was schließlich die Bestimmung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermöglicht.

Literaturverzeichnis

1. Lee, H. C. & Wei, Y. H. Mitochondrial role in life and death of the cell. *J. Biomed. Sci.* **7**, 2-15 (2000).
2. Skulachev, V. P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol. Aspects Med.* **20**, 139-184 (1999).
3. Coy, J. F., Dressler, D., Wilde, J. & Schubert, P. Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clin. Lab* **51**, 257-273 (2005).
4. Dias, N. & Bailly, C. Drugs targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. *Biochem Pharmacol.* **70**, 1-12 (2005).
5. Fantin, V. R. & Leder, P. F16, a mitochondriotoxic compound, triggers apoptosis or necrosis depending on the genetic background of the target carcinoma cell. *Cancer Res.* **64**, 329-336 (2004).
6. Koya, K. *et al.* MKT-077, a novel rhodacyanine dye in clinical trials, exhibits anticarcinoma activity in preclinical studies based on selective mitochondrial accumulation. *Cancer Res.* **56**, 538-543 (1996).
7. Modica-Napolitano, J. S. *et al.* Selective damage to carcinoma mitochondria by the rhodacyanine MKT-077. *Cancer Res.* **56**, 544-550 (1996).
8. Wallace, K. B. & Starkov, A. A. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 353-388 (2000).
9. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* **4**, 891-899 (2004).
10. Garber, K. Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 1805-1806 (2004).
11. Hamilton, E., Fennell, M. & Stafford, D. M. Modification of tumour glucose metabolism for therapeutic benefit. *Acta Oncol.* **34**, 429-433 (1995).
12. Martin, D. S., Bertino, J. R. & Koutcher, J. A. ATP depletion + pyrimidine depletion can markedly enhance cancer therapy: fresh insight for a new approach. *Cancer Res.* **60**, 6776-6783 (2000).
13. Martin, D. S., Spriggs, D. & Koutcher, J. A. A concomitant ATP-depleting strategy markedly enhances anticancer agent activity. *Apoptosis.* **6**, 125-131 (2001).
14. Löffler, G. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin, (2002).
15. Skulachev, V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1363**, 100-124 (1998).
16. Palmieri, F. & Corbisier, P. *Progress in Cell Research*. Elsevier Science, (1995).
17. Linsinger, G., Wilhelm, S., Wagner, H. & Hacker, G. Uncouplers of oxidative phosphorylation can enhance a Fas death signal. *Mol. Cell Biol.* **19**, 3299-3311 (1999).

18. Vier, J., Gerhard, M., Wagner, H. & Hacker, G. Enhancement of death-receptor induced caspase-8-activation in the death-inducing signalling complex by uncoupling of oxidative phosphorylation. *Mol. Immunol.* **40**, 661-670 (2004).
19. Hildebrandt, B. *et al.* The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **43**, 33-56 (2002).
20. Wust, P. *et al.* Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* **3**, 487-497 (2002).
21. van der, Z. J. Heating the patient: a promising approach? *Ann. Oncol.* **13**, 1173-1184 (2002).
22. Bottcher, H. & Furst, P. Direct microcalorimetry as a technique in cell cultures. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab* **11**, 739-752 (1997).
23. Instruction Manual *LKB 2277 BioActivity Monitor 90 01 2963*. LKB-Produkte AB Stockholm, (1995).
24. Stryer, L. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, (2003).
25. Nassberger, L., Jensen, E., Monti, M. & Floren, C. H. Microcalorimetric investigation of metabolism in rat hepatocytes cultured on microplates and in cell suspensions. *Biochim. Biophys. Acta* **882**, 353-358 (1986).
26. Asakawa, H., Nassberger, L. & Monti, M. Microcalorimetric studies on metabolism of hepatic tissue. I. A methodological study of normal tissue. *Res. Exp. Med. (Berl)* **190**, 25-32 (1990).
27. Kallerhoff, M. *et al.* Microcalorimetric measurements carried out on isolated tumorous and nontumorous tissue samples from organs in the urogenital tract in comparison to histological and impulse-cytophotometric investigations. *Urol. Res.* **24**, 83-91 (1996).
28. Monti, M., Brandt, L., Ikomi-Kumm, J. & Olsson, H. Microcalorimetric investigation of cell metabolism in tumour cells from patients with non-Hodgkin lymphoma (NHL). *Scand. J. Haematol.* **36**, 353-357 (1986).
29. Schon, A. & Wadso, I. The potential use of microcalorimetry in predictive tests of the action of antineoplastic drugs on mammalian cells. *Cytobios* **55**, 33-39 (1988).
30. Kimura, T., Schon, A. & Wadso, I. Prediction of the cytotoxic effects of some antineoplastic drugs on cultured T-lymphoma cells by microcalorimetry. *Cytobios* **63**, 7-13 (1990).
31. Roig, T. & Bermudez, J. Microcalorimetric evaluation of the effect of combined chemotherapeutic drugs. *Biochim. Biophys. Acta* **1244**, 283-290 (1995).
32. Bermudez, J., Backman, P. & Schon, A. Microcalorimetric evaluation of the effects of methotrexate and 6-thioguanine on sensitive T-lymphoma cells and on a methotrexate-resistant subline. *Cell Biophys.* **20**, 111-123 (1992).
33. Borrebaeck, C. A. & Schon, A. Antiproliferative response of human leukemic cells: lectin induced inhibition of DNA synthesis and cellular metabolism. *Cancer Res.* **47**, 4345-4350 (1987).

34. Ito, E., Sakihama, H., Toyama, K. & Matsui, K. Effects of 2,4-dinitrophenol and other metabolic inhibitors on the thermograms of Ehrlich ascites carcinoma cells registered with a microcalorimeter. *Cancer Res.* **44**, 1985-1990 (1984).
35. Backman, P., Kimura, T., Schon, A. & Wadso, I. Effects of pH-variations on the kinetics of growth and energy metabolism in cultured T-lymphoma cells: a microcalorimetric study. *J. Cell Physiol* **150**, 99-103 (1992).
36. Lonnbro, P. & Wadso, I. Effect of dimethyl sulphoxide and some antibiotics on cultured human T-lymphoma cells as measured by microcalorimetry. *J. Biochem. Biophys. Methods* **22**, 331-336 (1991).
37. Hanstein, W. G. Uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **456**, 129-148 (1976).
38. Schmidt, R. F. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Springer, Berlin, (2004).
39. Jacob, M., Bjarnason, I., Rafi, S., Wrigglesworth, J. & Simpson, R. J. A study of the effects of indometacin on liver mitochondria from rats, mice and humans. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15**, 1837-1842 (2001).
40. Diehl, A. M. & Hoek, J. B. Mitochondrial uncoupling: role of uncoupling protein anion carriers and relationship to thermogenesis and weight control "the benefits of losing control". *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 493-506 (1999).
41. Wilson, D. F., Ting, H. P. & Koppelman, M. S. Mechanism of action of uncouplers of oxidative phosphorylation. *Biochemistry* **10**, 2897-2902 (1971).
42. Lowell, B. B. & Spiegelman, B. M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* **404**, 652-660 (2000).
43. Echtay, K. S. *et al.* Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**, 96-99 (2002).
44. Stuart, J. A., Brindle, K. M., Harper, J. A. & Brand, M. D. Mitochondrial proton leak and the uncoupling proteins. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 517-525 (1999).
45. U.S.Environmental Protection Agency *Integrated Risk Information System (IRIS) on 2,4-Dinitrophenol*. (1993).
46. McFee, R. B., Caraccio, T. R., McGuigan, M. A., Reynolds, S. A. & Bellanger, P. Dying to be thin: a dinitrophenol related fatality. *Vet. Hum. Toxicol.* **46**, 251-254 (2004).
47. The Merck Index *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. (1989).
48. U.S.Department of Health and Human Services *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS, online database)*. (1993).
49. U.S.Department of Health and Human Services *Hazardous Substances Databank (HSDB, online database)*. (1993).
50. Jucker, B. M. *et al.* Assessment of mitochondrial energy coupling in vivo by ¹³C/³¹P NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 6880-6884 (2000).

51. Takahashi, K. L., Aoyama, H., Kawashima, K. & Teramoto, S. Effects of dinoseb, 4,6-dinitro-o-cresol, and 2,4-dinitrophenol on rat Sertoli-germ cell co-cultures. *Reprod. Toxicol.* **17**, 247-252 (2003).
52. U.S.Environmental Protection Agency *Technical Background Document to Support Rulemaking Pursuant to the Clean-Air Act-Section 112 (g). Ranking of Pollutants with Respect to Hazard to Human Health.* (1994).
53. Terada, H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ. Health Perspect.* **87**, 213-218 (1990).
54. Leverage, X. *et al.* Oxidative phosphorylation in intact hepatocytes: quantitative characterization of the mechanisms of change in efficiency and cellular consequences. *Mol. Cell Biochem.* **184**, 53-65 (1998).
55. Leverage, X. M. & Fontaine, E. Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. *IUBMB. Life* **52**, 221-229 (2001).
56. Sibille, B. *et al.* 2,4 Dinitrophenol-uncoupling effect on delta psi in living hepatocytes depends on reducing-equivalent supply. *Cytometry* **32**, 102-108 (1998).
57. Sibille, B. *et al.* The mitochondrial consequences of uncoupling intact cells depend on the nature of the exogenous substrate. *Biochem. J.* **355**, 231-235 (2001).
58. Moss, A. J., Jr., Dalrymple, G. V., Sanders, J. L., Wilkinson, K. P. & Nash, J. C. Dinitrophenol inhibits the rejoining of radiation-induced DNA breaks by L-cells. *Biophys. J.* **11**, 158-174 (1971).
59. Nishizawa, K., Sato, C. & Morita, T. Alterations in the survival of X-irradiated cells by 2,4-dinitrophenol depending on ATP deprivation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat Stud. Phys. Chem. Med.* **35**, 15-22 (1979).
60. Andres, M. I., Repetto, G., Sanz, P. & Repetto, M. Comparative effects of the metabolic inhibitors 2,4-dinitrophenol and iodoacetate on mouse neuroblastoma cells in vitro. *Toxicology* **110**, 123-132 (1996).
61. Knowles, A. F. Differential effects of 2,4-dinitrophenol and valinomycin (+ K+) on uncoupler-stimulated ATPase of human tumor mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **681**, 62-71 (1982).
62. Ganote, C. E., Grinwald, P. M. & Nayler, W. G. 2,4-Dinitrophenol (DNP)-induced injury in calcium-free hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.* **16**, 547-557 (1984).
63. Kristensen, S. R. A critical appraisal of the association between energy charge and cell damage. *Biochim. Biophys. Acta* **1012**, 272-278 (1989).
64. Decaudin, D. *et al.* Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res.* **57**, 62-67 (1997).
65. Argiles, J. M. & zcon-Bieto, J. The metabolic environment of cancer. *Mol. Cell Biochem.* **81**, 3-17 (1988).
66. Argiles, J. M. & Lopez-Soriano, F. J. Why do cancer cells have such a high glycolytic rate? *Med. Hypotheses* **32**, 151-155 (1990).

67. Jaros P. & Willig A. *Regulatoren des Wachstums und des Zellstoffwechsels*. BIS-Verlag, Universität Oldenburg, (1991).
68. Mazurek, S., Boschek, C. B. & Eigenbrodt, E. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 315-330 (1997).
69. Warburg O., Posener K. & Negelein E. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem Z* **152**, 309-344 (1924).
70. Baggetto, L. G. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie* **74**, 959-974 (1992).
71. Newsholme, E. A., Crabtree, B. & Ardawi, M. S. The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Biosci. Rep.* **5**, 393-400 (1985).
72. Golshani-Hebroni, S. G. & Bessman, S. P. Hexokinase binding to mitochondria: a basis for proliferative energy metabolism. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 331-338 (1997).
73. Capuano, F., Guerrieri, F. & Papa, S. Oxidative phosphorylation enzymes in normal and neoplastic cell growth. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 379-384 (1997).
74. Greiner, E. F., Guppy, M. & Brand, K. Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production. *J. Biol. Chem.* **269**, 31484-31490 (1994).
75. Brand, K. A. & Hermfisse, U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J.* **11**, 388-395 (1997).
76. Mates, J. M., Perez-Gomez, C., Nunez, d. C., I, Asenjo, M. & Marquez, J. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 439-458 (2002).
77. Guppy, M., Leedman, P., Zu, X. & Russell, V. Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem. J.* **364**, 309-315 (2002).
78. Kondo, S. Phosphorylation in mitochondria from melanotic melanoma. *Arch. Dermatol.* **107**, 583-586 (1973).
79. Knowles, A. F. & Kaplan, N. O. Oxidative phosphorylation and ATPase activities of human tumor mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **590**, 170-181 (1980).
80. Bernal, S. D., Lampidis, T. J., Mclsaac, R. M. & Chen, L. B. Anticarcinoma activity in vivo of rhodamine 123, a mitochondrial-specific dye. *Science* **222**, 169-172 (1983).
81. Modica-Napolitano, J. S. & Aprille, J. R. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **49**, 63-70 (2001).
82. Dorward, A., Sweet, S., Moorehead, R. & Singh, G. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: redox balance, cell cycle, and drug resistance. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 385-392 (1997).
83. Modica-Napolitano, J. S., Nalbandian, R., Kidd, M. E., Nalbandian, A. & Nguyen, C. C. The selective in vitro cytotoxicity of carcinoma cells by AZT is enhanced by

- concurrent treatment with delocalized lipophilic cations. *Cancer Lett.* **198**, 59-68 (2003).
84. Weisberg, E. L., Koya, K., Modica-Napolitano, J., Li, Y. & Chen, L. B. In vivo administration of MKT-077 causes partial yet reversible impairment of mitochondrial function. *Cancer Res.* **56**, 551-555 (1996).
 85. Wadhwa, R. *et al.* Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function. *Cancer Res.* **60**, 6818-6821 (2000).
 86. Nieminen, A. L., Saylor, A. K., Herman, B. & Lemasters, J. J. ATP depletion rather than mitochondrial depolarization mediates hepatocyte killing after metabolic inhibition. *Am. J. Physiol* **267**, C67-C74 (1994).
 87. Sweet, S. & Singh, G. Accumulation of human promyelocytic leukemic (HL-60) cells at two energetic cell cycle checkpoints. *Cancer Res.* **55**, 5164-5167 (1995).
 88. Eguchi, Y., Shimizu, S. & Tsujimoto, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* **57**, 1835-1840 (1997).
 89. Petronini, P. G., Urbani, S., Alfieri, R., Borghetti, A. F. & Guidotti, G. G. Cell susceptibility to apoptosis by glutamine deprivation and rescue: survival and apoptotic death in cultured lymphoma-leukemia cell lines. *J. Cell Physiol* **169**, 175-185 (1996).
 90. Burd, R. *et al.* Absence of Crabtree effect in human melanoma cells adapted to growth at low pH: reversal by respiratory inhibitors. *Cancer Res.* **61**, 5630-5635 (2001).
 91. Preston, T. J., Abadi, A., Wilson, L. & Singh, G. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **49**, 45-61 (2001).
 92. Alvarez, S. A. *et al.* Phase I/II trial of intravenous Doxil and whole abdomen hyperthermia in patients with refractory ovarian cancer. *Int. J. Hyperthermia* **21**, 333-347 (2005).
 93. Mattson, M. P., Zhang, Y. & Bose, S. Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis, and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose. *Exp. Neurol.* **121**, 1-13 (1993).
 94. Thoren, S. A., Suurkuusk, J. & Holma, B. Operation of a multichannel microcalorimetry system in the micro-submicrowatt region: some methodological aspects. *J. Biochem. Biophys. Methods* **18**, 149-156 (1989).
 95. Sachs, L. *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden.* Springer, Heidelberg (1992).
 96. Bortz J. *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler.* Springer, Berlin (2004).
 97. Bortz J. *Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik.* Springer, Berlin (2000).
 98. Wei, L. J. a. L. J. M. Two-sample Asymptotically Distribution-free Tests for Incomplete Multivariate Observations. *J. Amer. Statist. Assoc.* **79**, 653-661 (2005).

99. Esmann V. Effect of cell concentration on the metabolism of normal and diabetic leucocytes in vitro. *Metabolism* **13**, 354-360 (1964).
100. Gebreselassie, D. & Schon, A. Energy metabolism of non-transformed and benzyrene-transformed 3T3 cells: a microcalorimetric study. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 211-214 (1993).
101. Schon, A. & Wadso, I. Thermochemical characterization of T-lymphoma cells under non-growing conditions. *Cytobios* **48**, 195-205 (1986).
102. Singer, D. & Kuhn H.-J. Size effects on metabolic rate in cell, tissue, and body calorimetry. *Thermochemica Acta* 227-240 (1995).
103. Kemp, R. B. & Gnaiger, E. *Energy transformation in Cells and Organisms*. Wieser, W. & Gnaiger, E. (eds.), pp. 91-97 (Thieme, Stuttgart, 1989).
104. Medina, M. A. Glutamine and cancer. *J. Nutr.* **131**, 2539S-2542S (2001).

Lebenslauf

Name

Falk Alexander Gonnert

Geburtsdatum, -ort
Familienstand
Konfession26. Februar 1977 in Würzburg
Ledig
Katholisch

Adresse

Rathenaustrasse 5 in 07745 Jena

Eltern

Esther Gonnert, geb. Giebfried,
Lehrerin
Siegfried Gonnert, Dr.phil., Dipl.-Psych.,
Akademischer Direktor Lehrstuhl für Schulpädagogik,
Universität Würzburg**Berufstätigkeit**

seit 01.12.2005

Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie
(Direktor: Prof. Dr. Reinhart), Friedrich-Schiller-Universität Jena**Akademische Ausbildung**

Studium

1998-2005 Studium der Humanmedizin an der Privaten Universität
Witten / Herdecke (Reformstudiengang)

Approbation als Arzt: 06/2005

3. Staatsexamen: 04/2005

2. Staatsexamen: 04/2004

1. Staatsexamen: 04/2001

Ärztliche Vorprüfung: 04/2000

Wissenschaftliche Ausbildung

Promotion

2001-2005 Doktorand an der Universitäts-Frauenklinik Würzburg,
Direktor: Prof. Dr. Dietl, im Rahmen des
Forschungsprojekts *„Investigation of representative
tumor- and normal cell lines to estimate the influence
of an uncoupling agent for the oxidative
phosphorylation“*. Vollzeit 11/2001 bis 08/2002 sowie
05-09/2005.**Aus- und Schulbildung**Ausbildung
...Die Johanniter
...KV / LV Bayern1997 Abschlussprüfung zum Rettungssanitäter (09/1997)
1993-1996 Rettungshelfer (08/1996), Ausbilder (07/1996) und
Sanitätshelfer (11/1993)

Schulen

1996 Abitur (Mathematik, Französisch, Ethik, Sozialkunde)
1987 Matthias-Grünwald-Gymnasium Würzburg
1983 Volks- und Teilhauptschule Versbach

Sprachkenntnisse

Englisch: in Wort und Schrift verhandlungssicher
Russisch, Französisch: Grundkenntnisse

Praxiserfahrungen und ehrenamtliche Engagements

Praktisches Jahr	2005-2004	Gynäkologie und Geburtshilfe: 03/2005 – 11/2004 Universitätsfrauenklinik am Marienhospital Witten Direktor: Prof. Dr. Hatzmann Innere Medizin: 11/2004 – 07/2004 Case Western Reserve University, Cleveland, USA Direktor: Prof. Dr. Connors Chirurgie: 07/2004 – 04/2004 EVK Schwerte, Kooperierende Klinik Universität Witten Direktor: Prof. Dr. Labitzke
Famulaturen	10/2002	Interdisziplinäre Famulatur, Medizinische Fakultät der Universität Tomsk, Sibirien
	06/2002	Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Schmelzer, Witten
	01/2001	Universitätsklinik für Neurologie, Helios-Klinikum Wuppertal, Prof. Dr. Jörg
	08/2000	Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Mainklinik Ochsenfurt, CA Dr. Göpfert
Ferien- und Semester- ...tätigkeit	1999-2001	Freier Mitarbeiter bei Science Capital GmbH Unternehmensberatung Freigericht, Mitarbeit bei Projekten im Bereich Schnittstelle Medizin – Ökonomie
Pflegepraktika	03/1997 10-12/1997	Anästhesie, Intensivmedizin, Innere Medizin, Mainklinik Ochsenfurt
Zivildienst	1996-1997	Zivildienstleistender im Bereich Rettungsdienst Die Johanniter, KV Würzburg (08/1996 – 08/1997)
Die Johanniter		Seit 1995 Mitglied; bis 2001 aktives Engagement in den Bereichen Rettungsdienst und Breitenausbildung
Student ...Leadership e.V.		1994 bis 1998 Mitglied, 1995-1997 aktives Engagement im Bereich Organisation und inhaltliche Ausrichtung
Pfarrjugend Versbach		Seit 1986 Mitglied; bis 1999 aktives Engagement in der Jugendarbeit, u.a. als Jugendgruppenleiter

Extracurriculare Aktivitäten

Weiterbildung in TCM	2003	<p>Beginn einer Zusatzausbildung in Traditionell Chinesischer Medizin (TCM) und Akupunktur an der Universität Witten/Herdecke unter Leitung von Dr. Stefan Kirchhoff</p> <p>A-Diplom: voraussichtlich Oktober 2005</p>
Lehrtätigkeit	2003	<p>Lehrauftrag als studentischer Tutor an der Universität Witten/Herdecke für Problem-orientiertes-Lernen-Seminar sowie Gynäkologischen Untersuchungskurs</p>
Studentische ...Initiative „Go East!“	2002	<p>Mitbegründer der studentischen Initiative ‚Go East!‘ für einen Austausch zwischen den Medizinischen Fakultäten Tomsk und Witten</p> <p>Kulturelle Projektarbeit „Auf der Spur der Russland-deutschen: Aspekte aus Vergangenheit und Gegenwart“ im Rahmen des Russlandaustausches, gefördert von der Peter und Ruth Wirts-Stiftung</p> <p>Dreimonatiger Aufenthalt in Russland mit Sprachkurs sowie Famulatur an der Medizinischen Fakultät der Universität Tomsk, Sibirien, gefördert durch ein Auslands- und Sprachkursstipendiums des DAAD sowie durch die Universitätsgesellschaft Witten</p>
Weiterbildung ...Wirtschaftswissenschaften, Schwerpunkt Gesundheitsökonomie	2003	<p>Hausarbeit „Diskontierung von Zukunftseffekten in der Gesundheitsökonomie“ am Lehrstuhl für Gesundheitspolitik und -management, Prof. Dr. Dr. Koeck</p>
	2000	<p>Hausarbeit „Die Ästhetik der Arztpraxis und ihr ökonomisches Potential“, Hausarbeit im Rahmen des Studium fundamentale am Lehrstuhl für Kunstvermittlung und Ästhetik, Prof. Dr. Bockemühl</p>
	1998-2000	<p>Belegung wirtschaftswissenschaftlicher Kurse und Vorlesungen an der Fern-Universität Hagen und der Universität Witten/Herdecke</p>
	1998-1999	<p>Mitarbeit an der Publikation „Geschäftsbericht Deutschland AG“ von Ederer und Schuller, erschienen 1999 im Schäffer-Poeschel Verlag Stuttgart</p>

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Wissenschaftliche
...Vorträge

A Microcalorimetric Analysis of 2,3-Dinitrophenol Induced Heat Production in Adherent PA-1 Human Ovarian Cancer Cells
U. Kämmerer, F.A. Gonnert, M. Kapp, D. Singer
XIIIth Conference of The International Society for Biological Calorimetry (ISBC), Würzburg, 27.09.-01.10.2003

Etablierung eines Messsystems zur Analyse der Wärmeproduktion von adhären wachsenden Zellen
F.A. Gonnert, D. Singer, M. Kapp, J. Dietl, U. Kämmerer
15. Ulm-Freiberger Kalorimetrietage, Freiberg/Sa., 19.-21.03.2003

Mikrokalorimetrische Untersuchungen zur Entkopplerwirkung auf benigne und maligne Zellkulturen
D. Singer, U. Kämmerer, F.A. Gonnert, M. Kapp
15. Ulm-Freiberger Kalorimetrietage, Freiberg/Sa., 19.-21.03.2003

Mikrokalorimetrische Analyse des Energiestoffwechsels von Tumorzellen
F.A. Gonnert, D. Singer, M. Kapp, J. Dietl, U. Kämmerer
4. Bayerischer Gynäkologentag, Bad Wörishofen, 30.05.-01.06.2002

Wissenschaftliches
...Poster

Evidence of a „crowding effect“ in batch microcalorimetry of human cell monolayers
Falk A. Gonnert, Ulrike Kämmerer, Michaela Kapp, Dominique Singer
XIIIth Conference of The International Society for Biological Calorimetry (ISBC), Würzburg, 27.09.-01.10.2003

Publikation

Establishment of a microcalorimetry system allowing high-throughput analysis of a dose-dependent influence of chemotherapeutics on a variety of human cell-lines
Falk A. Gonnert, Ulrike Kämmerer, Michaela Kapp, Dominique Singer
In Vorbereitung

Falk A. Gonnert
Rathenaustrasse 5
07745 Jena

Telefon:
03641-330583
e-mail:
Falk.Gonnert@uni-wh.de

Jena, den 31. Januar 2007