

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Achim Wöckel

Sensitivität von benignen und malignen Zellen gegenüber dem
mitochondrialen Entkoppler 2,4-Dinitrophenol, gemessen mittels
Mikrokalorimetrie und LDH-Aktivität

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Nicole Palm

aus Brakel

Würzburg, November 2022



Referentin: Apl. Prof. Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer

Korreferentin: Univ. Prof. Dr. med. Michaela Kuhn

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

In Dankbarkeit gewidmet meinen Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1 Ansätze der aktuellen Tumorthherapie und ihre Grenzen	1
1.2 Physiologie der Mitochondrien und Atmungskette	2
1.2.1 Einordnung in die biologische Oxidation	2
1.2.2 Ablauf der oxidativen Phosphorylierung	5
1.2.3 Physiologische Entkopplung	9
1.2.4 Entkopplung durch 2,4-DNP	11
1.3 2,4-Dinitrophenol	12
1.3.1 Historie	12
1.3.2 Vorkommen und Verwendung	13
1.3.3 Toxikologiebericht	13
1.4 Stoffwechsel von Tumorzellen	16
1.5 Methode der Mikrokolorimetrie	19
1.6 Fragestellung der Arbeit	21

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material	22
2.1.1 Verwendete Zelllinien	22
2.1.2 Geräte	23
2.1.2.1 Geräte für Zellkultur	23
2.1.2.2 Geräte für Mikrokolorimetrie	23
2.1.3 Reagenzien	24
2.1.4 Zubehör und Verbrauchsmaterial	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Zellkultur	25
2.2.2 Versuchsansätze mit DNP	25
2.2.3 LDH-Test	27
2.2.4 Mikrokolorimetrie	29
2.2.4.1 Vorbereiten der Zellen für die Messung	29
2.2.4.2 Messungen im Mikrokolorimeter	30
2.3 Auswertung und Statistik	30

3. ERGEBNISSE	
3.1 Zytotoxizitätsanalyse	31
3.1.1 Zytotoxizität von DNP für PA-1 Zellen	32
3.1.2 Zytotoxizität von DNP für Keratinozyten	33
3.1.3 Zytotoxizität von DNP für BT-20 Zellen	34
3.1.4 Zytotoxizität von DNP für MDA-MB 231 Zellen	35
3.1.5 Vergleich aller Zelllinien	37
3.1.6 ICD50 aller Zelllinien bei 48h	40
3.2 Mikrokolorimetrie	43
3.2.1 BT-20	43
3.2.2 MDA-MB231	45
3.2.3 HACAT	47
3.2.4 Vergleich aller Zelllinien	48
4. DISKUSSION	
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	49
4.2 Unterschiedliche Wirkung von 2,4-DNP auf benigne und maligne Zellen	51
4.3 Mögliche Perspektiven von 2,4-DNP in der onkologischen Therapie	55
5. ZUSAMMENFASSUNG	57
6. LITERATURVERZEICHNIS	58
APPENDIX	
I Abkürzungsverzeichnis	
II Abbildungsverzeichnis	
III Tabellenverzeichnis	
IV Danksagung	
V Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

1.1 Ansätze der aktuellen Tumorthherapie und ihre Grenzen

Die absolute Zahl der bösartigen Neuerkrankungen ist seit Anfang der 1970er Jahre in Deutschland nahezu um das Doppelte gestiegen. Aufgrund des demografischen Wandels wird diese Tendenz auch langfristig deutlich zunehmen, da das Erkrankungsrisiko für fast alle Tumorarten mit zunehmendem Alter ansteigt.

Die Zahl der jährlich auftretenden und vom Zentrum für Krebsregister erfassten malignen Neuerkrankungen in Deutschland (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs), betrug in 2016 bei Frauen 229.900 und bei Männern 252.600 (33). Bei den Frauen am häufigsten erkrankt war mit einer Inzidenz von 71.640 das Brustgewebe, wobei die bösartigen Tumoren hier ihren Entstehungsort v.a. im Drüsengewebe haben, insbesondere in den duktaalen Strukturen, seltener in den lobulären. Männer sind dabei in 1% der Fälle betroffen.

Neben einer genetischen Disposition und steigendem Lebensalter ist als Risikofaktor vor allem eine Änderung des Lebensstiles zu nennen. Der Anteil der kinderlosen Frauen steigt, ebenso das Alter bei der ersten Geburt. Falsche Ernährungsgewohnheiten, Bewegungsmangel mit konsekutivem Übergewicht und Metabolischem Syndrom, erhöhter Tabak- und Alkoholkonsum fördern die Entstehung eines Mammakarzinoms ebenso wie der Einsatz hormoneller Schwangerschaftsverhütung und Hormonersatztherapien über einen längeren Zeitraum, insbesondere bei Verwendung eines Kombinationspräparates von Östrogen und Progesteron.

Obwohl seit 1999 eine steigende Inzidenzrate des Mammakarzinoms zu beobachten ist, sinkt die Sterblichkeit bei den unter 70-jährigen unter dem Fortschritt der onkologischen Medizin bei gleichzeitigem Ausbau der Primär- und Sekundärprävention deutlich (33).

Leider erlaubt der bisherige Wissensstand nur bei einem Teil der häufigeren Tumorarten erfolgreiche Krebsfrüherkennungsmaßnahmen. Die Therapieoptionen sind je nach Patientenalter, Zeitpunkt der Diagnosestellung, Art des Tumorgewebes und der Begleitumstände mehr oder weniger ausgeschöpft. Neben konventionellen Behandlungsmethoden, welche die Operation, Bestrahlung und Chemotherapie

umfassen, kommen inzwischen standardmäßig die Immunmodulation durch Zytokin- und Antikörpergabe, sowie die Hormontherapie zum Einsatz.

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts war Otto Warburg auf der Suche nach neuen Ansatzpunkten in der Tumorthherapie (40). Er stellte dabei die Hypothese auf, dass die Ursache der Krebsentstehung vor allem auf einen Defekt des Energiemetabolismus der Zelle zurückzuführen sei. In der Zwischenzeit ist das Wissen um Mutationen, Onkogene, Tumorsuppressorgene etc. um ein Vielfaches gewachsen. Dennoch spielen Warburgs Beobachtungen über das Apoptoseverhalten und die Rolle des Energiestoffwechsels hinsichtlich der Zellentartung und als Ansatz möglicher Therapieformen eine große Rolle, stellen sie doch die Mitochondrien als Kraftwerke der Zellen in den Mittelpunkt.

1.2 Physiologie der Mitochondrien und Atmungskette

1.2.1 Einordnung in die biologische Oxidation

Die Aufrechterhaltung der Funktion und Struktur aller Lebensformen ist abhängig von einer kontinuierlichen Energiezufuhr. Die einzelne Zelle gewinnt die benötigte Energie unter Normalbedingungen vorrangig durch den oxidativen Abbau der Nährstoffe. Herrschen anaeroben Bedingungen vor, so kann die benötigte Energie jedoch nur durch die Glykolyse erzeugt werden. Im Vergleich zum aeroben Stoffwechsel muss die Zelle zur Gewinnung äquivalenter Energiemengen hierbei ca. 15 x mehr Glukose umsetzen.

In dem aeroben Stoffwechsel, der sogenannten Zellatmung, werden sowohl Amino- und Fettsäuren als auch Kohlenhydrate mit Hilfe von elementarem Sauerstoff zu CO_2 und H_2O oxidiert (biologische Oxidation). Dadurch wird ATP als Energielieferant für zahlreiche Zellfunktionen gewonnen. Ort der biologischen Oxidation, welche sich in Citratzyklus und Atmungskette gliedert, sind die Mitochondrien, weshalb sie oft auch als Kraftwerke der Zelle bezeichnet werden. Als semiautonome Organellen besitzen sie ein unvollständiges, eigenes Genom. Strukturelle und molekulare Besonderheiten (Doppellayer der Membran, Permeasen in der äußeren Membran, Cardiolipingehalt der inneren Membran, Atmungskette, ATP-Synthase, ringförmige DNA ohne Histone, etc.) stützen die These, dass in einem frühen Evolutionsstadium aerobe Purpurbakterien als Symbionten in das Zytoplasma von Einzellern aufgenommen wurden. Ein Teil des bakteriellen Genoms scheint durch Gentransfer in das Genom des Zellkerns

eingegliedert worden zu sein, so dass schließlich die semiautonomen Mitochondrien entstanden, die der Zelle die Fähigkeit zur oxidativen Zellatmung verliehen haben (11, 18).

Die Wand der Mitochondrien besteht aus zwei konzentrisch angeordneten Biomembranen, die den intermembranösen Raum begrenzen. Die innere Membran ist Sitz der Atmungskette. Sie schließt den Matrixraum ein, in dem der Citratzyklus und der Fettsäureabbau, die beta-Oxidation, stattfinden. Im Gegensatz zur äußeren Membran ist die innere reich gefaltet. Ihre Oberfläche ist somit fünf- bis zehnmal größer. Kennzeichnend für sie ist ein hoher Protein- und geringer Lipidanteil. Sie ist durchlässig für ungeladene Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 150 Dalton (Da) und impermeabel für Ionen, einschließlich H^+ , und Metabolite. Deren Durchtritt durch die Membran wird durch spezifische Kanal- und Transportproteine, sogenannte Permeasen, ermöglicht. Die der Matrix zugewandte Oberfläche der Innenmembran ist dicht mit 8 nm großen Elementarteilchen besetzt, kugelförmigen Partikeln aus fünf Proteinuntereinheiten, die einem transmembranösem Proteinkomplex der inneren Membran anhaften (11). Dieses Enzym, die F₀F₁-ATP Synthase, ist für die ATP Synthese verantwortlich.

Im Matrixraum stellt der Citratzyklus die Drehscheibe des Stoffwechsels dar. Als „Endstrecke der Substratoxidation“ (18) stellt dieser durch den oxidativen Abbau von Acetyl-CoA energiereiche Verbindungen bereit. Acetyl-CoA fällt durch die katabolen Stoffwechselwege der Glykolyse, Laktatdehydrogenasereaktion und den Abbau von Aminosäuren und Fettsäuren an. Weiterhin liefert der Citratzyklus durch seine Intermediärprodukte wichtige Substrate für die Synthese von Fett- und Aminosäuren, von Häm und für die Glukoneogenese. Wichtigster Regulator des Citratzyklus ist der zelluläre Energiebedarf, wobei ADP, ATP und $NADH+H^+$ als Effektoren der Enzymaktivität wirken.

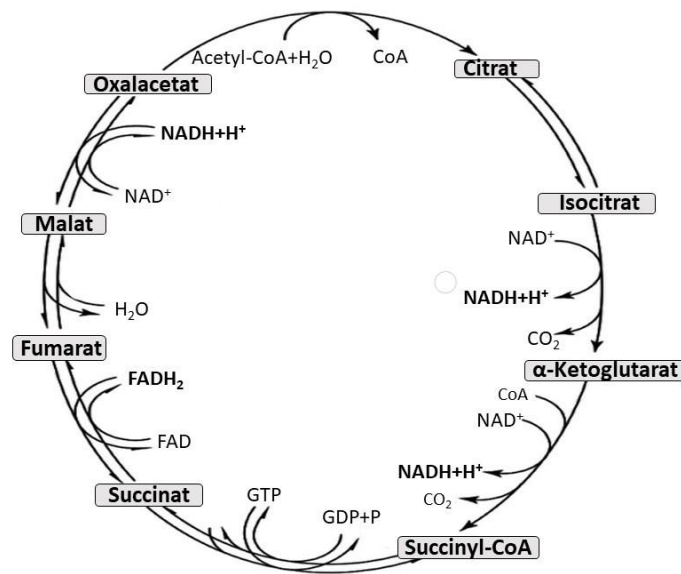


Abb. 1.1: Übersicht über den Citratzyklus (modifiziert nach Rassow et al., 2012)

Energieliefernde Reaktionen bilden einen elementaren Teil des Intermediärstoffwechsels. Das grundlegende Prinzip bei der Energiegewinnung beruht auf der Kopplung von exergoner an endergone Reaktionen (18, 43). Die Mehrzahl der exergonen Reaktionen sind Redoxreaktionen. Hierzu ist der Citratzyklus eng an die Atmungskette gekoppelt, der die wesentliche Aufgabe zukommt, die reduzierten Coenzyme ($\text{NADH}+\text{H}^+$, FADH_2) mit Sauerstoff unter Bildung von Wasser zu reoxidieren. Formal handelt es sich hierbei um die Knallgasreaktion $\text{H}_2 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$.

Bei allen Lebewesen, die Sauerstoff zur Energiegewinnung benötigen, wird die Energie aus dem Potentialgefälle der Knallgasreaktion gewonnen. Die Elektronen werden nun von den Elektronendonatoren nicht direkt auf den Sauerstoff übertragen, sondern stufenweise über verschiedene Redoxsysteme abgegeben, $\text{O}_2 + 4 \text{e}^- + 4 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$.

Der Gesamtgewinn pro Mol Acetyl-CoA über Citratzyklus und Atmungskette beträgt +12 ATP. Von der Energiebilanz ausgehend wird nach Zeek et al. nur knapp die Hälfte der zur Verfügung stehenden Energie (220 kJ/mol) in chemische Energie ($3 \times 30,5 \text{ kJ/mol}$) umgewandelt (43). Durch die Elektronenübertragung in der Atmungskette wird Energie freigesetzt, welche an der inneren Mitochondrienmembran einen Protonengradienten aufbaut. Dieser Gradient kann mit Hilfe spezieller Enzyme die ATP-Synthese antreiben.

1.2.2 Ablauf der oxidativen Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung bezeichnet die Kopplung des Elektronentransportes der Atmungskette über den Aufbau eines Protonengradienten zwischen der Innen- und Außenfläche der inneren Mitochondrienmembran an die Synthese von ATP. Voraussetzung für den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten ist, dass der Matrixraum der Mitochondrien gegenüber dem intermembranösen Raum alkalisch ist. Im Gegensatz zur inneren Membran, welche für ausschließlich für Wasser, Sauerstoff und CO_2 frei durchlässig ist, ist die äußere Mitochondrienmembran für niedermolekulare Substanzen permeabel (11).

In der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Transportsysteme sorgen für den Transport von Adeninnukleotiden, verschiedenen Metaboliten und Wasserstoff zwischen dem zytosolischen und dem mitochondrialen Kompartiment. Die zum Elektronentransport notwendigen Enzymkomplexe, welche als integrale Multiproteinkomplexe in die innere Membran eingebaut sind, transportieren Protonen gegen das Konzentrationsgefälle aus dem Matrixraum in den Intermembranraum. Die mitochondriale ATP-Synthase, bestehend aus einem Protonenkanal und der ATPase, nutzt schließlich die beim Ausgleich des Protonengradienten freiwerdende Energie, um aus ADP und anorganischem Phosphat ATP zu bilden (18).

Mit Wasserstoff wird die Atmungskette über die Coenzyme $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 beliefert. $\text{NADH}+\text{H}^+$ stammt vor allem aus dem Citratzyklus, z.T. aber auch aus der Pyruvat-Decarboxylierung, der aeroben Glykolyse, der oxidativen Desaminierung von Aminosäuren und der beta-Oxidation der Fettsäuren. FAD/FADH_2 ist Bestandteil verschiedener mitochondrialer Dehydrogenasen. Es überträgt die Wasserstoffatome des Succinats, Acetyl-CoAs und Glycerin-3-Phosphats. Die Succinat-Dehydrogenase als einziges membrangebundenes Enzym des Citratzyklus ist bereits Teil der Atmungskette. Beide im zytosolischen Raum gebildeten wasserstoffübertragenden Coenzyme, NADH/H^+ bzw. FADH_2 , können die Mitochondrieninnenmembran nicht durchdringen, weshalb eine Wasserstoffübertragung auf Substrate notwendig wird.

Im Malatzyklus dient zytosolisches NADH zur Reduktion von Oxalacetat zu Malat, welches durch einen Antiporter in den Matrixraum transloziert. Hier kann nun die Erzeugung von Matrix- NADH/H^+ stattfinden. Der Austausch des Kohlenstoffs erfolgt durch die Aspartataminotransferase und dem Aspartat/Glutamat- Antiporter.

Im Glycerophosphatzyklus wird auf der zytosolischen Seite mit Hilfe der Glycerophosphatdehydrogenase Dihydroxyacetonphosphat mit NADH/H^+ zu alpha-Glycerophosphat reduziert.

In der Innenmembran erfolgt nun die FAD-abhängige Oxidation des Glycerophosphats zu Dihydroxyacetonphosphat. Unter Zuhilfenahme des Ubichinons kann das reduzierte FADH_2 anschließend durch die Glycerophosphatoxidase reoxidiert werden (22).

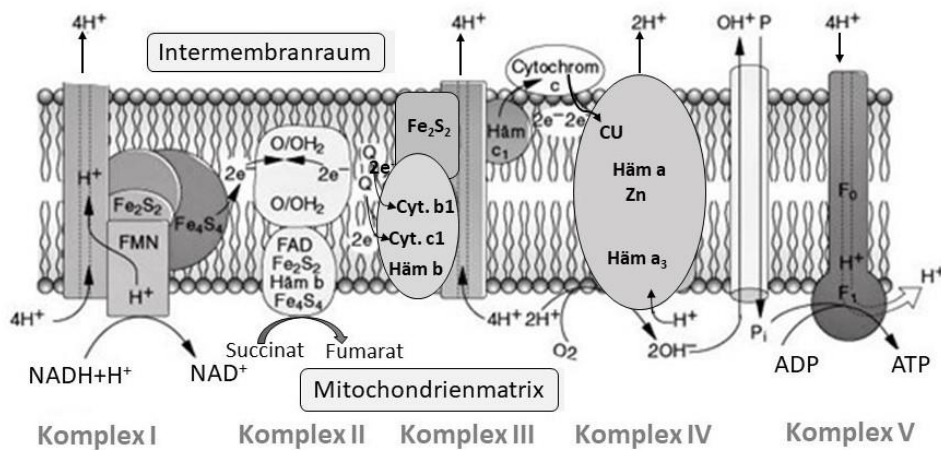


Abb. 1.2: Atmungskette (modifiziert nach Rehner et Daniel, 1999)

Die Enzyme der Atmungskette bilden eine zusammenhängende Enzymstrasse und lassen sich in Enzymkomplexe unterteilen.

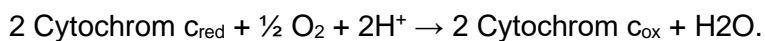
Die Wasserstoffübertragung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf Ubichinon wird durch die NADH-Ubichinon-Reduktase (Komplex I) katalysiert. Diese stellt den größten Komplex der Atmungskette dar:



Durch die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase / Dehydrogenase (Komplex II) wird die Wasserstoffübertragung von Succinat auf Ubichinon katalysiert. Dieses Enzym ist, wie bereits erwähnt, auch Bestandteil des Citratzyklus: Succinat + Ubichinon → Fumarat + Ubichinol.

Komplex III (Ubichinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase) wird auch als Cytochrom c-Reduktase bezeichnet und katalysiert die Übertragung der Elektronen von Ubichinol auf Cytochrom c: $2 \text{ Cytochrom } c_{\text{ox}} + \text{ Ubichinol} \rightarrow 2 \text{ Cytochrom } c_{\text{red}} + \text{ Ubichinon}$.

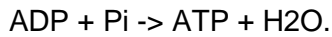
Bei der Elektronenübergabe ändert sich die Wertigkeit des zentralen Eisenatoms der Cytochrome. Die Elektronenübertragung von Cytochrom c auf Sauerstoff wird durch die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) katalysiert:



Der Elektronentransport über die Komplexe I-IV ist assoziiert mit einem Protonenfluss aus dem Matrixraum durch die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum. Die Änderung der freien Energie, welche durch den Elektronentransport auftritt, kann von den Komplexen I, III und IV für den aktiven Transport von Protonen genutzt werden. Auf diese Weise entsteht der für die ATP-Synthese notwendige pH- und Ladungsgradient über die innere Mitochondrienmembran. Für weitere Einzelheiten sei auf biochemische Lehrbücher verwiesen.

Die eigentliche Synthese von ATP erfolgt an einem integralen Proteinkomplex der inneren Mitochondrienmembran, der oft auch als Komplex V, ATP-Synthase oder F1/F0-ATPase bezeichnet wird (11). Dieser besteht aus mindestens 16 verschiedenen Untereinheiten, die sich zu zwei Komplexen, F0 und F1, gruppieren. Der in der Membran liegende wasserunlösliche F0-Teil bildet mit seinen hydrophoben Peptiden einen regulierten Protonenkanal. F1 ist in isolierter Form eine aktive ATPase und besteht aus fünf verschiedenen Polypeptiden (22), die auf der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran sitzen. Ein Protonenfluss entlang des Konzentrationsgradienten vom Intermembran- in den Matrixraum führt hier zu einer Konformationsänderung, was die ATP-Synthese überhaupt erst ermöglicht. Beim Fehlen eines Protonengradienten bindet ein als ATPase-Inhibitor bezeichnetes Polypeptid an der F1- Untereinheit, wodurch die Hydrolyse von ATP durch das Enzym verhindert wird. Der F0/F1-Komplex kann den Protonengradienten nutzen, welcher über die mitochondriale Innenmembran

besteht. Während Protonen dem Konzentrationsgradienten nach vom Intermembranraum in den Matrixraum zurückfließen, wird Energie freigesetzt. Diese dient der Bildung von ATP:



$$\Delta H = \text{ca. } 30,5 \text{ kJ/mol}$$

Der Transport des benötigten Phosphates geschieht durch einen speziellen Symporter. Mechanisch gesehen lässt sich die ATPase in einen sich drehenden Rotor und einen Stator gliedern.

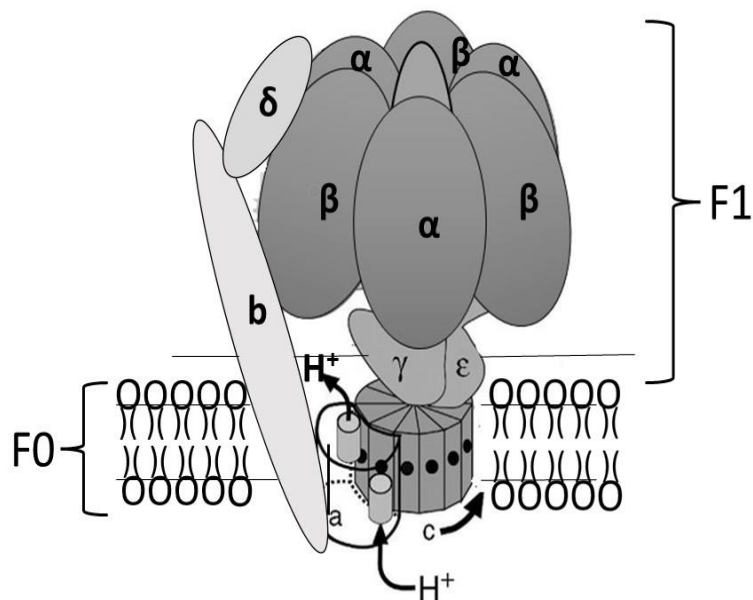


Abb. 1.3: Molekularer Aufbau der F0F1 ATP Synthase (modifiziert nach Nakamoto, 1999)

Unter physiologischen Bedingungen kontrolliert das Substratangebot von ADP, O₂ und die Reduktionsäquivalenten NADH und FADH₂ die Geschwindigkeit der Atmung, wobei ADP den Hauptregulator darstellt (22). ADP gelangt im Austausch gegen ATP durch eine Translokase (Antiporter) in den Matrixraum. Wenn der ATP-Verbrauch in der Zelle gering ist und wenig ADP anfällt, steht weniger ADP zum Austausch gegen ATP zur Verfügung und somit wird die ATP-Synthese gedrosselt.

Störungen im Ablauf der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung als essentielle Stoffwechselreaktionen haben meist schwerwiegende Krankheitsbilder zur Folge. Neben den erworbenen Störungen gibt es eine Reihe von genetischen Defekten der Enzymkomplexe, die häufig zu schweren und oft unspezifischen Krankheitsbildern führen. Darüber hinaus kann der Ablauf der oxidativen Phosphorylierung an den einzelnen Enzymkomplexen der Atmungskette sowie der ATP-Synthase gehemmt werden, so zum Beispiel durch Barbiturate, Rotenon, Malonat, Antimycin A, Cyanide, Azide, Kohlenmonoxid und Oligomycin.

1.2.3 Physiologische Entkopplung

Die Wirkung sogenannter Entkoppler der Atmungskette beruht auf einer Abtrennung der Redoxreaktionen von der ADP-Phosphorylierung. Hieraus ergibt sich, dass das Vorhandensein von ADP oder anorganischem Phosphat nicht länger die Geschwindigkeit der Atmung bestimmt. Es resultiert eine unkontrollierte Atmung. Entkoppler sind amphiphatische Moleküle, welche sich in der Phospholipid-Doppellayer lösen und die Permeabilität für Ionen steigern (H^+ Transport, ATP-Bildung), da sie durch ihre organischen lipophilen Verbindungen leicht protoniert, bzw. deprotoniert werden können.

Normal wird eine Entkopplung durch spezielle Entkopplerproteine via hoher Superoxid-Konzentrationen als Schutz der Zelle vor toxischen Konzentrationen ausgelöst. Stoffe, die mit bestimmten Entkopplerproteinen interagieren, sind nach Nedergaard et al. vor allem freie Fettsäuren, welche nach Stimulation durch Norepinephrin von den Triglyceriden der Zelle freigesetzt werden (27).

Eine physiologische Entkopplung der Bindung zwischen O_2 -Verbrauch und ATP-Produktion in den Mitochondrien macht sich die Natur z.B. in Form der mitochondrialen Thermogenese zu Nutze, welche u.a. für das Überleben von Neugeborenen und bei winterschlafenden Säugetieren wichtig ist und vor allem im braunen Fettgewebe stattfindet. Kältereize führen zu einer gesteigerten Aktivität des sympathischen Nervensystems. In den Fettzellen des braunen Fettgewebes resultiert beta 3-Rezeptor vermittelt hierdurch eine gesteigerte cAMP-Produktion, welches wiederum die Lipolyse über eine Aktivierung der hormonsensitiven Lipase stimuliert. Zudem induziert es das Enzym Lipoproteinlipase, welches für die Spaltung extrazellulärer Triacylglycerine

verantwortlich ist. Über cAMP wird das Entkopplungsprotein UCP1 / Thermogenin induziert, welches als Protonenträger in die innere Mitochondrienmembran des braunen Fettgewebes integriert ist und diese Mitochondrienmembran für Protonen durchlässig macht (22). Der mitochondriale Elektronentransport liefert infolge des Zusammenbruchs des elektrochemischen Potentials nur noch Wärmeenergie.

Thermogenin verwandte Proteine (UCP2-5) lassen sich auch in Mitochondrien anderer Gewebe nachweisen. UCP2 wurde unter anderem im Herzmuskel, Zellen des braunen und weißen Fettgewebes, Skelettmuskel, Niere, Leber, Lunge, Placenta, Immunzellen und pankreatischen beta-Zellen nachgewiesen. Dem Protein wird nach Samudio et al. unter anderem eine Schutzfunktion vor dem Zelltod zugeschrieben (34). Das Vorkommen von UCP3 ist nach aktuellem wissenschaftlichem Stand auf das Vorkommen im braunen Fettgewebe und Skelettmuskel beschränkt. Humanes UCP3 weist eine 59%ige Identität mit UCP1 auf. Harper et al. konnten nachweisen, dass eine hohe Expression von UCP3 im Skelettmuskel bei Mäusen trotz erhöhter Nahrungsaufnahme mit einer erniedrigten Gewichtszunahme korreliert, dass UCP1 die Insulinsensitivität verbessert und eine Gewichtszunahme reduziert (15).

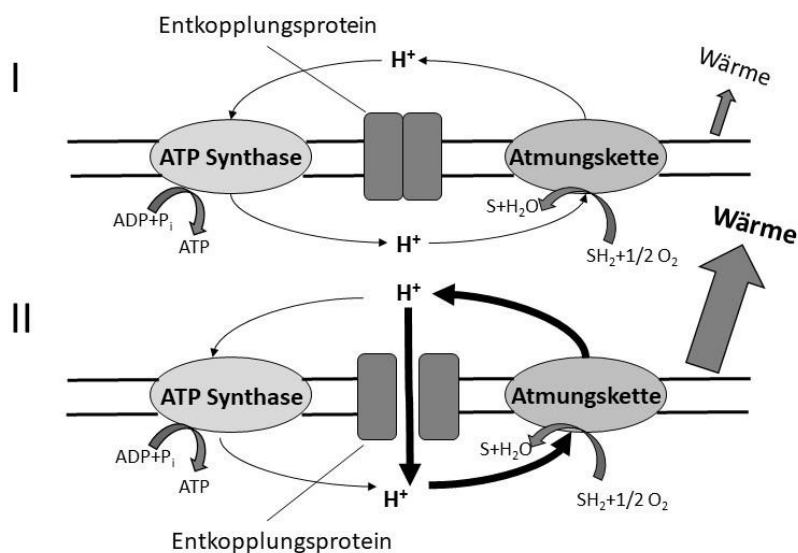


Abb.1.4: Wirkmechanismus der Entkopplung bei winterschlafenden Tieren (modifiziert nach Wang, 1989)

Nichtnatürliche Entkoppler finden bereits eine breite Anwendung in der Medizin und Industrie. Ein großer Teil wird als Wirkstoff in Pestiziden und Insektiziden eingesetzt. Im klinischen Alltag werden Hemmstoffe der oxidativen Phosphorylierung vielfach eingesetzt, vor allem in NSARs, Antipsychotika, Antidepressiva und Antidiabetika (5)

1.2.4 Entkopplung durch 2,4-DNP

2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) ist ebenfalls den nichtnatürlichen, synthetisch hergestellten Entkopplern zuzuordnen. Das Prinzip der Entkopplung durch die lipophile schwache Säure beruht darauf, dass sie als exogener Protonencarrier den Rücktransport der Protonen in den mitochondrialen Matrixraum ermöglicht. Hierbei wird die ATP-Synthase umgangen.

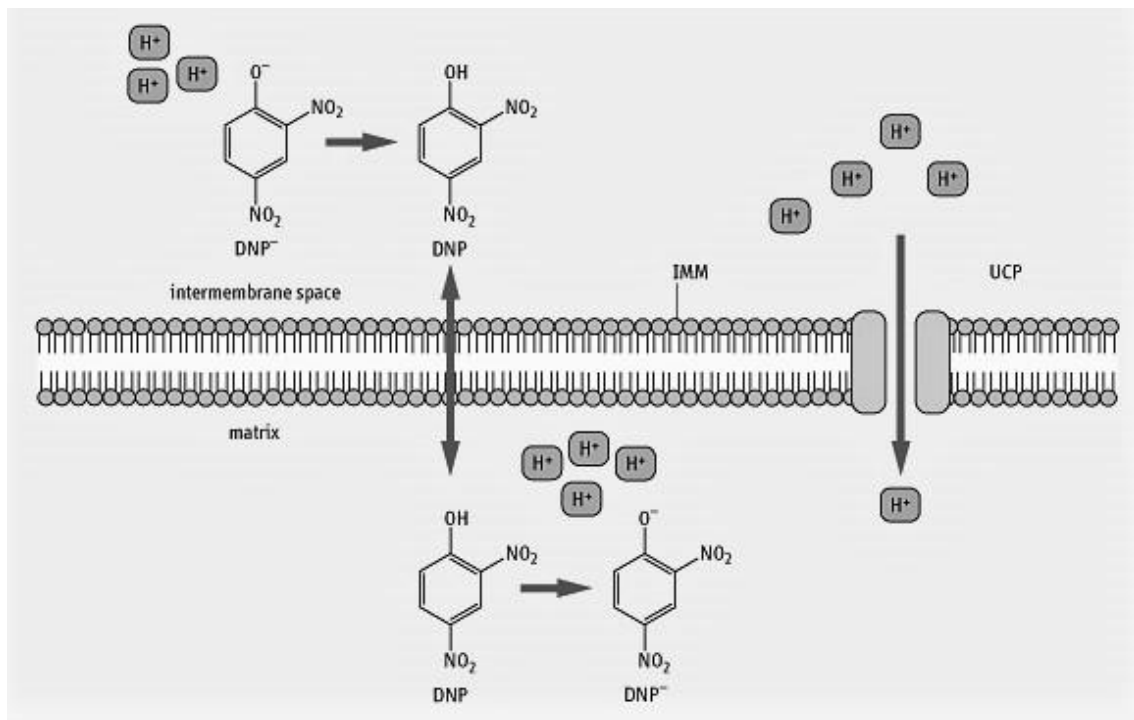


Abb.1.5: Wirkprinzip von DNP als exogener Protonencarrier (Baynes et Dominiczak, 2004)

Da auf der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran hohe Protonenkonzentrationen vorherrschen, wird 2,4-DNP hier protoniert und kann

anschließend als lipophile Substanz ungehindert die innere Membran durchtreten. Im Matrixraum findet dann die Deprotonierung im alkalischen Milieu statt. Als lipophiles Anion erfolgt sein Rücktritt entlang des Membranpotentials über diverse Membranproteine auf die Außenseite der inneren Membran, was einen Zusammenbruch des über die innere Membran aufgebauten elektrochemischen Potentials zur Folge hat. Die durch die Redoxreaktionen generierte Energie kann nun nicht mehr als ATP konserviert werden und geht in Form von Wärmebildung verloren (22).

1.3 2,4-Dinitrophenol

1.3.1 Historie

Wie von Harper et al. beschrieben, wurde DNP bereits 1885 in der Bäckereiindustrie genutzt, wo es aufgrund seiner gelben Farbe den beigefügten Produkten den Eindruck einer gehaltvolleren Substanz vermitteln sollte (15).

Viele Erkenntnisse über 2,4-Dinitrophenol und seine Wirkungen ließen sich jedoch vor allem aus Beobachtungen seiner Anwendung als Diätmittel in den 30er Jahre schließen. Der Gedanke, 2,4-DNP zur Gewichtsreduzierung einzusetzen, wuchs aufgrund von Zwischenfällen in der Munitionsherstellung in Frankreich während des ersten Weltkrieges. Arbeiter, die direkten Kontakt zu einem Gemisch aus 40% DNP und 60% Trinitrophenol hatten, entwickelten eine Hyperthermie mit Spitzenkörpertemperaturen von über 40°C (15). In Tierversuchen konnte daraufhin eine direkte Stimulierung der Zellatmung und ein Anstieg der Körperkerntemperatur durch 2,4-DNP-Gabe nachgewiesen werden. Erste Versuche an Patienten in der Stanford University, CA zeigten 1930, dass Dosen von 5 mg/kg bei subjektivem Hitzegefühl mit begleitetem Schwitzen generell gut toleriert wurden. Dosiserhöhung auf 5-10 mg/kg gingen mit stärkerem Schwitzen einher, es fand sich aber kein Anhalt für eine objektiv erhöhte Körpertemperatur oder eine Erhöhung der Herzfrequenz. Erst bei mehr als 10 mg/kg stellte sich eine Steigerung sowohl der Körperkerntemperatur, als auch der Atem- und der Herzfrequenz ein. Bei täglichen Dosen von 3-5 mg/kg steigerte sich der Grundumsatz um ca. 40%, so dass es zu einer Gewichtsabnahme von ca. 0,64 kg/Woche kam (15). Trotz individuell verschiedenem Ansprechen auf die 2,4-DNP-Dosierung zeigte sich eine eindeutige Abhängigkeit der metabolischen Rate von der verabreichten 2,4-DNP-Konzentration. Im Durchschnitt kam es zu einem 11%igem Anstieg bei einer Dosiserhöhung von 0,1 g DNP.

In den USA war 2,4-DNP in den Apotheken rezeptfrei zugänglich. Es schien erfolgversprechend, ohne körperliche Anstrengung oder spezielle Diätmaßnahmen überflüssiges Gewicht zu verlieren. 1934 wurde die Zahl derer, die dieses „Wunderdiätmittel“ konsumierten auf 100.000 geschätzt. Im Verlauf wurden unter der 2,4-DNP- Therapie vereinzelt schwere Hautausschläge und mehrere Kataraktfälle bei Frauen dokumentiert und der Zusammenhang mit dem Auftreten einer Agranulozytose diskutiert (15). Bis 1935 waren 12 Frauen vorübergehend unter 2,4-DNP-Gabe erblindet. Nach zunächst großen Erfolgen kam es sogar zu tödlichen Zwischenfällen im Rahmen von Überdosierungen, so dass in den USA die Verbreitung von 2,4-DNP 1938 verboten wurde. Bis heute existiert keine Zulassung eines DNP-haltigen Medikamentes oder Nahrungsergänzungsmittels durch die amerikanische FDA, als schneller Fetburner und Anabolikum ist es jedoch online zu beziehen.

1.3.2 Vorkommen und Verwendung

Heute findet 2,4-DNP Verwendung in der Herstellung von Farben und anderen organischen Chemikalien, in Holz- und Rostschutzmitteln, fotografischen Entwicklern, Insektiziden, Herbiziden, Fungiziden, Explosionsgemischen und als pH-Indikator (38). Ein therapeutischer Einsatz von 2,4-DNP wird in vielen Bereichen diskutiert, so u.a. wie von Patel und Bin Wu et al. beschrieben zur Neuroprotektion nach Rückenmarksverletzungen (29), bei Morbus Huntington (2) und bei Stoffwechsel- oder Herzkreislauferkrankungen.

1.3.3 Toxikologiebericht

Dinitrophenole sind synthetisch hergestellte organische Chemikalien, die zur Gruppe der Nitroaromaten gehören und die in sechs Isomere unterteilt werden können: 2,3- 2,4- 2,5- 2,6- 3,4- 3,5- Dinitrophenol. Sie kommen in der Umwelt nicht natürlich vor.

Es handelt sich bei 2,4-DNP um einen gelben Feststoff (kristallines Pulver) mit bitterem Geschmack, der Schmelzpunkt liegt bei 112-114 °C. Die LD50 (oral) wird bei der Ratte mit 30 mg/kg Körpergewicht angegeben, die niedrigste publizierte Letaldosis (oral) beim Menschen mit 4,3 mg/kg Körpergewicht.

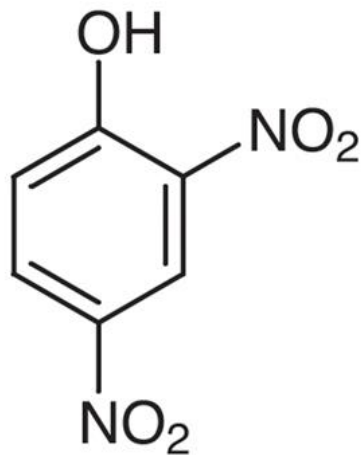


Abb.1.6: Chemische Formel des 2,4- Dinitrophenol

Synonyme für 2,4- Dinitrophenol (DNP), dessen Molekulargewicht 184,11 g/mol beträgt, sind Caswell No. 392, Sulfo Black B oder Nitro Kleenup (38). DNP wird aus Autoabgasen, von Fabriken oder bei entsprechenden Müllverbrennungen freigesetzt. Messbare Konzentrationen können sich in der Luft, Niederschlägen und somit auch im Grundwasser und Boden finden. Absorbiert wird es vom Menschen über die Lunge, den Gastrointestinaltrakt oder auch dermal. Die Absorption der lipophilen Substanz (pKA 4.09) nach Aufnahme per os erfolgt wahrscheinlich im oberen Magendarmtrakt bei niedrigem pH-Wert via passive Diffusion (38).

Im Blut zirkuliert DNP gebunden an Serumproteine zum einen, und als freie Fraktion zum anderen. Freies DNP gelangt in die Organe, eine Akkumulation ist bisher nicht beschrieben. Die rasche Metabolisierung erfolgt durch Reduktion der Nitrogruppen, wobei man bei der Reduktase zwischen zwei getrennten Enzymsystemen unterscheiden muss: Eines ist im Zytosol lokalisiert, das andere in den Mikrosomen. Beide Enzyme benötigen zur Aktivität NADH. Die Ausscheidung der Metabolite erfolgt renal.

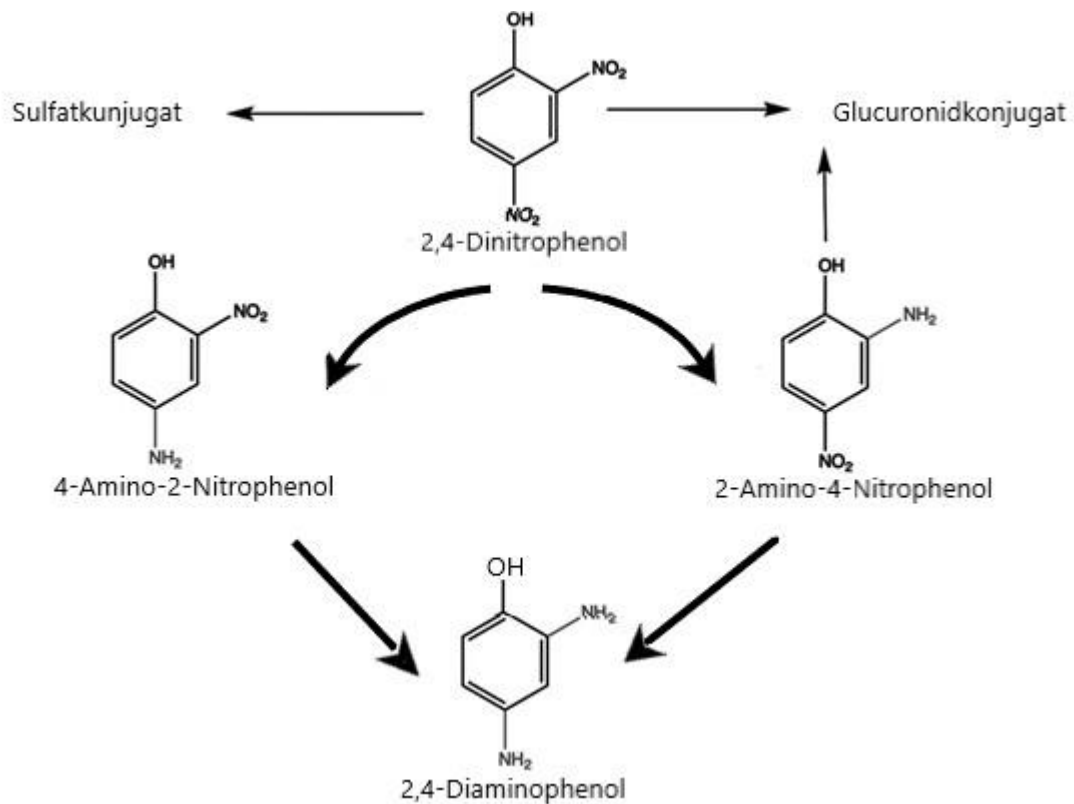


Abb. 1.7: Metabolischer Abbau von 2,4-Dinitrophenol (modifiziert nach Sousa et al., 2020)

Reaktionen auf Kontakt oder Aufnahme von Dinitrophenol sind vor allem Erbrechen und Koliken, nach Inhalation überwiegend Kopfschmerzen und Schwindel. Kurz- oder Langzeitexposition von DNP können zu einem erhöhten Basal-Metabolismus führen, der sich als Schwitzen bemerkbar machen kann und in hohem Fieber mit Krämpfen und Koma enden kann (26). Folgen einer DNP-Intoxikation können sein: Hypotonie, Tachykardie und Störungen des kardialen Reizleitungssystems, Dyspnoe und Tachypnoe, Müdigkeit, Unruhe, metabolische Azidose, Rhabdomyolyse, Schilddrüsenfehlfunktionen, Zyanose, Agranulozytose, Methämoglobinämie, hämolytische Anämien, gelbliche Verfärbung der Haut, des Spermas und der Augenlinse mit Kataraktbildung, periphere Neuritis, Niereninsuffizienz, Leberversagen und Multiorganversagen (6). Besonders bei Patienten mit C₂H₅OH-Abusus, bzw. renaler oder hepatischer Vorschädigung, ließen sich in der Vergangenheit dramatische Krankheitsverläufe mit Todeseintritt beobachten (38). Die Körpertemperatur stieg postmortem weiter bis auf 43°C an, der Rigor mortis setzte verfrüht ein.

Zur Verfügung stehende therapeutische Maßnahmen nach akzidenteller Aufnahme von 2,4-DNP beschränken sich auf Gabe von Carbo medicinalis, Spülungen mit Wasser und Bicarbonatlösungen und sonstige primäre Giftelimination, sowie supportive Therapie wie kalte Packungen. Ferner sollte Glukose substituiert werden, da die Glykolyse in den betroffenen Zellen als Haupt-ATP-generierende Quelle gesteigert ist. Kontraindiziert sind in diesem Fall Salicylate und Anticholinergika, da diese ebenfalls als Entkoppler der Atmungskette agieren können und somit die Wirkung des 2,4-DNP potenzieren würden. Im Gegensatz zu anderen Phenolen ist bislang keine direkte karzinogene Wirkung des DNPs nachgewiesen.

Sowohl 2,4-DNP, als auch deren Haupt-Abbauprodukt, 2-amino-4-nitrophenol und in geringerem Maße 4-amino-2-nitrophenol, können im Blut und Urin, sowie im Gewebe gemessen werden. Ein bisher häufig verwendeter Test zum Nachweis von 2-amino-4-nitrophenol im Urin ist der „Derrien“ Test, ein Indikatornachweis, dessen Spezifität jedoch nicht sehr hoch ist (38).

1.4 Stoffwechsel von Tumorzellen

Der Entstehung eines Tumors liegt prinzipiell eine Störung der adäquaten Regulation der Proliferationsfähigkeit von Zellen zugrunde. Eine Schlüsselfunktion kommt hierbei den zellzyklusregulierenden Proteinen und Faktoren zu. Viele der inzwischen identifizierten Onkogene entstehen durch Mutationen von Wachstumsfaktoren, Proteinen und Rezeptoren, welche für die Signaltransduktion entscheidend sind.

Tumore können ferner durch chemische (i.e. Kanzerogene) oder physikalische Veränderungen (i.e. ultraviolettes Licht, Röntgenstrahlen oder die von radioaktiven Elementen ausgesandten alpha-, beta bzw. gamma-Strahlen) des Genoms ausgelöst werden. Wachstum, Differenzierung und Zelltod jeder Zelle unterliegen außerordentlich komplexen Regulationsmechanismen. Zunächst hat jede Zelle das Potential, sich durch Zellteilung zu vermehren, wobei sie einen Zellzyklus durchlaufen muss. Durch Differenzierung und konsekutiver Spezialisierung können Zellen häufig in einen sogenannten „terminalen differenzierten Zustand“ (G0-Stadium) übergehen, in dem sie nicht mehr teilungsfähig sind (22). Aufgrund extrazellulärer Signale (Tumornekrosefaktoren und andere Zytokine), oder bei nicht mehr behebbaren DNA-Schäden kann die Zelle unter normalen Bedingungen eine Apoptose einleiten. Die Apoptose als Reaktion der Zelle auf einen entsprechenden Reiz, ist eine Zellnekrose,

die jedoch durch ein endogenes „Selbstmordprogramm“ der Zelle (11) aktiv herbeigeführt wird. Die Zelle synthetisiert unter entsprechenden Bedingungen über Caspasenaktivierung ein DNA-zerschneidendes Enzym, welches die DNA des eigenen Zellkerns fragmentiert und zerstört. Infolge von DNA-Schäden kann jedoch der Weg in die Apoptose blockiert sein. Ferner können zur Proliferation führende Signale dauerhaft aktiviert werden, was die terminale Differenzierung der Zelle mit konsekutiver Beendigung der Proliferation mittels entsprechender Signale unmöglich macht. Cavalli und Liang beschrieben bereits 1998 mögliche Wege, wie die Mitochondrien als Zellorganellen jeder lebenden Zelle des Organismus einen Einfluß auf die Entstehung von Tumorzellen haben könnten (7). Neben Modifikation des Genoms durch Transfer mitochondrialer DNA und Erhaltung des Tumorphenotypes wird die Rolle der Mitochondrien bei dem programmierten Zelltod diskutiert. Die mangelnde Fähigkeit von Tumorzellen, über Signalkaskaden eine Apoptose einzuleiten, beruht auf mehreren Eigenschaften. So weisen sie eine erhöhte Resistenz gegenüber TNF-alpha und Modulationen an Rezeptorproteinen auf, und können aktiv Tumorsuppressorgene ausschalten.

Bereits 1923-1926 erkannten Otto Warburg und Mitarbeiter, dass es wichtige Eigenschaften von Tumorzellen sind, dass diese sowohl eine erhöhte Aufnahme von Glukose als auch einen gesteigerten glykolytischen Stoffwechsel aufweisen. Letzterer ist gekennzeichnet durch eine starke Laktatproduktion durch die aerobe Glykolyse, selbst bei ausreichender O₂-Versorgung (40). In den letzten Jahrzehnten wurde diese metabolische Besonderheit in vielen malignen Zelllinien und soliden Tumoren beobachtet und man weiß nun, dass Warburgs Beobachtungen eine charakteristische Eigenschaft maligner Tumorzellen sind. Die vermehrt anfallenden Intermediärprodukte der Glykolyse sind dabei essentiell für die Zellproliferation und das Tumorstadium. Obwohl die genauen Mechanismen, welche für die metabolischen Vorgänge verantwortlich sind, noch nicht exakt erforscht sind, scheint nach Pecican et al. eine Malfunktion der mitochondrialen Zellatmung verbunden mit einer Mutation / Deletion der mtDNA ein wichtiger Faktor zu sein (30). Lu et al. untersuchten 2015 die Auswirkungen der zurückgenommenen aeroben Glykolyse im Hinblick auf Tumormetastasen (23). Hier zeigte sich, dass der erhöhte Glukoseumsatz der Zellen und das Herunterregulieren der oxidativen Phosphorylierung überhaupt erst die Voraussetzungen für die anabolischen Eigenschaften der Tumorzellen schaffen. Der oxidative Metabolismus wird beibehalten, allerdings losgelöst von der gesteigerten Glykolyse. Unter Vermeidung einer

gesteigerten Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche Nebenprodukte der Zellatmung sind, wird so die antioxidative Leistungsfähigkeit optimiert. Somit sind Tumorzellen bestens ausgestattet, oxidativen Stress zu tolerieren, welcher durch Lösen der Matrix verursacht wird, was wiederum zu einer Widerstandsfähigkeit gegen Anoikis führt und ein erhöhtes Metastasierungspotential erklärt. Die erhöhte Laktatproduktion sorgt für eine saure Umgebung, welche die Motilität der Tumorzellen ebenfalls begünstigt und gleichzeitig Immunzellen hemmt. Der mitochondriale Kalzium Uniporter (MCU) erhöht den Kalziumeinstrom und beeinflusst die ROS-Freisetzung. So konnten Yu et al. 2017 nachweisen, dass die MCU-Expression positiv mit der Tumorgroße und Lymphknoteninfiltration an Brusttumorzellen korreliert (42). Eine Verringerung der MCU führte zu einer deutlichen Verringerung der mitochondrialen Kalziumkonzentration, der metastatischen Zellbeweglichkeit und der Matrixinvasivität der Tumorzellen. Eine Hochregulation der MCU-Expression erhöht die Metastasierungs-kapazität der Mammakarzinomzellen über Induktion der anaeroben Glykolyse. Die genaue Einordnung des Kalziumkanals ist jedoch noch nicht gelungen. Eine Beeinflussung durch Hemmung der MCU-Expression mittels MicroRNA (miRNA) wird diskutiert.

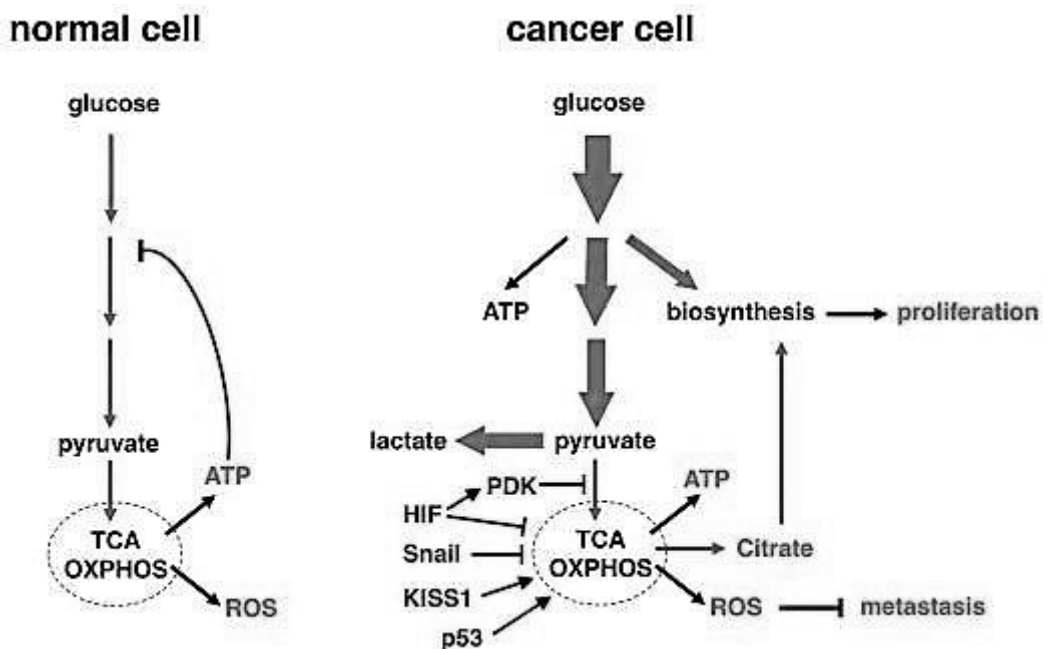


Abb. 1.8: Schematische Illustration des Glukosemetabolismus in benignen und malignen Zellen unter Normoxie (Lu et al., 2015)

1.5 Methode der Mikrokalorimetrie

Als etabliertes Verfahren zur Detektion thermischer Defekte erlaubt die hochempfindliche, isotherme Mikrokalorimetrie die Bestimmung kleinster Wärmefreisetzungen bis in den Nanobereich und stellt somit ein adäquates Messsystem für die durch 2,4-DNP ausgelöste Hyperthermie auf Zellebene dar.

Zur quantitativen Erfassung kleinster Wärmemengen und –ströme können unterschiedliche Messtechniken zum Einsatz kommen: ITC (Titrationskalorimetrie), Perfusion (Durchflußkalorimetrie), Batchkalorimetrie und Lösungskalorimetrie. In unseren Messungen wurde das System der Batchkalorimetrie verwendet.

Die Analysen wurden im ThermoMetric 2277 Thermo Activity Monitor mit 4 simultanen, voneinander unabhängig zu betreibenden Meßzylinder (Kalorimetrie-einsätze), durchgeführt.

Jeder Zylinder mit 2 Ampullen (Mikrokalorische Messung und Referenzampulle mit inertem Material) unterteilt sich hierbei in eine Vorheiz- und eine Messposition, welche von einem konstant temperierten Wasserbad umgeben ist und somit die zu untersuchende Probe thermodynamisch von der Umgebung isoliert. Durch exotherme und endotherme Prozesse in der Messampulle kommt es zu einem Wärmefluß zwischen dem äußeren Wärmebad und dem Ampulleninhalt, welcher einer Temperaturdifferenz entspricht. Peltier-Elemente ermöglichen eine Messung dieser Temperaturdifferenz an der Ampullenwand mit außerordentlich hoher Empfindlichkeit.

Durch den Zusammenhang zwischen Wärmefreisetzung und Stoffwechselrate kann durch die Mikrokalorimetrie eine Aussage über den Gesamtmetabolismus der Zellen getroffen werden. Aufbauend auf der Arbeit „Entwicklung eines Modells zur mikrokalorimetrischen Analyse der Wirkung pharmakologischer Substanzen auf den Energiestoffwechsel benigner und maligner Zelllinien am Beispiel von 2,4-Dinitrophenol“ von F. Gonnert wurden hier die hochsensitiven mikrokalorimetrischen Messungen von 4 Zelllinien parallel zu den Chemotoxizitätstests durchgeführt (13).

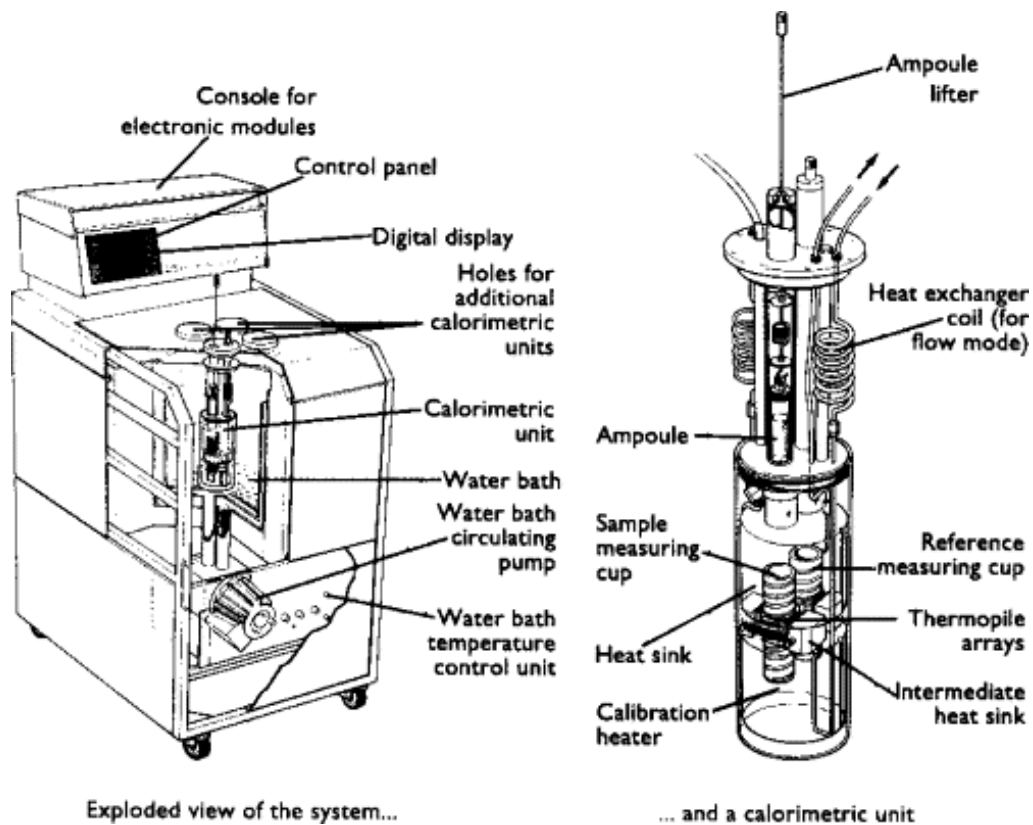


Abb. 1.9: Aufbau eines Batchkalorimeters (O'Neill et al., 2003)

Da sich die Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen immer auf den Gesamtmetabolismus beziehen, und sich diese Methode damit als unspezifisch darstellt, sind die Messungen in Zusammenschau mit den durchgeführten Chemotoxizitätstests zu sehen, um Trends unter den verwendeten 2,4-Dinitrophenolkonzentrationen festlegen zu können.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Der Abfall des elektrochemischen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran durch Entkoppler wie 2,4-DNP stellt für die Zelle ein dramatisches Ereignis dar, da viele Stoffwechselfvorgänge ohne einen adäquaten Protonengradienten nicht möglich sind. Die über verschiedene Stoffwechselwege bereitgestellte Energie kann in dem Falle einer Entkopplung nicht mehr konserviert werden und wird als Wärme freigesetzt. Da maligne Zellen ein höheres Membranpotential und einen gesteigerten Grundumsatz aufweisen, wird postuliert, dass der Entkoppler 2,4-DNP in ihnen stärker angereichert werden kann als in benignen Zellen. Eine stärkere Stoffwechselaktivierung in malignen Zellen könnte folglich gegenüber benignen Zellen eine frühere Schädigung durch thermischen und metabolischen Stress zur Folge haben.

Es stellte sich nun die Frage, ob sich dieses Postulat dosisabhängig nachweisen lässt, und ob 2,4-DNP als mögliche toxische Substanz in der Therapie v.a. des Mamma Karzinoms interessant sein kann.

Mit Hilfe von Zytotoxizitätstestungen als in vitro-Untersuchungen wurde die zytotoxische Aktivität von 2,4-DNP gemessen. Parallel dazu wurde die Wärmefreisetzung der verwendeten Zelllinien mit und ohne DNP-Aussetzung in unterschiedlichen Konzentrationen im Mikrokalorimeter erfasst, um das Ausmaß des DNP-Einflusses auf die Wärmeproduktion der Zellen, und damit auf die Entkopplung der Atmungskette aufzuzeigen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1 Verwendete Zelllinien

Die Messungen wurden an insgesamt vier Zelllinien durchgeführt, drei malignen (BT-20, MDA-MB 231 und pA1) und einer semi-benigen (HaCaT). Die beiden epithelialen Brustkrebszelllinien BT-20 und MDA-MB231 sind vom „triple-negativen“ Typ, d.h. sie exprimieren keine Rezeptoren für Östrogen bzw. Progesteron und weisen nach Lasfargues et al. keine Her2- Überexpression auf (20). Dieser Zelltyp stellt den weitaus aggressiveren Brustkrebstyp dar, mit deutlich schlechteren therapeutischen Optionen für die betroffenen Patientinnen. Die ebenfalls epitheliale Teratokarzinomzelllinie PA1 zeichnet sich, wie von Giovanella et al. beschrieben, durch besonders problemloses und schnelles Wachstum in der Zellkultur aus (12). Die Keratinozytenlinie HaCaT besitzt einen sehr hohen Differenzierungsgrad und günstige Wachstums- und Vermehrungseigenschaften, weist jedoch nicht die exakt gleichen biologischen Eigenschaften frisch präparierter Keratinozyten auf. Der Name „Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes“ umschreibt die Herkunft und Etablierungsbedingungen der Zellen. Obwohl HaCaT-Zellen phänotypisch spontan transformieren, sind sie aufgrund ihres Wachstums- und Differenzierungsverhaltens nicht als tumorigen eingestuft und können somit nach Boukamp et al. als Repräsentant benignen Zellen verwendet werden (4).

Alle durchgeführten Arbeiten erfolgten grundsätzlich unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Zellkulturwerkbank. Die mikrokalorischen Messungen wurden mit Einsatz einer Klimaanlage durchgeführt, um eine konstante Raumtemperatur von 24°C zu gewährleisten.

Tab. 2.1: Im Versuchsansatz der Zytotoxizitätstests und Mikrokalorimetrie verwendete Zelllinien und ihre Herkunft

BT-20	Mammakarzinom	Epithelial	Cell Lines Service (CLS) Heidelberg
HACAT	Keratinozyten	Epithelial	Cell Lines Service (CLS) Heidelberg

MDA-MB 231	Mammakarzinom	Adenokarzinom aus Pleura	Cell Lines Service (CLS) Heidelberg
pA1	Ovarialkarzinom	Teratokarzinomzellen aus Aszites	Cell Lines Service (CLS) Heidelberg

2.1.2 Geräte

2.1.2.1 Geräte für Zellkultur

Tab. 2.2: Im Versuchsansatz der Zytotoxizitätstests verwendete Geräte

Brutschrank	Incubator NAPCO 5420-1
Elisa-Reader	MRX Dynex®
Lichtmikroskop	Leica®DM IRB
Pipettierhilfen	Brand®accu-jet
Messpipetten	Eppendorf®Unipipetten 3190
Sterilwerkbank	SterilGARD® Class II TypA/B3
Vortexgerät	Ika-Works®
Zählkammer	Brand®Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1mm Fläche 0,0025mm²
Zentrifuge	Hettich®Universal 16R

2.1.2.2 Geräte für Mikrokolorimetrie

Tab. 2.3: Im Versuchsansatz der Mikrokolorimetrie verwendete Geräte

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

2.1.3 Reagenzien

Tab. 2.4: Im Versuchsansatz der Zytotoxizitätstests und Mikrokalorimetrie verwendete Reagenzien

Destilliertes Wasser
2,4-Dinitrophenol von Sigma®
EGM von Clonetics Bio-Whittaker®
70% Ethanol von Seromed®
FCS von PAN®
Gentamycin von Biochrom®
1M HCL
LDH-Test-Kit von Roche®
PBS Dulbecco von Biochrom®
RPMI-1640 von Biochrom®
2% Triton X-100 von Merck®
Trypanblue Solution 0,4% von Sigma®
Trypsin EDTA 0,1% von Seromed®

2.1.4 Zubehör und Verbrauchsmaterial

Tab. 2.5: Im Versuchsansatz der Zytotoxizitätstests und Mikrokalorimetrie verwendetes Zubehör und Verbrauchsmaterial

Glasreagenzgläser, 10 ml
Cellstar® PP-Test tubes, sterile, 15 ml von Greiner®
Mikrotiterplatten 24 well-Flachboden von Nunc®
Mikrotiterplatte 96 well-Flachboden von TPP®
Pehazell® Zellstoff von Hartmann®
Pipettenspitzen von Eppendorf®
1,5 ml Reaktionsgefäß von Eppendorf®
Zellkulturflasche 75 cm ² ; Zentrifuge Röhrchen, Gamma-sterilisiert von TPP®

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Nach vorsichtigem Auftauen der Zellen im Wasserbad wurden diese mit 10ml des entsprechenden Nährmediums in Zellkulturflaschen mit 75cm² Wuchsfläche transferiert und in Kultur genommen. Nach Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank erfolgte schließlich bei konfluentem Bewuchs die Passage.

2.2.2 Versuchsansätze mit DNP

Die Versuchsansätze erfolgten in jeweils 3x24-well-Schalen mit einer Ausgangs-Zellzahl von 100.000 Zellen/well, was einer Gesamtzahl von 7,2 Mio. Zellen pro Ansatz entspricht.

Tab. 2.6: Im Versuchsansatz der Zytotoxizitätstests und Mikrokalorimetrie verwendete Nährmedien

BT-20	RPMI 1640 mit 10% FCS und Gentamycin (25 mg/l)
HACAT	EGM Kompletmedium
MDA-MB 231	RPMI 1640 mit 10% FCS und Gentamycin (25 mg/l)
pA1	RPMI 1640 mit 10% FCS und Gentamycin (25 mg/l)

Die Zellen ohne DNP wurden in jeweils 1ml Nährmedium pro well angesetzt. Ein Nährmedium mit Phenolrot wurde bewusst nicht verwendet, um eine Interaktion mit der späteren Farbreaktion zu vermeiden.

Der Ansatz des 2,4-Dinitrophenol-Mediums erfolgte über eine Stocklösung in Locke von 9µmol/ml gelöstes 2,4-DNP in doppelter Konzentration:

12,5µmol/l 2,4-DNP: 19,6µl Stocklösung in 7ml RPMI

25µmol/l 2,4-DNP: 38,5µl Stocklösung in 7ml RPMI

50µmol/l 2,4-DNP: 77µl Stocklösung in 6,95ml RPMI

100µmol/l 2,4-DNP: 154µl Stocklösung in 6,85ml RPMI

200µmol/l 2,4-DNP: 308µl Stocklösung in 6,7ml RPMI

Im Versuchsansatz wurden 500µl RPMI (farblos) direkt auf die Zellen, und anschließend 500 µl des entsprechenden doppelkonzentrierten DNP-Mediums dazu gegeben, um die

benötigte Endkonzentration zu erhalten. Auch hier wurde mit 100.000 Zellen/well in 1ml Medium gearbeitet.



Abb. 2.1: Mikroskop. Bild pA1 mit 100 µmol/l DNP nach 6 h

Nach 6 Stunden erfolgte die erste Ernte. Die Überstände wurden mittels Pipettierhilfe in ein separates Reaktionsgefäß abpipettiert und bei 300xg 10 min zentrifugiert. Die Überstände hiervon wurden erneut in ein separates Gefäß gegeben und für die späteren LDH-Testungen im Überstand im Kühlschrank auf Eis gelagert.

Die verbliebenen Zellpellets in den Reaktionsgefäßen wurden mit 500µl PBS/2%Triton X-100 aufgemischt und in die zugehörige Zellschale resuspendiert, in die zuvor 500µl PBS/ 2%Triton X-100 pipettiert wurden, um die Zellmembranen zu lysieren. Dann wurde das Lysat in ein jeweils neues Gefäß transferiert.

Die weiteren Ernten erfolgten nach dem gleichen Prinzip nach jeweils 24 und 48 Stunden. Die Reaktionsgefäße wurden für die nachfolgende LDH-Testung im Kühlschrank auf Eis gelagert.

2.2.3 LDH-Test

Zur Messung der Zellzahl wurde der LDH-Cytotoxizitätstest der Fa. Roche verwendet. Um die Quantität der Cytotoxizität und Cytolyse einer Substanz zu erfassen, wurde die LDH-Aktivität gemessen, welche proportional zu den geschädigten Zellen ist. Die im Cytoplasma einer jeden Zelle vorkommende Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein sehr stabiles Enzym, welches beim unspezifischen Zelltod (Nekrose) im Zellüberstand nachgewiesen werden kann. Es katalysiert in einer reversiblen Reaktion die Bildung von Lactat und NAD^+ aus Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$.

Die Aktivität des LDH korreliert mit dem Anteil der das Enzym freisetzenden Zellen. In 2 Messansätzen wurde hier sowohl die LDH im Zellüberstand erfasst als Kontrollmessung der lysierten Zellen, als auch die LDH der noch intakten Zellen. Für die Erfassung letzterer war es nun wichtig, die LDH in das Messmedium zu überführen. Dieser Übertritt erfolgt durch die Zugabe von Triton-X-100, welches die Zellmembran beschädigt, so dass die Zelle lysiert.

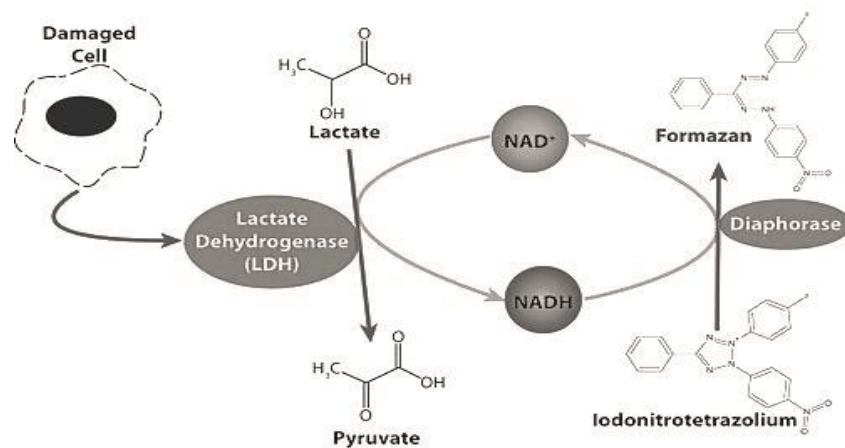


Abb. 2.2: Zwei-Stufen-Reaktion als Grundprinzip des LDH-Zytotoxizitätstest (G-Biosciences, 2022)

Die Erfassung der Enzymaktivität erfolgt in zwei Schritten. Zunächst reduziert die freigesetzte LDH NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ durch Oxidation von Lactat zu Pyruvat. In einer zweiten enzymatischen Reaktion werden die 2 freigesetzten Wasserstoffatome vom $\text{NADH}+\text{H}^+$ auf das gelbe Tetrazolium Salz übertragen. Dieses wird reduziert zum Formazan Salz, dessen rote Farbe schließlich im ELISA (MRX Photometer) gemessen werden kann. Die optische Dichte (OD) der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 490nm erfasst und so das Ausmaß der chemischen Reaktion bestimmt.

Da das Enzym LDH bei jeder Zelllinie in unterschiedlicher Konzentration vorhanden ist, wurde für jeden Versuchsansatz zusätzlich zu den Messungen der Proben eine eigene Standardreihe, i.e. Verdünnungsreihe, angelegt.

Dazu wurden die jeweiligen Zellen einer Linie mit PBS gewaschen, 10 min bei 660 x g zentrifugiert, die Überstände verworfen und das Pellet in 3ml PBS wieder aufgenommen. Der Ansatz der Standardreihe startete mit 500.000 Zellen/ml, bzw. 750.000 Zellen/1,5ml. 1,5ml des Ansatzes wurden in ein erstes Reaktionsgefäß gegeben. Eine mechanische Zerstörung der Zellwand wurde durch mehrmaliges Aufziehen und Leeren der Pipette erreicht. 650µl hiervon wurden nun in ein weiteres Reaktionsgefäß gegeben, in dem schon 650µl PBS vorgelegt waren. Diese Prozedur wurde für die gesamte Verdünnungsreihe weitergeführt, so dass 10 Verdünnungsstufen mit einer jeweiligen 1:2 Verdünnung als Doppelansatz vorlagen, die einer Zellkonzentration/ml von 500.000, 250.000, 125.000, 62.500, 31.250, 15.600, 7.800, 3.900, 1.950 und 975 entsprachen. Nach gründlichem Durchmischen mit Hilfe des Vortexgerätes wurden je 500µl der jeweiligen Verdünnungsstufe in ein zweites Reaktionsgefäß pipettiert. Bei 600xg über 10min konnten Zellfragmente abzentrifugiert und im Anschluss der Überstand vorsichtig abpipettiert werden, um einen zellfreien Kulturüberstand zu erhalten, welcher Voraussetzung für die Bestimmung der LDH-Aktivität war. Zu den Überständen wurde jeweils 500 µl PBS/ 2% Triton X100 hinzugegeben.

Schlussendlich wurden 50µl der jeweiligen Standardlösung im Doppelansatz in separate wells einer ELISA 96 well-Platte pipettiert und 50µl LDH-Reagenz (blau und rot) hinzugegeben. PBS ohne Farbstoff diente als Leerwert, PBS/ TritonX100 als Kontrollmessung. Bei Raumtemperatur erfolgte die 30minütige Inkubation, anschließend wurde die Reaktion mit 25µl 1N HCL gestoppt und die Farbveränderung im ELISA bei einer Wellenlänge von 490nm erfasst.

2.2.4 Mikrokalorimetrie

2.2.4.1 Vorbereiten der Zellen für die Messung

Für die Mikrokalorimetrie wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml des entsprechenden Nährmediums in Zellkulturflaschen mit 75cm² Wuchsfläche in Kultur genommen und anschließend bei 37°C und 5%CO₂ bis zum konfluenten Bewachsen im Brutschrank inkubiert.

Während der Anzucht der Zellen wurden die benötigten Glasplättchen für die Mikrokalorimetrie mit 70%iger Ethanollösung entfettet, mit einfach destilliertem sterilem Wasser nachgewaschen und je ein Plättchen in jeweils ein verschließbares, steriles 10ml Glasreagenzglas gegeben. Die so vorbereiteten Plättchen wurden in den Glasreagenzgläsern autoklaviert und im Trockenschrank steril getrocknet.

Für die Aussaat wurde das überschüssige Nährmedium in den Flaschen vorsichtig abpipettiert und die Zellen mit jeweils 10 ml PBS gewaschen, um residuales Medium zu entfernen. Zu Ablösung der adhaerenten Zellen wurde je 1ml Trypsin-Lösung hinzugegeben und die Flaschen anschließend für 5min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Aufmischung der gelösten Zellen mit 10ml PBS wurden diese in ein 15 ml Plastikröhrchen transferiert und die Zellzahl der Suspension in einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 260xg zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Zellpellets sorgfältig mit 10ml Nährmedium resuspendiert. Die Aussaat erfolgte in fünf Glasröhrchen, welche wie oben beschrieben vorbereitet wurden. Anschließend wurden diese im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C in einer Schräge von 45° inkubiert.

Die restliche Suspension wurde wieder in die Zellkulturflasche zurückgegeben und auf insgesamt 15ml entsprechendes Nährmedium angereichert und bis zur erneuten Passage im Brutschrank inkubiert.

2.2.4.2 Messungen im Mikrokalorimeter

Die mikrokalorischen Messungen erfolgten mittels eines Batchkalorimetriesystems der Firma Thermometrie. Um verlässliche Ergebnisse sicherzustellen, wurden regelmäßige Eichungen der Messkanäle des Gerätes durchgeführt.

Mit einer sterilen Pinzette wurde nun jeweils ein bewachsenes Plättchen in eine Stahllampulle gegeben, welche zuvor mit Ultraschall und Alkohol gereinigt, und mit 3,6ml 37°C temperiertem Nährmedium luftblasenfrei gefüllt wurde, um Messungenauigkeiten vorzubeugen. Vor jeder Messung erhielten die Deckel eine neue Teflondichtung, um Wärmeverluste zu vermeiden. Die Ampullen wurden erneut gereinigt und vorsichtig in das Mikrokalorimeter in die Vorheizposition versenkt. Hier erfolgte zunächst der Angleich der Temperatur der Ampullen an die Temperatur des 37°C warmen Wasserbades. Anschließend konnten die Ampullen vorsichtig in die eigentliche Messposition abgesenkt werden. Die im Programm während der Messung aufgezeichneten Daten wurden in ASC-Files umgewandelt und mit Microsoft Excel® weiterverarbeitet. Die Ermittlung der Zellzahl zu Beginn der Messung und nach Ablauf der 6 Stunden erfolgte mit Hilfe des LDH-Testes. Auf das Auszählen mittels Zählkammer wurde bewusst verzichtet, um nicht zu viele Zellen beim Abtrypsinisieren zu verlieren.

Ein mikrokalorimetrischer Messansatz umfasste parallel 4 Kanäle, davon 2 mit derselben jeweiligen DNP-Konzentration und 2 ohne DNP-Zugabe als Kontrolle.

2.3 Auswertung und Statistik

Für die statistischen Tests und die IC50-Berechnungen wurden die Softwareprogramme Excel 2019 (Microsoft Coop., Redmond, USA) und Prism 6.05 (GraphPad Software, San Diego, USA) genutzt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standard Fehler für die jeweiligen Messzeitpunkte angegeben. Als signifikant zytotoxisch wurden die Versuchsansätze gewertet, in welchen nach Abschluss der Inkubationszeit weniger Zellen nachweisbar waren als ursprünglich im Test eingesetzt. Als zytostatisch wurden diejenigen Ansätze gewertet, die keine Änderung der Zellzahl gegenüber der anfangs eingesetzten aufwiesen. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert <0.05 angesehen.

Die Varianzanalysen der prozentualen Veränderungen der Zellzahl bei 48h wurden mittels Kruskal-Wallis H Test durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Zytotoxizitätsanalyse

Anfangs wurden die LDH Messungen aus dem Zellkulturüberstand und den zugehörigen adhärennten Zellen verglichen, um deren Korrelation zu überprüfen. Wie zu erwarten, zeigte sich hier das gegenläufige System der Messungen des zellulären Enzyms LDH, exemplarisch für alle verwendeten Zelllinien anhand der Teratokarzinomlinie pA1 aufgeführt. Die Messwerte der adhärennten Zellen verliefen konträr zum LDH im Überstand. Erstere sanken mit steigender Toxizität durch das Ablösen der abgestorbenen und geschädigten Zellen vom Plattenboden, letzteres stieg durch die Freisetzung des Enzyms aus dem Zytoplasma beim Zelltod.

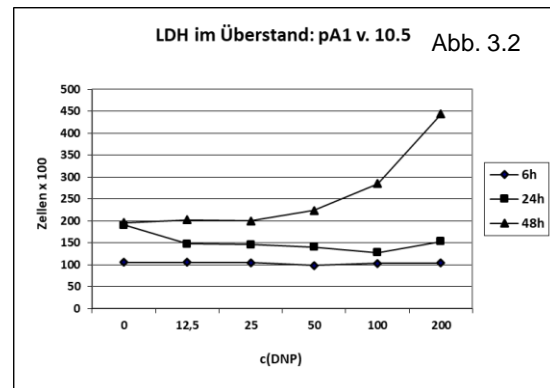
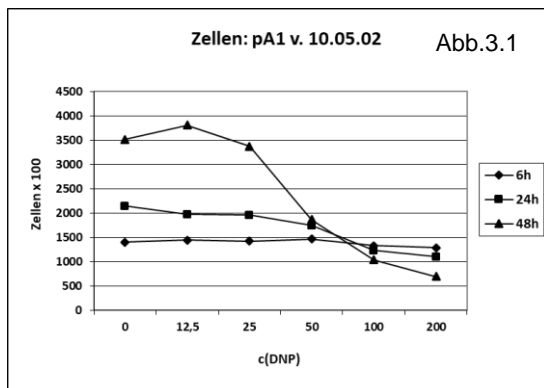


Abb. 3.1: LDH Messung an adhärennten Zellen nach Lyse: Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von intakten, adhärennten pA1 Zellen unter dem Einfluss von 0-200 μ M DNP nach 6h, 24h und 48h Inkubationszeit. Als im Cytoplasma einer jeden Zelle vorkommendes Enzym ist die Laktatdehydrogenase (LDH) sehr stabil. Für die Messungen der adhärennten Zellen wurde die LDH durch Zugabe von Triton-X-100 lysiert. Nach Lyse der Zelle konnte die LDH mittels ELISA bei einer Wellenlänge von 490nm erfasst werden. Die Aktivität korreliert mit dem Anteil der das Enzym freisetzenden Zellen.

Abb. 3.2: LDH Messung im nativen Zellüberstand: Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von pA1 Zellen im Zellüberstand unter dem Einfluss von 0-200 μ M DNP nach 6h, 24h und 48h Inkubationszeit als Kontrollmessung der lysierten Zellen. Als im Cytoplasma einer jeden Zelle vorkommendes Enzym ist die Laktatdehydrogenase (LDH) sehr stabil und kann beim unspezifischen Zelltod, der Nekrose, im Zellüberstand nachgewiesen werden. Die Aktivität im Zellkulturüberstand, welche mittels ELISA bei einer Wellenlänge von 490nm erfasst wird, korreliert mit dem Anteil der das Enzym freisetzenden abgestorbenen Zellen.

Beim Vergleich der LDH Messungen aus dem Zellkulturüberstand und den dazugehörigen adhärennten Zellen zeigte sich, dass die Werte der adhärennten Zellen stabiler und reproduzierbarer waren.

Grundlagen des weiteren Vorgehens:

1. Die Berechnungen der im folgenden dargestellten Versuchsergebnisse stützten sich entsprechend auf die LDH Analyse aus adhärennten Zellen. Die Auswertung erfolgte deskriptiv.
2. Bei der folgenden Darstellung der Ergebnisse wurde dann von einer zytotoxischen Wirkung ausgegangen, wenn weniger Zellen gemessen wurden, als ursprünglich im Test angesetzt. Die Ausgangs-Zellzahl betrug im Ansatz jeweils 100.000 Zellen/well.
3. Aufgrund der Zellherkunft aus jeweils einem definierten Zell-Stock und der strikt identisch parallelen Versuchsansätzen wird postuliert, dass sich die einzelnen Zellen innerhalb eines Ansatzes gleich verhalten haben, und die Sensitivität der Zellen innerhalb einer Linie als gleichbleibend angesehen werden konnten.

3.1.1 Zytotoxizität von DNP für PA-1 Zellen

Bei den unbehandelten Zellen der Linie pA1 zeigte sich, dass der LDH-Test den in den Versuch eingesetzten 100×10^3 Zellen schon nach 6 Stunden einen Aktivitätswert von $141 (\pm 4,1) \times 10^3$ Zellen zugeordnet hatte. Nach 24 h war die Zellzahl bereits auf $215 (\pm 3,8) \times 10^3$ angestiegen und hatte nach 48h das Maximum mit $352 (\pm 8,1) \times 10^3$ Zellen erreicht. Dies entspricht einer durchschnittlichen Zellverdopplungszeit von 18h.

Generell hat sich das Ansprechen auf DNP mit steigender Zellzahl nach vorne verschoben: während bei 6h erst bei $100 \mu\text{M}$ DNP die Zellzahl unter diejenige der unbehandelten Kontrolle sank (nicht signifikant), ist der proliferationshemmende Effekt von DNP bei 24h und 48h Inkubationszeit bereits bei $50 \mu\text{M}$ signifikant gewesen ($p=0.03$), was jedoch auch auf die längere Einwirkzeit zurückzuführen sein könnte. Ein zytotoxischer Effekt von DNP war nur bei der Konzentration von $200 \mu\text{M}$ auf 48h proliferierende Zellen zu beobachten, hier sank die Zellzahl auf $69.4 (\pm 2.7) \times 10^3$ und damit deutlich unter den Ausgangswert von 100×10^3 in den Test eingesetzten Zellen.

Diese Konzentration wirkte bei 24h bereits zytostatisch, hier blieben die Zellen auf Ausgangsniveau.

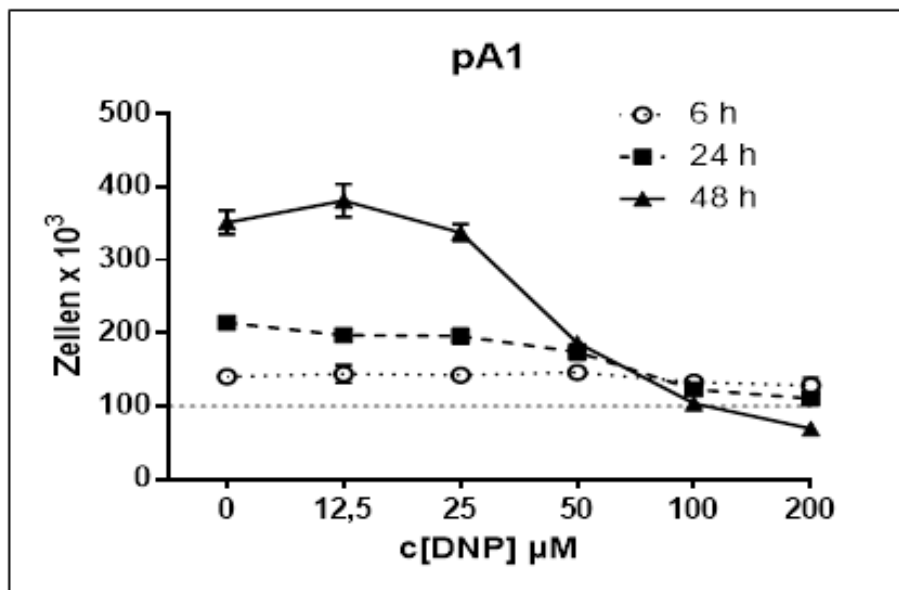


Abb. 3.3: Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von intakten, adhärenen pA1 Zellen unter dem Einfluss von 0 - 200µM DNP nach 6h, 24h und 48h – Inkubationszeit. Bereits nach 6 Stunden zeigt sich eine leicht gesteigerte Zellzahl durch Zellteilung, ein DNP Effekt ist nicht zu beobachten. Dieser wird mit steigender Inkubationszeit ausgeprägter und nach 48h zeigt ein Abfallen der Zellen unter die Ausgangsmenge einen Zytotoxischen Effekt ab 100µM, niedrigere Konzentrationen scheinen einen zytostatischen Effekt auszuüben.

Der Kurvenverlauf der 48h Inkubation zeigte mit 12,5µM DNP einen höheren Verlauf als die unbehandelten Zellen, was einen proliferationsfördernden Effekt nahelegen könnte, wobei der Ansatz mit 25µM DNP scheinbar keinen Einfluss auf die Zellen hatte.

3.1.2 Zytotoxizität von DNP für Keratinozyten

Bei den unbehandelten Zellen der Linie HACAT ordnete der LDH-Test den in den Versuch eingesetzten 100×10^3 Zellen nach 6 Stunden bereits einen Aktivitätswert von $251 (\pm 20,6) \times 10^3$ Zellen zu. Nach 24h war die Zellzahl auf $565,5 (\pm 56,7) \times 10^3$ angestiegen und hatte nach 48h das Maximum mit $846 (\pm 48,1) \times 10^3$ Zellen erreicht.

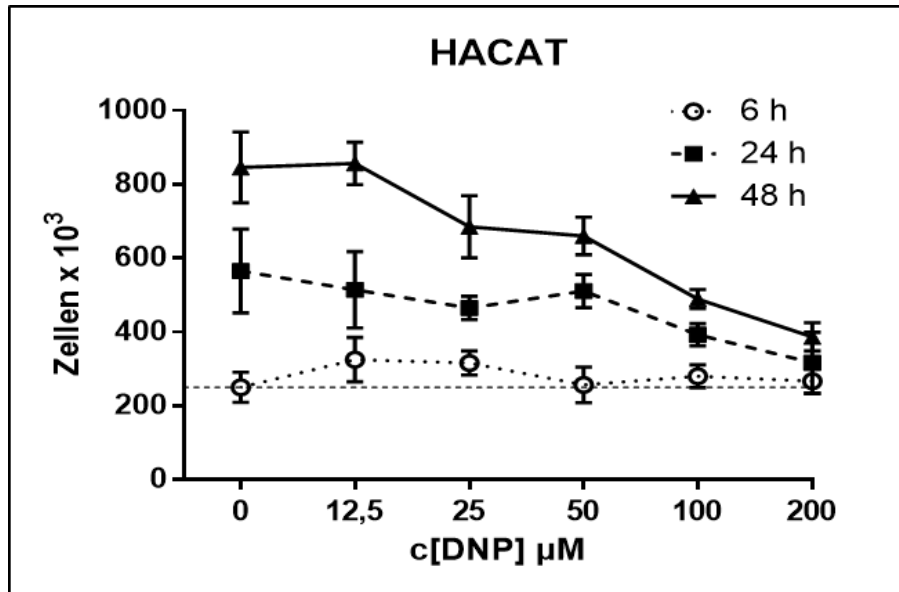


Abb. 3.4: Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von intakten, adhärenenten HACAT- Zellen unter dem Einfluss von 0 - 200µM DNP nach 6h, 24h und 48h – Inkubationszeit. Man sieht eine dosisabhängige Hemmung des Zellwachstums bereits ab 25µM.

Insgesamt hat sich das Ansprechen auf DNP mit steigender Zellzahl und höherer Inkubationszeit nach vorne verschoben. Ein proliferationshemmender Effekt von DNP war bei 24h bei 200µM signifikant und bei 48h bereits bei 25µM ($p=0,03$). Eine zytotoxische oder zytostatische Wirkung wurde nicht erreicht. Die Hemmung des Zellwachstums verlief dosisabhängig.

3.1.3 Zytotoxizität von DNP für BT-20 Zellen

Unterschiedliche DNP-Konzentrationen zeigten hier, ähnlich den pA1- Zellen, unterschiedliche Effekte auf die Proliferation.

Bei den unbehandelten BT-20 Zellen ordnete der LDH-Test den in den Versuch eingesetzten 100×10^3 Zellen nach 6 Stunden einen Aktivitätswert von $266 (\pm 6) \times 10^3$ Zellen zu. Dieses würde tatsächlich einer starken Proliferation mit einer mehr als Verdopplung der Zellen innerhalb 6h entsprechen. Da sich nach 24h keine signifikante Änderung der Zellzahl zeigte und BT20 relativ langsam wachsende Zellen sind, gingen wir davon aus, dass tatsächlich 266 Zellen eingesetzt worden sind und eine deutliche Proliferation erst bei 48h aufgezeigt werden konnte. Nach 48h ist der Aktivitätswert auf das Maximum mit $349 (\pm 14) \times 10^3$ Zellen gestiegen.

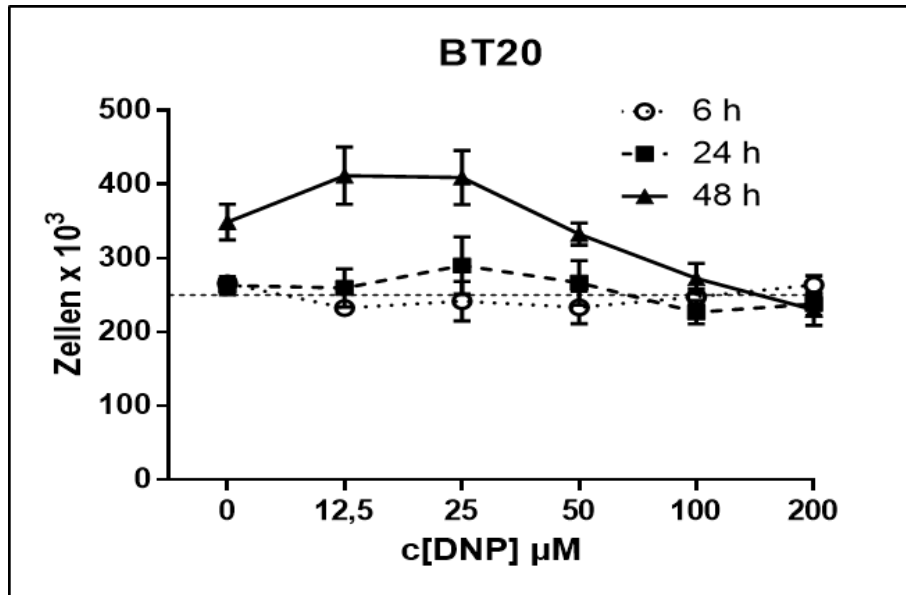


Abb. 3.5: Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von intakten, adhärenen BT20-Zellen unter dem Einfluss von 0 - 200µM DNP nach 6h, 24h und 48h – Inkubationszeit. Bereits nach 6 Stunden zeigt sich eine deutlich gesteigerte Zellzahl durch Zellteilung, ein DNP Effekt ist nicht zu beobachten. Dieser wird mit steigender Inkubationszeit ausgeprägter. Ein zytostatischer oder zytotoxischer Effekt wird nicht erreicht.

Ein proliferationsverlangsamender Effekt von DNP zeigte sich bei 6 h bereits stabil ab 12,5µM, nach 24h ab 100µM und nach 48h ab 50µM.

Ein zytostatischer oder zytotoxischer Effekt von DNP wurde nicht erreicht.

3.1.4 Zytotoxizität von DNP für MDA-MB 231 Zellen

Der LDH-Test ordnete den im Versuch eingesetzten 100×10^3 Zellen nach 6h einen Aktivitätswert von $84,1 (\pm 7,1) \times 10^3$ Zellen zu.

Alle Aktivitätswerte der 6h-Ernte wiesen niedrigere Werte als im Ansatz auf, so dass von einem frühen Absterben eines Teils der Zellen, bzw. einer Einstellung der Zellaktivität ausgegangen werden muss. Obwohl 100×10^3 Zellen angestrebt worden sind, wurde somit der 6h- Wert als stabiler Ausgangswert gesetzt.

Nach 48h war die Zellzahl auf das Maximum mit $187 (\pm 15,3) \times 10^3$ angestiegen.

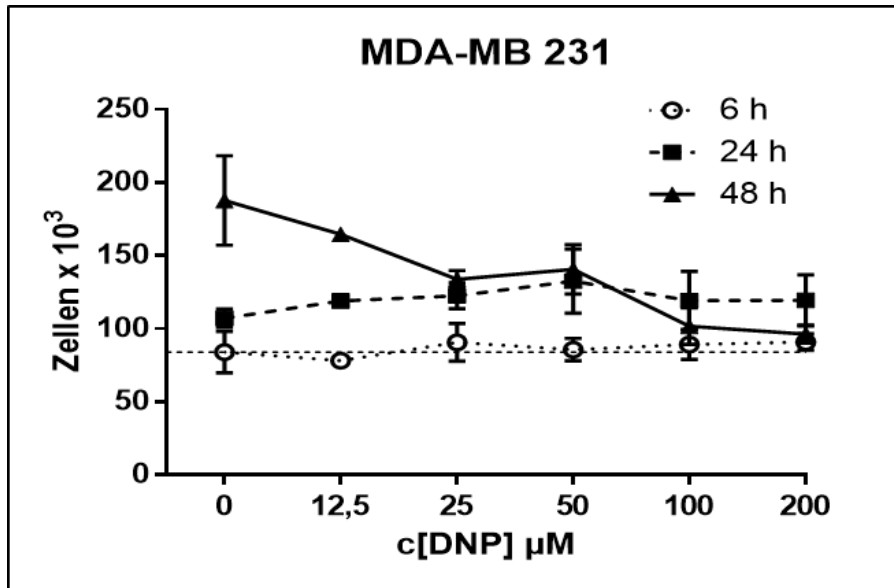


Abb. 3.6: Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von intakten, adhärennten MDA-MB 231-Zellen unter dem Einfluss von 0 - 200µM DNP nach 6h, 24h und 48h – Inkubationszeit. Im 24h-Ansatz zeigt sich eine gesteigerte Zellzahl durch Zellteilung, ein DNP Effekt ist nicht zu beobachten, wird jedoch mit steigender Inkubationszeit signifikant. Im 48h Ansatz stellt sich eine dosisabhängige Hemmung des Zellwachstums dar.

Unterschiedliche DNP-Konzentrationen zeigten auch hier unterschiedliche Effekte auf die Proliferation. Während im 24h-Ansatz alle DNP-Konzentrationen einen proliferationsfördernden Effekt aufwiesen, war im 48h-Ansatz eine Proliferationsverlangsamung bereits ab 12,5µM zu vermerken.

Ein proliferationshemmender Effekt von DNP wurde bei 25µM signifikant ($p=0.03$). Ein zytotoxischer Effekt von DNP ist nur bei der Konzentration von 200µM auf 48h proliferierende Zellen zu beobachten gewesen, hier sank die Zellzahl mit $96.3 (\pm 3) \times 10^3$ unter den Ausgangswert von 100×10^3 Zellen. Bei gleicher Inkubationszeit wirkte eine Konzentration von 100µM DNP bereits zytostatisch, hier blieben die Zellen mit $101,8 (\pm 6,3) \times 10^3$ auf Ausgangsniveau.

3.1.5 Vergleich aller Zelllinien

Allen Zelllinien gemeinsam war eine Wachstumshemmung bei einer höheren Konzentration von DNP und im längsten Versuchsansatz von 48h.

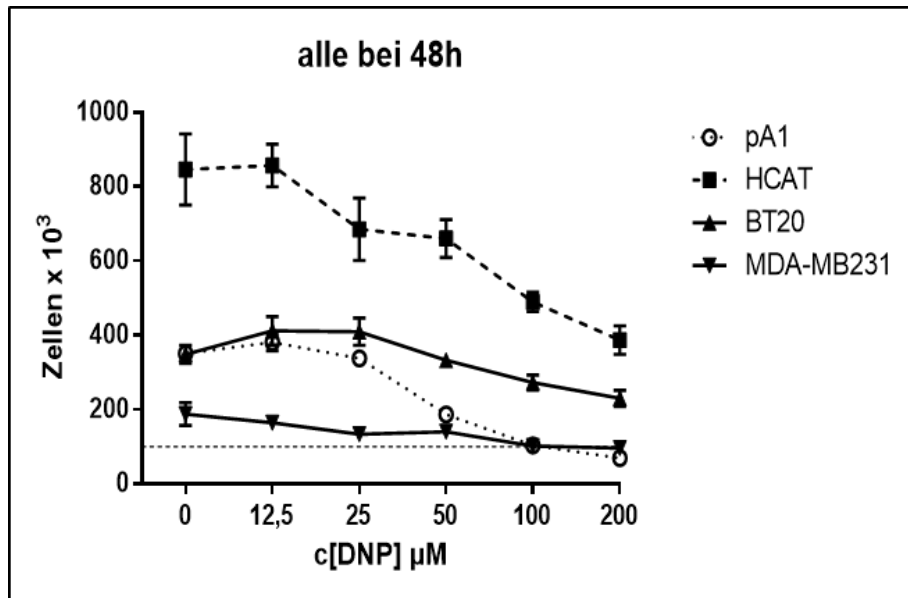


Abb. 3.7: Vergleich der Zellzahlverläufe aus Messungen der LDH von intakten, adhärenen pA1, HCAT, BT20 und MDA-MB 231-Zellen unter dem Einfluss von 0 - 200 μM DNP nach 48h – Inkubationszeit.

MDA-MB und HCAT reagierten hierbei am sensibelsten hinsichtlich der DNP-Konzentration. Bei einer DNP-Konzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ zeigte sich bereits eine signifikante Proliferationshemmung. Hinsichtlich der Zeit reagierten die pA1- Zellen am sensibelsten, denn sie wiesen als einzige Zelllinie eine signifikante Wachstumshemmung, bereits nach 24h ab einer DNP-Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ auf. BT20- Zellen zeigten eine ähnliche Tendenz ab einer DNP-Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$.

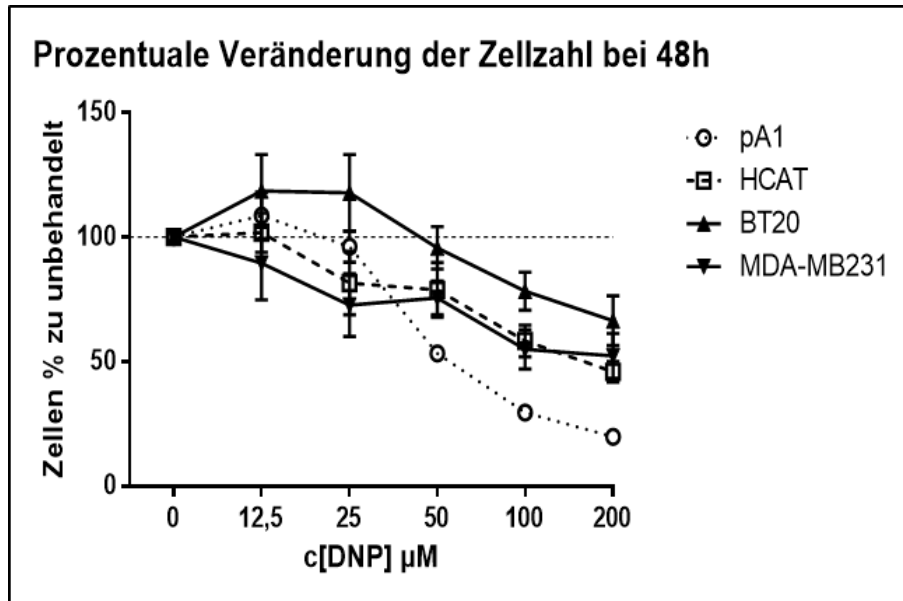
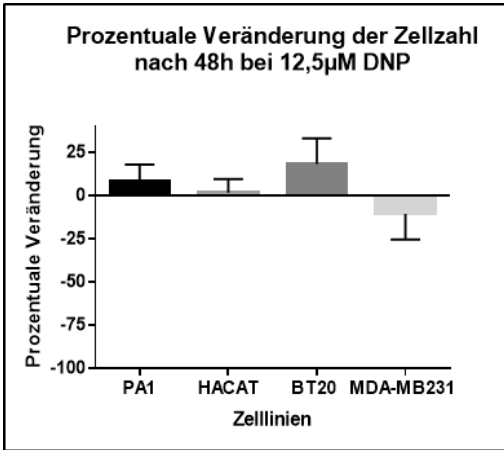


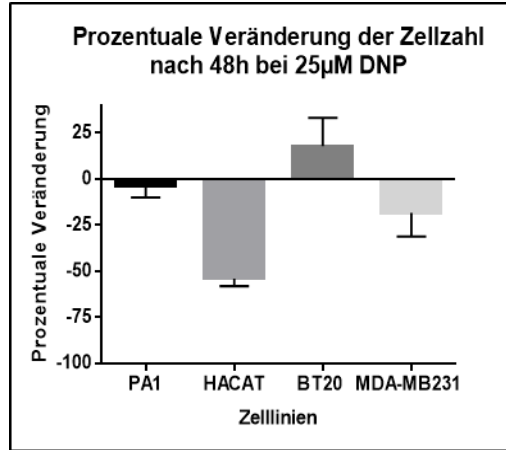
Abb. 3.8: Vergleich der prozentualen Zellzahlverläufe der Mittelwerte aus Messungen der LDH von intakten, adhärenen pA1, HCAT, BT20 und MDA-MB 231-Zellen unter dem Einfluss von 12,5 - 200 µM DNP nach 48h – Inkubationszeit im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (DNP=0).

Signifikante Unterschiede in den prozentualen Kurvenverläufe fanden sich bereits ab einer Zugabe von 25µM DNP, die größten Unterschiede zeigten sich jedoch bei 100µM und 200µM DNP.

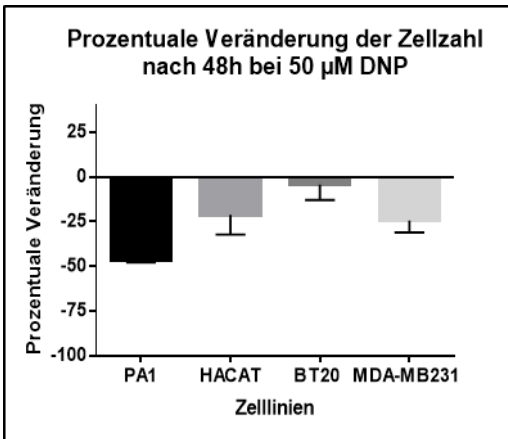
Eine dosisabhängige Auswirkung auf die Proliferation imponierte in allen Zellen, unter den Tumorzellen jedoch am eindrucksvollsten bei PA1.



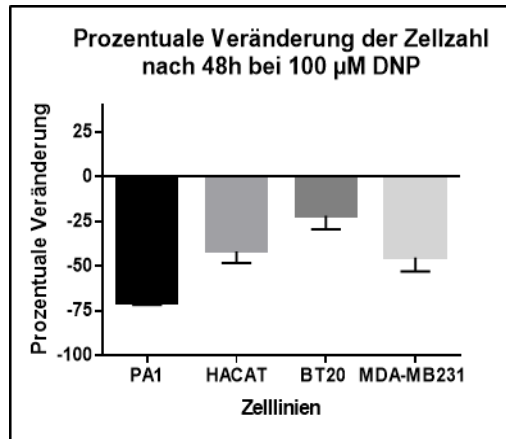
Kruskal-Wallis H Test: nicht signifikant



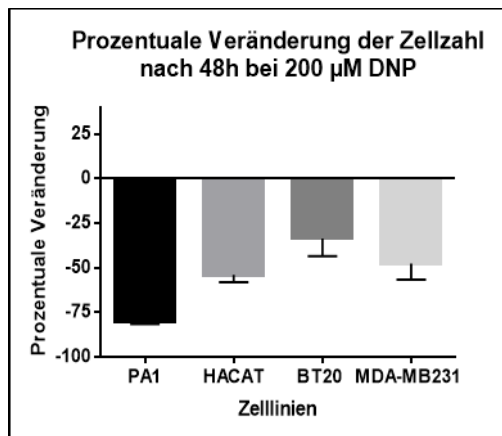
Kruskal-Wallis H Test: $p < 0.0001$



Kruskal-Wallis H Test: $p = 0.02$.



Kruskal-Wallis H Test: $p = 0.0001$.



Kruskal-Wallis H Test: $p = 0.001$

Abb. 3.9 Varianzanalyse mittels Kruskal-Wallis H Test als nicht parametrischer Mittelwertvergleich bei mehr als 2 Stichproben.

3.1.6 IC50 aller Zelllinien bei 48h

Zur Verdeutlichung der Wirkstärke des DNP als Entkoppler wurde diejenige Konzentration ermittelt, welche für eine 50%ige Hemmung nötig war (IC50, inhibitory concentration). Für die IC50-Berechnungen wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt und der jeweilige IC50-Wert mittels linearer Interpolation und Microsoft Excel berechnet. Hierzu wurden die Zellen ohne Zugabe des Entkopplers (DNP=0) als Referenz (100%) gesetzt und die Zellen oberhalb und unterhalb der gesuchten Hemmkonzentration linear interpoliert. Als Ausgangswerte dienten die Zellen im 48h-Ansatz.

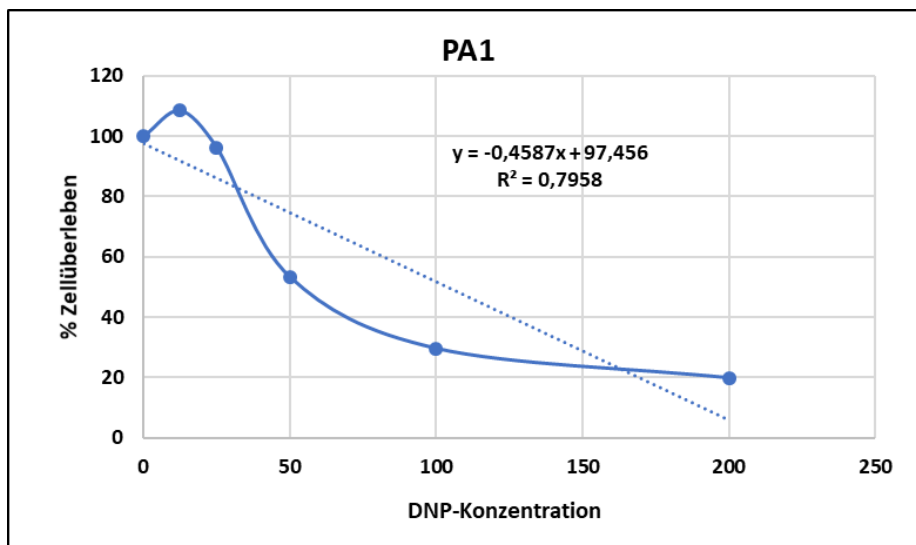


Abb. 3.10: Regressionsgerade der Dosiswirkungskurve von 0-200µM DNP der pA1-Zellen bei 48h.

Bei den PA1-Zellen betrug die IC50 103µM. Das bedeutet, dass bei einer Konzentration von ca.100 µM DNP die maximale Proliferation auf 50% abfiel.

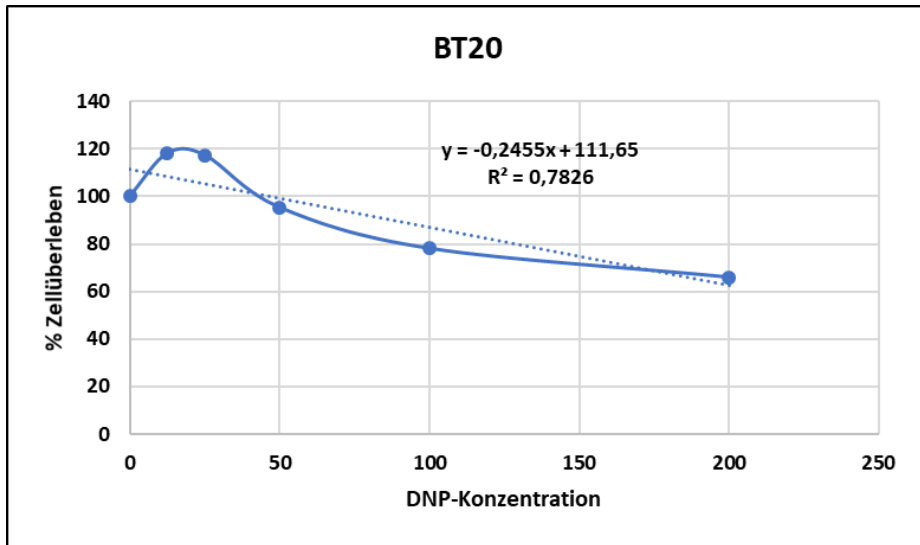


Abb. 3.11: Regressionsgerade der Dosiswirkungskurve von 0-200µM DNP der BT20 -Zellen bei 48h.

Für die Zelllinie BT20-Zellen errechnete sich eine IC50 von 251µM.

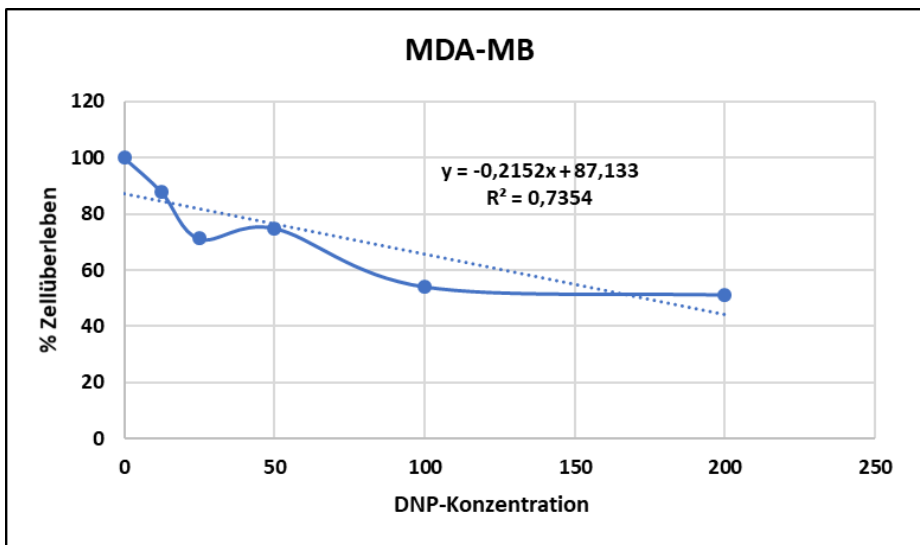


Abb. 3.12: Regressionsgerade der Dosiswirkungskurve von 0-200µM DNP der MDA-MB 231 -Zellen bei 48h.

Die IC50 der MDA-MB-Zellen betrug 173µM DNP.

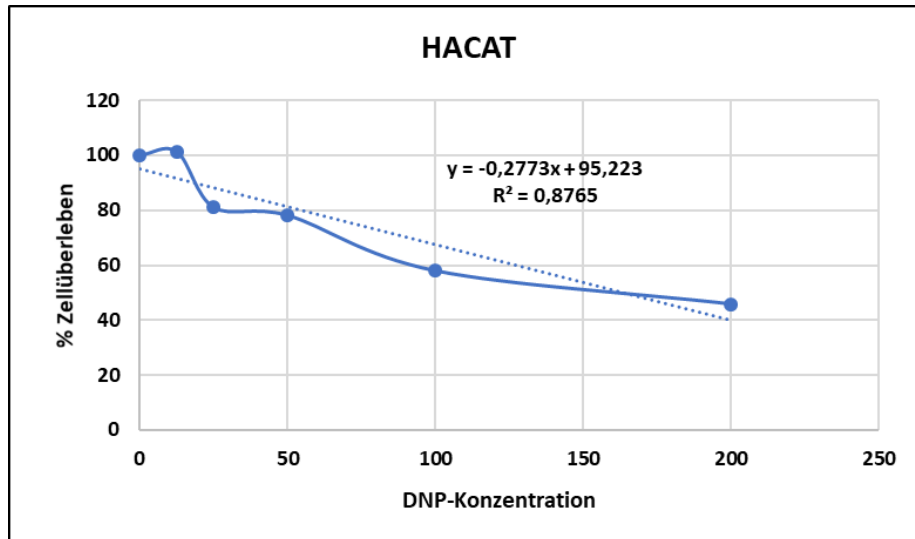


Abb. 3.13: Regressionsgerade der Dosiswirkungskurve von 0-200µM DNP der HACAT-Zellen bei 48h.

Die IC50 der HACAT-Zellen betrug 163µM DNP.

Wie N. Pfetzer bereits herausgestellt hatte (32), ist eine IC50- Berechnung mittels linearer Interpolation mit Microsoft Excel nur für eine grobe Abschätzung der Hemmkonzentration geeignet.

Im Vergleich von nichtlinearen und linearen Interpolationen hatte sich dort eine prozentuale Abweichung von 1% bis 77% gezeigt, so dass die ermittelten Werte sicherlich nur als Näherung zu verstehen sind.

Die IC50 von pA1 lag mit 103 µM DNP deutlich unter der IC50 der Keratinozyten. Die IC50 von HACAT betrug 163µM und war damit niedriger als die IC50 beider Mammakarzinom-Zelllinien. BT20 schien am resistentesten bei der höchsten gemessenen IC50 von 251µM.

3.2 Mikrokolorimetrie

3.2.1 BT-20

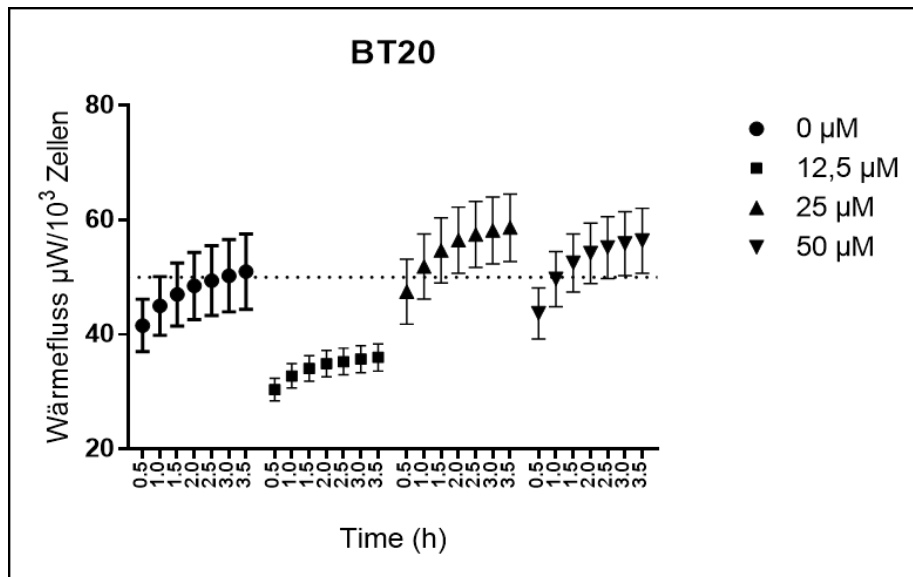


Abb. 3.14: Ergebnisse der mikrokolorimetrischen Messungen der BT 20-Zelllinie unter 0-200 µM 2,4-DNP bei 0,5h – 3,5h. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte des Wärmeflusses (µW) aller Versuche mit BT20 bei den entsprechenden DNP-Konzentrationen bezogen auf 1000 Zellen.

Beim Betrachten der Mittelwerte des Wärmeflusses/100.000 Zellen ließ sich bei allen Ansätzen im gemessenen Zeitintervall eine Steigerung des Wärmeflusses beobachten. Auffällig war ein deutlich niedriger Wärmefluss bei 12,5µM DNP.

Bei allen BT20 Zellen im Untersuchungsansatz hat sich eine nur geringe prozentuale Zunahme des Wärmeflusses gegenüber dem Ausgangswert gezeigt, was auf eine Steigung der Wärmefreisetzung der Zellen rückschließen ließ. Am deutlichsten war eine Zunahme bei 3,5h im Ansatz mit 50µM DNP zu vermerken, hier lag der Wert über dem der Kontrolle.

Am geringsten ausgeprägt war die Zunahme des Wärmeflusses über die gesamte Messzeit bei 12,5µM DNP.

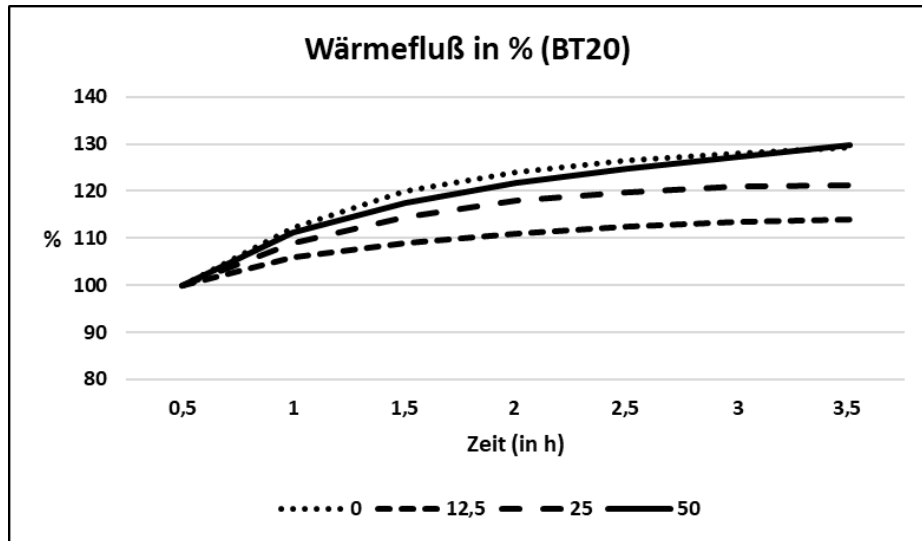


Abb. 3.15: Analyse der mikrokalorimetrischen Messung des prozentualen Wärmeflusses in Bezug auf den Ausgangswert bei 0,5h bei BT20-Zellen bei 0,5h – 3,5h. Die zugrundeliegenden Daten sind jeweils die Mittelwerte des Wärmeflusses (μW) aller Versuche mit BT20 bei den entsprechenden DNP-Konzentrationen.

Interessanterweise konnte mit dem Einsatz des Entkopplers keine signifikante Steigerung der Wärmefreisetzung der Zellen dokumentiert werden, denn auch in der Kontrolle (DNP=0 μM) war eine deutliche Zunahme des Wärmeflusses im gemessenen Zeitintervall zu beobachten, was vermutlich durch die Proliferationsaktivität der Zellen zu erklären ist.

Die Kurve der Kontrolle zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die des Ansatzes mit 12 μM DNP, jedoch mit deutlich höheren Werten. Die Zentralwerte des Wärmeflusses wiesen bei 0 μM DNP nach 2h ihr Maximum auf, bei 12,5 μM DNP erst bei 2,5h und 3h.

Mit höherer DNP-Wirkdauer ging über die Messdauer eine höhere Wärmefreisetzung einher. Die Kurvenverläufe von 25 μM und 50 μM DNP hatten ihr Maximum noch nicht erreicht, zeigten aber bei 3,5h bzw. 3h höhere Werte als die Kontrolle.

Anders als für den Entkoppler erwartet, liegen nicht alle Kurven der DNP-Ansätze über der Kontrolle ohne Entkoppler.

3.2.2 MDA-MB231

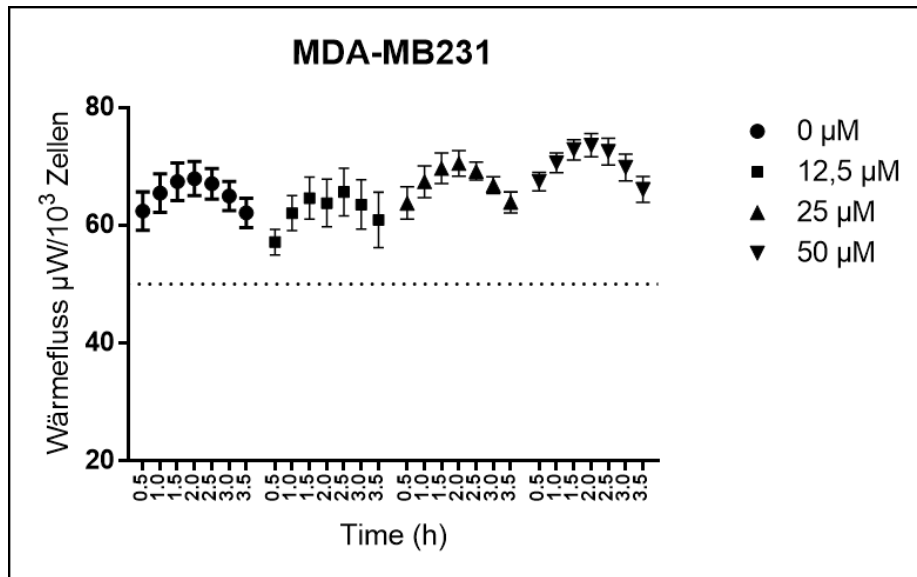


Abb. 3.16: Ergebnisse der mikrok calorimetrischen Messungen der MDA-MB 231-Zelllinie unter 0-50 μM 2,4-DNP bei 0,5h – 3,5h. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte des Wärmeflusses (μW) aller Versuche mit MDA—MB 231 bei den entsprechenden DNP-Konzentrationen bezogen auf 1000 Zellen.

In fast allen Ansätzen, auch der Kontrolle mit 0 μM DNP, ließ sich eine Abnahme des Wärmeflusses unter den Ausgangsmesswert im gemessenen Zeitintervall beobachten. Am deutlichsten ausgeprägt war dieses im Ansatz mit 50 μM DNP. Bei 12,5 μM DNP sank der Wärmefluss ebenfalls, hatte jedoch noch nicht das Niveau des Ausgangswertes erreicht.

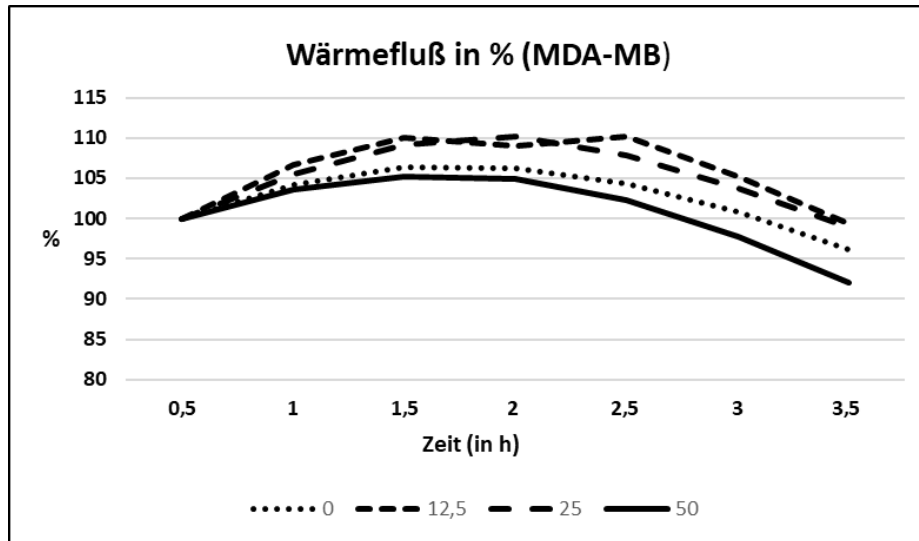


Abb. 3.17: Analyse der mikrokalorimetrischen Messung des prozentualen Wärmeflusses in Bezug auf den Ausgangswert bei 0,5 h bei MDA-MB 231-Zellen bei 0,5 h – 3,5 h. Die zugrundeliegenden Daten sind jeweils die Mittelwerte des Wärmeflusses (μW) aller Versuche mit MDA-MB 231 bei den entsprechenden DNP-Konzentrationen.

Die MDA-MB- Zellen zeigten als einzige der untersuchten Zelllinien eine prozentuale Abnahme des Wärmeflusses gegenüber dem Ausgangswert der Messungen. Ein prozentuales Absinken der Wärmefreisetzung ließ sich bei den unbehandelten Zellen (DNP= $0\mu\text{M}$) und im Ansatz mit $50\mu\text{M}$ DNP bereits nach 2 h beobachten, bei $25\mu\text{M}$ DNP nach 2,5h. Bei Zugabe von $12,5\mu\text{M}$ DNP gab es eine Abnahme nach 3h. Der Einbruch des Graphen bei 2h lässt sich am ehesten auf den Verbrauch des Mediums zurückführen, mit konsekutiver Reduzierung des Stoffwechsels bei aufgebrauchtem Substrat.

Die höchste DNP-Dosis wies über die gesamte Messzeit die niedrigste Zunahme des prozentualen Wärmeflusses auf, jedoch die größte Abnahme über die Wirkdauer.

Die Kurve im $12,5\mu\text{M}$ DNP-Ansatz zeigte den niedrigsten Verlauf. Mit höheren DNP-Dosierungen ging über die Messdauer eine höhere Wärmefreisetzung einher. $50\mu\text{M}$ DNP hatte hier bereits bei 1,5h einen toxischen Einfluss.

Die maximale Wärmefreisetzung war bei $12,5\mu\text{M}$ DNP nach 1,5h erreicht, 0,5h früher als in allen anderen Ansätzen.

3.2.3 HACAT

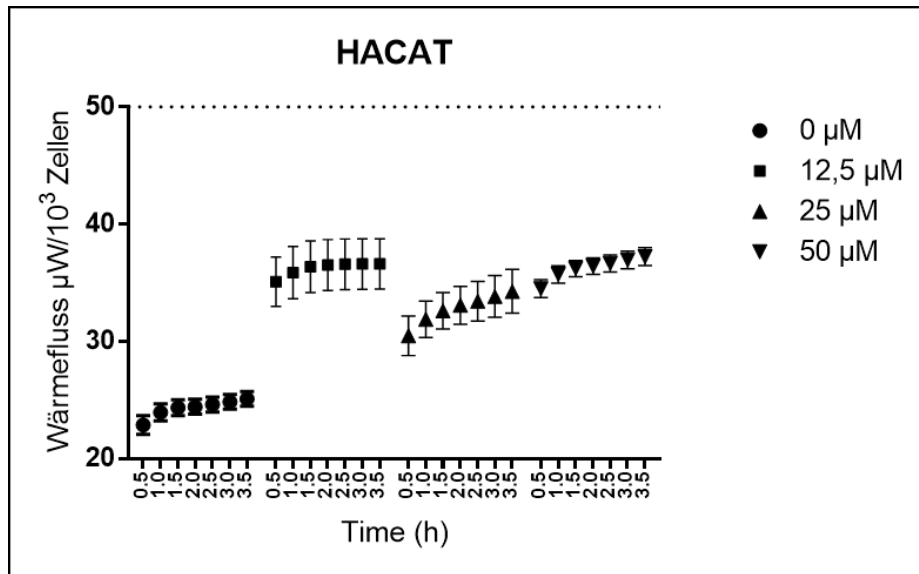


Abb. 3.18: Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen der HACAT-Zelllinie unter 0-50µM 2,4-DNP bei 0,5h – 3,5h. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte des Wärmeflusses (µW) aller Versuche mit HACAT bei den entsprechenden DNP-Konzentrationen bezogen auf 1000 Zellen.

Der Wärmefluss zeigte bei fast allen DNP-Konzentrationen eine prozentuale Zunahme gegenüber dem Ausgangswert, am deutlichsten ausgeprägt war dieser Anstieg im Ansatz mit 25 µM DNP nach 3,5h. Eine deutliche Steigerung ließ sich auch in der Kontrolle (DNP=0) beobachten, was für eine aktive Zellteilung spricht.

Den geringsten prozentualen Wärmeflusszuwachs wiesen die Zellen im 12,5µM DNP-Ansatz auf. Sie hatten bereits nach 2h ein Plateau erreicht.

Fast alle Kurven wiesen einen ähnlichen Verlauf mit direkter Wechselbeziehung zwischen Wärmefreisetzung und steigender Wirkdauer auf. Ein Maximum wurde in allen Ansätzen noch nicht erreicht.

Deutlich wurde die dosisabhängige Steigerung der Wärmebildung, wobei die Zentralwerte des Wärmeflusses von 12,5µM DNP interessanterweise über den 25µM DNP-Werten lagen. Alle Messwerte mit Entkoppler verliefen jedoch über der Kontrolle mit 0µM DNP.

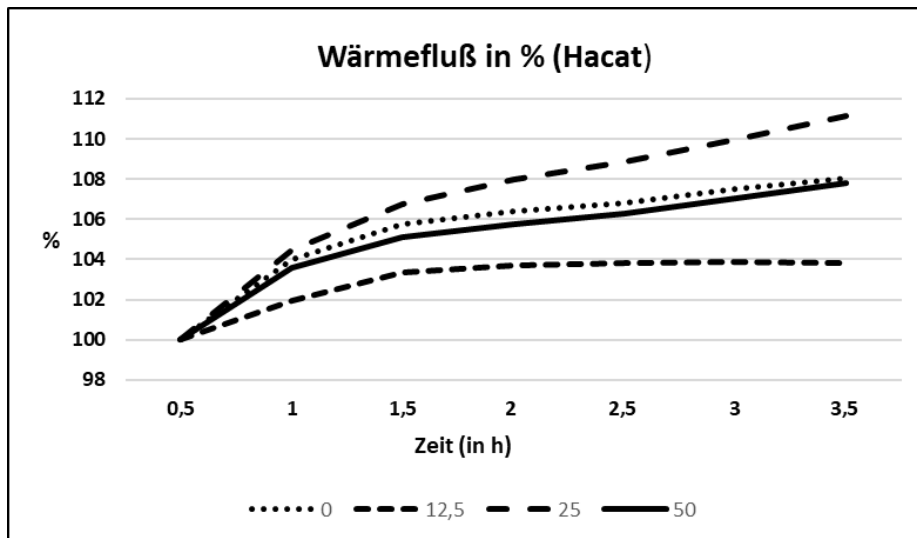


Abb. 3.19: Analyse der mikrokolorimetrischen Messung des prozentualen Wärmeflusses in Bezug auf den Ausgangswert bei 0,5h bei HACAT-Zellen bei 0,5 h – 3,5 h. Die zugrundeliegenden Daten sind jeweils die Mittelwerte des Wärmeflusses (μW) aller Versuche mit HACAT bei den entsprechenden DNP-Konzentrationen.

3.2.4 Vergleich aller Zelllinien

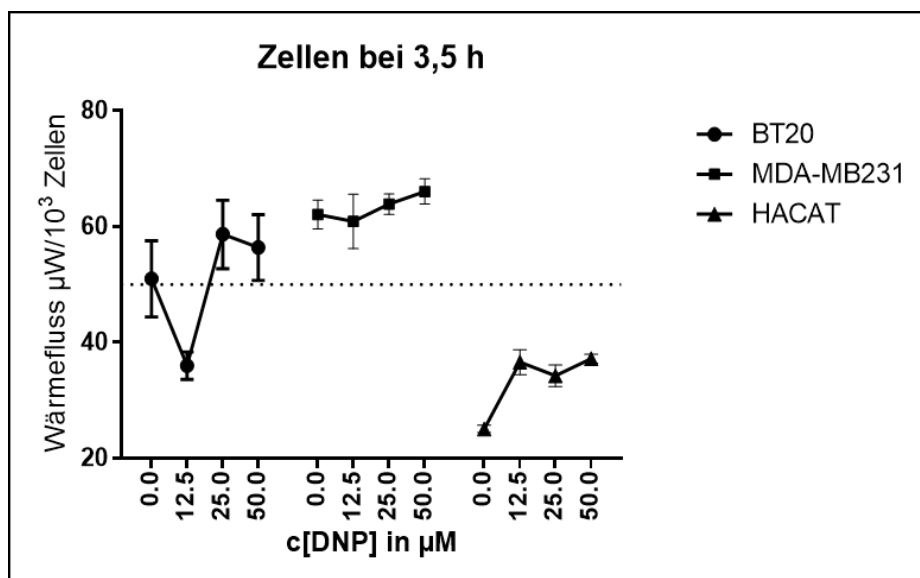


Abb. 3.20: Vergleich der mikrokolorimetrischen Messungen der BT20-, MDA-MB 231-, und HACAT-Zelllinien unter 0-200 μM 2,4-DNP bei 3,5h. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte des Wärmeflusses (μW) aller Versuche bei den entsprechenden DNP-Konzentrationen bezogen auf 1000 Zellen.

Den BT20- und HACAT- Zellen gemeinsam war eine positive Korrelation zwischen Wärmefreisetzung und steigender Wirkdauer. Dieses Verhalten zeigten initial auch die MDA-MB-231 Zellen, jedoch sank hier der Wärmefluss kontinuierlich bei allen Zellen ab einer Messzeit von 2h, bzw. 2,5h bei dem Ansatz mit 25µM DNP ab.

Es konnte aufgezeigt werden, dass höhere DNP-Konzentrationen tendenziell in allen Zelllinien zu einer vermehrten Wärmefreisetzung führten. Bei den benignen HACAT-Zellen zeigte sich der 25µM DNP-Ansatz der Kontrolle von Anfang an überlegen, der 50µM DNP-Ansatz annähernd ab 3,5h, hier reichte die Messzeit jedoch nicht aus, um eine statistische Relevanz aufzuzeigen.

4. DISKUSSION

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, zu überprüfen, ob der Entkoppler 2,4-DNP dosisabhängig durch thermischen und metabolischen Stress zu einer früheren Schädigung in malignen als in benignen Zellen führt, um damit einen Hinweis auf sein mögliches Potential für einen therapeutischen Einsatz darzulegen. Es war in diesem Zusammenhang vor allem wichtig, optimierte Bedingungen für künftige Experimente herauszufinden.

Vor diesem Hintergrund konnten wir beobachten, dass 2,4-DNP in das Wachstum aller untersuchten Zellarten eingriff. Dieser Effekt war umso ausgeprägter, je länger die Inkubationszeit war. Eine dosisabhängige Proliferationshemmung und somit ein Eingreifen in die Zellvitalität ließ sich ebenfalls in allen vier Zelllinien beobachten.

Bin Wu et al. hatten bereits aufgezeigt, dass eine milde mitochondriale Entkopplung durch 2,4-DNP in gewichtsneutraler Dosierung die Widerstandsfähigkeit des Neurons gegenüber Stress reduziert und bei Vorhandensein von neurodegenerativen Störungen über eine Reduzierung des oxidativen Stresses neuronales Überleben sogar erleichtert (2). Gestützt wird diese Beobachtung durch die Daten von Lee et al. (21) und Andrew Stewart (35). Diese zeigten ebenfalls, dass 2,4-DNP in niedrigen Dosierungen über Modifizierung der zellularen Stressantwort dopaminerge Neuronen vor

Neurodegeneration schützt, währenddessen hohe Dosen zu einer ausgeprägten Neurodegeneration führten.

Zellschädigung lässt sich verlässlich mit Hilfe eines LDH Zytotoxizitätstests nachweisen, wobei das Ausmaß der Schädigung nach Wang et al. (39) mit der Höhe des freigesetzten LDHs korreliert. Betrachtet man die Ergebnisse der Chemotoxizitätsmessungen, so ließ sich eine signifikante Zytotoxizität nur für hohe DNP-Werte bei langer Inkubationszeit bei der Zelllinie PA1 und MDA-MB 231 nachweisen, daher wäre für künftige Testungen sicherlich eine Mindestinkubation von 48h nötig. Aufgrund der langsamen Proliferation nach 24h waren noch keine ausgeprägten Effekte zu sehen. Da das Gefälle der Geraden negativ mit der Länge der Inkubationszeit korrelierte, stellt sich die Annahme, dass bei einem länger dauernden Ansatz eine Zytotoxizität auch schon bei niedrigeren DNP-Konzentrationen nachweisbar wäre.

Bei den PA1- Zellen muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die ursprüngliche Zählung nicht akkurat war und die Zellen nur bei 6h adhärent geblieben sind, da erst bei 24h eine Proliferation zu verzeichnen ist und sich gleichzeitig der hemmende Effekt von DNP zeigt. Hier gilt auch zu bedenken, dass die pA1-Zellen in vitro eine limitierte Eigenschaft zur Differenzierung aufweisen und somit eine große Variabilität an Morphologie zeigen (44), wie bereits J. Zeuten herausstellte. So sind sie unter Bedingungen, welche die Adhäsion am Substrat erschweren, in der Lage, Gewebe aus unterschiedlichen Zellschichten zu bilden.

Der LDH-Test ordnete den im Versuch eingesetzten unbehandelten 100x103 PA1-Zellen (DNP = 0 μ M) schon nach 6 Stunden einen Aktivitätswert von 140 (\pm 4,1) x103 Zellen zu. Die Zellen wiesen entweder eine sehr hohe Enzymaktivität nach 6 Std. ohne Teilung auf, oder sie hatten sich bereits schnell geteilt. Da eine Proliferation der Zellen bereits im ersten Intervall zu erwarten gewesen wäre, müsste eine erneute Testung mit mehreren Ansätzen erfolgen, um ein exakteres Zellwachstum aufzuzeigen.

Die Auswirkungen der unterschiedlichen DNP-Konzentrationen wurden parallel zu den Chemotoxizitätstests in den mikrokalorischen Messungen untersucht. Jede Form der Energieänderung in Zellen geht letztendlich mit einer Freisetzung von Wärme einher. Diese thermischen Effekte lassen sich in vitro durch das hochsensible Messverfahren der Mikrokalorimetrie erfassen (3). Obwohl kleinste Wärmefreisetzungen bis in den Nanobereich dargestellt werden können, gab es lange Zeit nur wenige Erfahrungen mit

der Analyse von geschlossenen Systemen. F. Gonnert etablierte ein Messsystem, welches sich zur Bestimmung von Dosis-Wirkungsbeziehungen von unterschiedlichsten Gewebezellen eignete, und welches wir für die Messungen verwendeten (13).

Der in den LDH-Tests dargestellte dosisabhängige Effekt von 2,4-DNP konnte mikrokalorimetrisch in Form einer gesteigerten Wärmefreisetzung nachgewiesen werden, ebenso die positive Korrelation zwischen Wirkdauer und Wärmefreisetzung. Auffällig war ein geringerer Wärmefluss bei 12,5µM DNP im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, am deutlichsten ausgeprägt bei BT20. Dies könnte auf den „Crowding Effekt“ zurückzuführen sein. Unterschiedliche Konzentrationen von Proteinen und Makromolekülen in der Zelle führen nach Delarue et al. über Interaktionen zu einer Modulation des Zellverhaltens. Die verschiedenen Signalwege scheinen direkt die Ribosomenkonzentration in den Zellen zu kontrollieren (9), so dass die Zellen je nach Umgebungssituation und Substratangebot unterschiedliches Proliferationsverhalten aufweisen. Die Stoffwechselrate einer Zelle korreliert letztendlich negativ mit der Zunahme der Zellzahl in einer Kultur (13).

Aufgrund einer sehr starken Proliferation der mit 2,4-DNP behandelten Zellen in dem genannten Intervall kommt es zur Abnahme der Stoffwechselrate und somit zur Abnahme der Wärmefreisetzung. Dass der „Crowding Effekt“ hierfür verantwortlich ist, scheint aufgrund des anschließenden Kurvenverlaufes jedoch eher unwahrscheinlich, so dass auch eine Messungenauigkeit an dem Punkt nicht ausgeschlossen werden kann, denkbar z.B. durch falsches Bewachsen der Plättchen. In der prozentualen Zunahme des Wärmeflusses zeigte sich bei BT20 eine DNP-Konzentration von 50µM der Kontrolle überlegen.

Im Fazit ist zu sagen, dass die zu untersuchenden Zellen für ähnliche Versuche mindestens 48 Stunden zu kultivieren sind, da sie sich zunächst etablieren müssen, um eine stabile Proliferationsrate aufzuweisen.

4.2 Unterschiedliche Wirkung von 2,4-DNP auf benigne und maligne Zellen

In Zusammenschau aller Ergebnisse zeigte DNP eine zytotoxische Wirkung sowohl auf alle untersuchten malignen, als auch auf die benignen Zellenn. In den Zytotoxizitätstests zeigte sich ein statistisch relevanter Einfluss von DNP auf das Zellwachstum bei Tumorzellen ab einer Konzentration von 50µM bei einer 24h-Inkubationszeit bei den

Ovarialkarzinom- Zellen (PA-1) und ab 25 μ M bei 48h bei den Mammakarzinom- Zellen MDA-MB-231. Diese reagierten am sensibelsten hinsichtlich der DNP-Konzentration, während die zweite Mammakarzinom-Zelllinie BT20 keine statistisch relevante Proliferationshemmung in dem Messintervall aufwies. Dieses könnte auf ein im Verhältnis langsames Wachstum dieser Tumorzellen zurückzuführen sein oder aber auf eine besondere Stabilität. BT20 als Triple-negative breast cancer (TNBC) weist weder Rezeptoren für Östrogen oder Progesteron auf, noch für HER2 (human epidermal growth factor receptor 2). TNBC zeigen eine deutlich erhöhte aerobe Glykolyseaktivität verglichen mit Nicht-TNBC (19). Palorini et al. hatten unter Glukoseentzug bei MDA-MB-231 Zellen einen erhöhten Effekt des ATP-ase Inhibitors Oligomycin beobachtet (28). Sie schlussfolgerten daraus, dass MDA-MB 231 unter diesen Bedingungen verstärkt von der Oxidativen Phosphorylierung abhängig sind. Die MDA-MB-231 wiesen eine ähnliche Wachstumsrate auf wie die PA1-Zellen.

BT20 scheinen generell eine natürliche Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen zu besitzen. So konnten Klingelhoefter et al. eine deutlich höhere Resistenz dieser Tumorzellen gegenüber oxidativem Stress aufzeigen (17), vermittelt über eine hohe Katalaseaktivität, insbesondere gegenüber MDA-MB 231. Dieses deckt sich mit unseren Ergebnissen, in denen BT-20 sich sehr robust gegenüber DNP zeigt. Sie proliferierten noch bis zu einer Dosis von 25 μ M, erst danach trat ein hemmender Effekt ein. Passend dazu lag die IC₅₀ von BT20 deutlich über der IC₅₀ von MDA-MB 231.

In den mikrokalorischen Messungen zeigte sich bei den benignen Keratinozyten (HACAT) der 25 μ M DNP-Ansatz der Kontrolle als von Anfang an überlegen, der 50 μ M DNP-Ansatz annähernd ab 3,5h. Hier reichte die gemessene Zeit jedoch nicht aus, um eine statistische Relevanz aufzuzeigen. Während bei den PA1-Zellen bei einer Konzentration von 50 μ M bereits kein Wachstum mehr stattfand, konnte bei den HACAT-Zellen noch Proliferation aufgezeigt werden. Erst bei einer DNP-Konzentration von 200 μ M sah man in den Zytotoxizitätstests eine signifikante Hemmung des Wachstums über 24h im Vergleich zu dem erwarteten Wachstum im Ansatz ohne DNP. Insgesamt wurde bei den Keratinozyten ein besonders dosisabhängiger Effekt des Entkopplers deutlich. Wie bereits F.Gonnert in seinen Untersuchungen postulierte (13), scheint DNP in seiner Funktion als Entkoppler aufgrund eines höheren Membranpotentials in malignen Zellen stärker angereichert zu werden als in benignen, was ein früheres Einleiten der Apoptose erklären könnte. Ein weiteres Kriterium von malignen Zellen ist

nach Tennant et al. ein veränderter metabolischer Umsatz mit sehr hohen Proliferationsraten, was insbesondere durch eine erhöhte Aktivierung der Glutaminolyse (37) und der aeroben Glykolyse (Wartburg Effekt) mit einer konsekutiven Überexpression von Glukosetransportern auf der Zelloberfläche erreicht wird, wie auch Ionescu et al. aufzeigen konnten (16). Somit scheinen diese Zellen sensibler zu sein für Entkoppler der Atmungskette. Mehdorn et al. haben verdeutlicht, dass die gesteigerte Aktivität der Atmungskette in den Mitochondrien der Tumorzellen mit einem gesteigerten Membranpotential, wie bereits genannt, einhergeht (24). Interessanterweise hatte die ATPase dort trotz des stark erhöhten Stoffwechsels keine höherer Anfälligkeit gegenüber Entkoppler-induzierter Depolarisation aufgewiesen. F. Gonnert hingegen konnte bei PA1-Zellen nachweisen, dass 2,4-DNP in höheren Dosierungen in der Lage ist, den initialen Wärmefluss dosisabhängig zu steigern, während die prozentuale Steigerung des Wärmeflusses keine Unterschiede zwischen den getesteten Dosisstufen hervorbrachte (13). Er schloss daraus, dass 2,4-DNP direkt nach Zugabe eine sofortige, je nach Dosisstufe unterschiedlich starke Erhöhung der basalen Stoffwechselrate und somit des Wärmeflusses bedingt. Die anschließenden prozentualen Steigerungen des Wärmeflusses hingegen waren unabhängig von der Dosisstufe. Dieses konnte in unseren Messungen nicht bestätigt werden. In den malignen Zelllinien war ebenfalls eine prozentuale Steigerung abhängig von der Dosisstufe zu beobachten.

Dass der Kurvenverlauf der MDA-MB-Zellen in den Zytotoxizitätstests bereits einen früheren Effekt bei einer niedrigeren DNP-Konzentration zeigte, stützt die Vermutung, dass Tumoren dieser Zellart sensibler für DNP sind als Zellen vom pA1-Typ und somit leichter hierfür angreifbar. N. Pfetzer hatte beobachtet, dass MDA-MB 231-Zellen eine extrem hohe Grundaktivität zeigen und sich unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen extrem gut den Umgebungsbedingungen anpassen können (32). So ließ sich unter hypoxischen Bedingungen nachweisen, dass MDA-MB 231 eine deutlich höhere Expression von PDK-3 im Gegensatz zu anderen Tumorzellen aufweisen mit konsekutiver Hemmung der mitochondrialen Atmung. Das könnte das Ansprechen auf Entkoppler natürlich begünstigen.

Wie Xu, Pelicano et al. herausgestellt hatten, führt die Hemmung der Glykolyse in malignen Zellen in höchstem Maße zu einer Abnahme des ATP und tötet Colonkarzinomzellen und Lymphomzellen in hypoxischer Umgebung (41). Interessant ist dabei vor allem, dass die Hypoxie im Tumorgewebe zu einem deutlich saureren

extrazellulären Milieu (pHe 6,2-6,9) führt als im normalen Gewebe, wo nach Ionescu et al. ein pHe von 7,3-7,4 eingehalten wird (16). Das ist ein Grund, warum die Tätigkeit immunkompetenter Zellen vor Ort geschwächt und das Tumorwachstum gleichzeitig gefördert wird. Die intrazelluläre Alkalisierung (pHi 7,12-7,65) in Tumorzellen wiederum aktiviert die aerobe Glykolyse bei normaler O₂-Konzentration. Müller et al. zeigten auf, dass bereits kleinste Veränderungen des pHe ins saure Milieu in soliden Tumoren zu einer ausgeprägten Hemmung der Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen einerseits und Hemmung der Zytokin-Freisetzung andererseits führt (25). Die Sensitivität vieler gängiger Medikamente wird durch diese Mechanismen herabgesetzt, auch eine Resistenz gegenüber einer Bestrahlungstherapie wird nach Xu, Pelicano et al gefördert (41). Auch hier konnte das unterschiedlich starke Ansprechen von Tumoren auf chemotherapeutisch induzierter Apoptose beobachtet werden. Die Daten führten zu der Annahme, dass Inhibitoren der Glykolyse effektiv dazu beitragen können, Medikamentenresistenz zu überwinden, welche mit dem Warburg Effekt assoziiert sind. Es gilt jedoch zu bedenken, dass die unterschiedlichen Tumorarten eine extrem große Varianz an Fähigkeiten aufweisen, sich der Umgebung anzupassen, wie auch Arvelo et al. herausstellten (1).

Vergleicht man die IC₅₀ Berechnungen aller Zellen, so zeigt sich, dass die HACAT-Zellen robuster scheinen als die Ovarialkarzinom-Zellen. Die Mammakarzinom-Zellen und hier insbesondere BT20 jedoch zeigen einen deutlich höheren IC₅₀-Wert als die benignen Zellen auf. Allerdings kann, wie bereits erwähnt, die IC₅₀- Berechnung mittels linearer Interpolation mit Microsoft Excel nur für eine grobe Abschätzung der Hemmkonzentration herangezogen werden, da hier eine hohe prozentuale Abweichung gegeben ist.

Es konnte aufgezeigt werden, dass die Zytotoxizität v.a. von der Inkubationszeit abhängig ist. Hier ist natürlich die Überlegung angebracht, dass man bei hohen DNP-Gaben in vivo theoretisch ausgeprägtere Nebenwirkungen bei keinem höheren Effekt zu erwarten hätte, sollten sich andere benigne Zellen tendentiell ähnlich den HACAT-Zellen verhalten. Eine optimale Dosisfindung wäre an dem Punkt, der für die malignen Zellen zytotoxisch ist, für die benignen jedoch noch nicht, um das Ausmaß der Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Idealerweise wird das Wachstum des Tumorgewebes beeinträchtigt ohne eine gravierende Schädigung des Gesamtorganismus des Patienten zu erreichen.

Für anschließende Toxizitätstest ist darauf zu achten, die optimale Zellzahl für die jeweilige Zelllinie im Ansatz zu verwenden, um ein zu dichtes, aber auch ein zu geringes Wachstum zu vermeiden und somit stabile Ergebnisse zu erzielen. Die Dosiswirkungskurve von pA1 kann hier sicherlich als Vergleichsbasis herangezogen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Wärmefreisetzung von malignen Zellen (bezogen auf die Einzelzelle) höher war als die der benignen. Das Postulat um die höhere intrazelluläre Hyperthermie bei Tumorzellen im Vergleich zu normalen Körperzellen wurde in den Messungen gestützt.

4.3 Mögliche Perspektiven des 2,4-DNP in der onkologischen Therapie

Es gilt zu berücksichtigen, dass die verschiedenen Tumore aufgrund ihrer komplexen Adaptionverhalten und Mutationen unterschiedliche Reaktionen auf eventuelle Umgebungsveränderungen und Einflüsse aufweisen. Die in vitro Untersuchungen sind daher sicherlich nicht einfach auf solide Tumoren zu übertragen. Jedoch gewinnen wir immer mehr Erkenntnisse über den Metabolismus von Tumorzellen, so dass ein therapeutischer Einsatz auf mitochondrialer Ebene immer attraktiver scheint, grade in Hinblick auf eine Kombination mit den derzeit zur Verfügung stehenden Therapieoptionen.

Bei der Gabe von 2,4-DNP in vivo sind einige Herausforderungen und Probleme zu beachten, die unter anderem mit einer unkontrollierten Aktivität im Gewebe assoziiert sind. Aufgrund seiner Lipophilie ist 2,4-DNP in der Lage, Membranen zu überwinden. Dieses macht eine Steuerbarkeit schwierig und führt zu vielen Nebeneffekten wie erhöhtem Schweißausbruch, Hautausschlag, Neurotoxizität, Tachykardie und Tachypnoe (14). Ein weiteres Problem der systemischen Gabe ist die bereits beschriebene unkontrollierbare Hyperthermie. Bislang scheint es einen sehr schmalen Grat zwischen Effektivität und Benefit auf der einen und Schaden durch 2,4-DNP auf der anderen Seite zu geben, zumal das Wissen über die Pharmakokinetik noch sehr dürftig ist. Perry et al. ist es gelungen, ein Derivat des 2,4-DNP zu entwickeln, welches bei Ratten direkt intragastral infundiert wurde und eine Erhöhung der therapeutischen Breite auf das 500-fache aufzeigte (31). Das CRMP (controlled -release mitochondrial protonophore) führte zu einem Gleichgewicht der Leber und Plasmakonzentrationen des

Derivates. Bei deutlichem Benefit hinsichtlich einer Risikoreduktion für das Auftreten einer NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease) konnten keine systemischen Effekte bei gleicher Konzentration erzielt werden.

Es gilt nun, in den unterschiedlichen Tumorgeweben eine ähnlich modifizierte Form zu testen, um eine kontrollierte Apoptose der malignen Zellen auszulösen bei möglichst wenig systemischen Nebenwirkungen. Würde eine zytotoxische Wirkung bei niedrigeren 2,4-DNP-Konzentrationen über eine längere Inkubationszeit erreicht, könnte dieses ebenfalls zu einer Verringerung der Nebenwirkungen führen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die mitochondriale Entkopplung ist ein effektiver Weg, um die Thermogenese und basale metabolische Rate einer Zelle anzuheben. Im Versuchsaufbau mit malignen Zellen führte dies zu einer Apoptose.

2,4-DNP als spezifischer Entkoppler der Atmungskette zeigte in diesem Zusammenhang mittels LDH-Analysen an HACAT-, PA1-, BT20 und MDA-MB 231- Zellen eine dosisabhängige Wirkung auf die Zellproliferation in allen verwendeten Zelllinien, unter den verwendeten Tumorzellen am eindrucksvollsten bei den Ovarialkarzinom Zellen. Allen Zellarten gemeinsam war dabei eine Wachstumshemmung abhängig von der Länge der Inkubationszeit.

Die mikrokalorimetrischen Analysen wurden an HACAT-, BT20- und MDA-MB 231- Zellen durchgeführt. Eine höhere 2,4-DNP-Konzentration führte dabei ebenfalls zu einer gesteigerten Wärmefreisetzung, wobei eine positive Korrelation zwischen Einwirkdauer und Wärmefreisetzung bestand. Eine signifikante Zytotoxizität ließ sich bei hohen DNP-Konzentrationen und bei langer Inkubationszeit in den PA1- und MDA-MB 231- Zelllinien nachweisen. MDA-MB 231- Zellen reagierten dabei besonders sensibel.

In der aktuellen Tumorthherapie bietet die Kombination von Alterationen der mitochondrialen und glykolytischen Abläufen neben den gängigen Behandlungsoptionen einen vielversprechenden Therapieansatz (8, 28). Durch den Einsatz von mitochondrialen Entkopplern als Ergänzung zu den herkömmlichen Therapieschemata könnte effektiv in den metabolischen Stoffwechsel der Zellen eingegriffen und neben der Tumorzellproliferation auch die Regression positiv beeinflusst werden. Das Ziel wäre, eine kontrollierte Apoptose bei möglichst wenigen systemischen Nebenwirkungen auszulösen. Hierzu werden im Rahmen der optimalen Dosisfindung für den Einsatz von 2,4-DNP jedoch weitere Versuchsansätze mit Inkubationszeiten von mindestens 48h benötigt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Arvelo, Francisco et al., „Tumour progression and metastasis“, *Ecancermedicalsecience*. 2016; 10: 617.
2. Bin Wu et al., “2,4 DNP improves motor function, preserves medium spiny neuronal identity, and reduces oxidative stress in a mouse model of Huntington's disease“, *Experimental Neurology*, Vol. 293, 2017
3. Böttcher H., Fürst,P., “Direct microcalorimetry as a technique in cell cultures“, *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 1997 Dec;11(4):739-52
4. Boukamp P., Dzarlieva-Petrusevska RT et al., “Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploidy human keratinocyte cell line“, *J.Cell Biol.* 106:761-771, 1988
5. Bridges et al., „Molecular features of biguanides required for targeting of mitochondrial respiratory complex I and activation of AMP-kinase, *BMC Biology*, 2016
6. Bundesinstitut für Risikobewertung, „Ärztliche Mitteilungen bei Vergiftungen“, 2006
7. Cavalli, L.R. et Liang, “Mutagenesis, tumorigenicity and apoptosis: are the mitochondria involved?“, 1998
8. Cheng, Gang et al., “Mitochondria targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death“, *Cancer Res.* 2012 May 15; 72(10):2634-2644
9. Delarue M. et al., “mTORC1 Controls Phase Separation and the Biophysical Properties of the Cytoplasm by Tuning Crowding“, *Cell.* 2018 Jul 12;174(2):338-349

10. De Vincenzo R, et al., "Antiproliferative activity of colchicine analogues on MDR-positive and MDR-negative human cancer cell lines", *Anticancer Drug Des.* 13: 19-33, 1998
11. Drenckhahn et al, „Benninghoff Anatomie“, Band 1, Urban und Schwarzenberg, 15. Auflage, 1994
12. Giovanella BC et al. „Heterotransplantation of human malignant tumors in nude thymusless mice.II.Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 52:921-30, 1974
13. Gonnert, F.A., Julius-Maximilians-Universität Würzburg, „Entwicklung eines Modells zur mikrokolorimetrischen Analyse der Wirkung pharmakologischer Substanzen auf den Energiestoffwechsel benigner und maligner Zelllinien am Beispiel von 2,4-Dinitrophenol“, 2005
14. Grundlingh, Johann et al., „2,4-Dinitrophenol (DNP): A Weight Loss Agent with Significant Acute Toxicity and Risk of Death“, *J. Med. Toxicol.* 2011 Sept; 7(3):205-212
15. Harper, J.A. et al, „Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity“, University of Cambridge, 2001
16. Ionescu, John et al., “Metabolic Hallmarks of Tumor Cells as Target for complementary Therapies”; *Journal of Translational Science* 2020, Vol. 7: 5-8
17. Klingelhoefter, Christoph et al., “Natural resistance to ascorbic acid induced oxidative stress is mainly mediated by catalase activity in human cancer cells and catalase-silencing sensitizes to oxidative stress”, *BMC Complement Altern. Med.* 2012; 12:61.
18. Kreutzig, Thomas: „Kurzlehrbuch Biochemie“,Urban & Fischer, München, 10. Auflage, 2001

19. Lanning, Nathan J., Castle, Joshua P. et al, "Metabolic profiling of triple-negative breast cancer cells reveals metabolic vulnerabilities", *Cancer Metab.* 2017;5:6
20. Lasfargues EY, Ozello L., „Cultivation of human breast carcinomas“, *J Natl. Cancer Inst* 21(6): 1131-1147, 1958
21. Lee, Yujeong et al.; "Neuroprotective effects of 2,4-dinitrophenol in an acute model of Parkinson´s disease", *Brain Res.* 2017 May 15; 1663:184-193
22. Löffler, Georg, „Basiswissen Biochemie“, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 3. Auflage, 2001
23. Lu et al. „The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism“, *Cancer Lett.* 2015
24. Mehdorn, Anne-Sophie et al., „Warburg Effekt heute- Untersuchungen zum Tumorstoffwechsel“, Münster, 2016
25. Müller, B., Fischer, B., Kreuzt, W., „An acidic microenvironment impairs the generation of non-major histocompatibility complex-restricted killer cells“, *Immunology*, 2000 Mar; 99(3):375-384
26. Mutschler, Ernst et al, „Arzneimittelwirkungen“, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage, 2001
27. Nedergaard et al. „Uncoupling proteins:current status and therapeutic prospects“, *EMBO reports*, Vol. 6, 2005
28. Palorini, Roberta et al., "Mitochondrial Complex I Inhibitors and Forced Oxidative Phosphorylation Synergize in Inducing Cancer Cell Death", *Int. J. Cell Biol.* 2013;2013:243876
29. Patel et al., „Differential Effects of the Mitochondrial Uncoupling Agent, 2,4-Dinitrophenol, or the Nitroxide Antioxidant, Tempol, on Synaptic or Nonsynaptic Mitochondria After Spinal Cord Injury), *J Neurosci Res.* 2009

30. Pelicano et al., "Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism", *The Journal of Cell Biology*, Vol. 175, No. 6, 913-923, 2006
31. Perry, Rachel J. et al., "Controlled-release mitochondrial protonophore reverses diabetes and steatohepatitis in rats", *Science*. 2015 Mar 13; 347(6227): 1253–1256
32. Pfetzer, Nadja, "Identifizierung und Testung spezifischer Inhibitoren des Energiestoffwechsels von Tumorzellen", Würzburg, 2011
33. Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten (Hrsg.), „Bericht zum Krebsentstehen in Deutschland“, Berlin, 2016
34. Samudio et al., "The Warburg effect in leukemia-stroma cocultures is mediated by mitochondrial uncoupling associated with uncoupling protein 2 activation", *Cancer res.*68(13):5198-5205, 2008
35. Stewart, Andrew N. et al., "Mitochondria exert age-divergent effects on recovery from spinal cord injury", *Exp Neurol*. 2021, Mar;337:113597
36. Stine, Karen E. et Brown, Thomas M., „Principles of Toxicology“, CRC Press, 2015
37. Tennant et al., „Targeting metabolic transformation for cancer therapy“, *Nature Reviews*, 2010
38. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, „Toxicological Profile For Dinitrophenols“, August 1995
39. Wang, Gang et al., "Understanding and correcting for carbon nanotube interferences with a commercial LDH cytotoxicity assay", *Toxicology*, 2012 Sept. 28; 299(2-3):99-111

40. Warburg, Otto, „Über den Stoffwechsel der Tumoren“. Arbeitsbericht aus dem Kaiser-Wilhelm Institut für Biologie, Berlin-Dahlem, Berlin, Julius Springer, 1926
41. Xu, Rui-hua, Pelicano, Helene et al. "Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and hypoxia", *Cancer Res* 2005; 65: (2)
42. Yu, Wang et al. „Mitochondrial calcium uniporter as a target of microRNA-340 and promotor of metastasis via enhancing the Warburg effect“, *Oncotarget*, 2017, vol.8
43. Zeek, Axel et al, „Chemie für Mediziner“, Urban und Schwarzenberg, 2. Auflage, 1992
44. Zeuthen, Jesper, „Human teratocarcinoma cell lines. A review“, *Int. J Androl.* 1981 Mar; 4 Suppl s4:71-77

APPENDIX

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adenosintriphosphat
CRMP	controlled-release mitochondrial protonophore
Da	Dalton
DNP	Dinitrophenol
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
Fa.	Firma
g	Gramm
FADH ₂	Falvin-Adenin-Dinucleotid
FDA	U.S. Food and Drug Administration
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HER2	human epidermal growth factor
IC	inhibitory concentration
i.e.	id est
i.R.	im Rahmen
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molare Masse
Mg	Milligramm
Min	Minuten
Mio	Millionen
miRNA	MikroRNA
MRX	Photometer
nm	Nanometer
μM	Mikromolar
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAFLD	Non- Alcoholic Fatty Liver Disease
Nm	Nannometer
NSARs	Nicht steroidale Antirheumatika
OD	Optische Dichte
pHe	potentia hydrogenii, extrazellulär
pHi	potentia hydrogenii, intrazellulär

Pi	anorganisches Phosphat
red	reduziert
ox	oxidiert
TNBC	Triple-negative breast cancer
UCP	uncoupling proteins
v.a.	vor allem
z.T.	zum Teil

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Übersicht über den Citratzyklus, modifiziert nach Rassow et al., Duale Reihe Biochemie, Thieme, 2012	4
Abb. 1.2	Atmungskette, modifiziert nach G. Rehner u. H. Daniel, Biochemie der Ernährung, 1999, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin	6
Abb. 1.3	Molekularer Aufbau der F0F1 ATP Synthase, modifiziert nach Robert K. Nakamoto, Physiology, 1 February 1999, Vol. 14 no. 1, 40-46 DOI	8
Abb. 1.4	Wirkmechanismus der Entkopplung bei winterschlafenden Tieren, modifiziert nach Wang, L.C.H.: Animal adaption to cold (Comparative Environmental Physiology, Vol. 4, Springer-Verlag Berlin, 1989)	10
Abb. 1.5	Wirkprinzip von DNP als exogener Protonencarrier, modifiziert nach „Proton transport by uncouplers“, Elsevier Ltd. Baynes & Dominiczak: Medical Biochemistry 2E, 2004	11
Abb. 1.6	Chemische Formel des 2,4-Dinitrophenol (DNP)	14
Abb. 1.7	Metabolischer Abbau von 2,4-Dinitrophenol (modifiziert nach Sousa et al., „Diet aid or aid to die: an update on 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP) use as weight-loss product“, Archives of Toxicology 94(34)	15
Abb. 1.8	Schematische Illustration des Glukosemetabolismus in benignen und malignen Zellen unter Normoxie (Lu et al. „The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism“, Canc. Lett. 2015), Copyright Elsevier	18

Abb. 1.9	Aufbau eines Batchkalorimeters (O`Neill et al.:“ Antimicrobial properties of silver-containing wound dressings: a microcalorimetric study”, 2003), Copyright Elsevier	20
Abb. 2.1	Mikroskop. Bild pA1 mit 100 µmol/l DNP nach 6h	26
Abb. 2.2	Zwei-Stufen-Reaktion als Grundprinzip des LDH-Zytotoxizitätstest, URL: https://www.gbiosciences.com/Bioassays/CytoScan-LDH-Cytotoxicity-Assay (Stand: 01.11.2022), Copyright GBiosciences	27
Abb. 3.1	LDH Messung an adhärenen Zellen nach der Lyse: Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von intakten, adhärenen pA1 Zellen unter dem Einfluss von 0-200µM DNP nach 6h, 24h und 48h Inkubationszeit	31
Abb. 3.2	LDH Messung im nativen Zellüberstand: Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von pA1 Zellen im Zellüberstand unter dem Einfluss von 0-200µM DNP nach 6h, 24h und 48h Inkubationszeit als Kontrollmessung der lysierten Zellen	31
Abb. 3.3	Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von intakten, adhärenen pA1 Zellen unter dem Einfluss von 0 - 200µM DNP nach 6h, 24h und 48h – Inkubationszeit	33
Abb. 3.4	Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von intakten, adhärenen HACAT- Zellen unter dem Einfluss von 0 - 200µM DNP nach 6h, 24h und 48h – Inkubationszeit	34
Abb. 3.5	Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von intakten, adhärenen BT20-Zellen unter dem Einfluss von 0 - 200µM DNP nach 6h, 24h und 48h – Inkubationszeit	35

Abb. 3.6	Zellzahlverlauf aus Messung der LDH von intakten, adhärenen MDA-MB 231-Zellen unter dem Einfluss von 0 - 200µM DNP nach 6h, 24h und 48h – Inkubationszeit	36
Abb. 3.7	Vergleich der Zellzahlverläufe aus Messungen der LDH von intakten, adhärenen pA1, HACAT, BT20 und MDA-MB 231-Zellen unter dem Einfluss von 0 – 200µM DNP nach 48h – Inkubationszeit	37
Abb. 3.8	Vergleich der prozentualen Zellzahlverläufe der Mittelwerte aus Messungen der LDH von intakten, adhärenen pA1, HACAT, BT20 und MDA-MB 231-Zellen unter dem Einfluss von 12,5 - 200µM DNP nach 48h – Inkubationszeit im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (DNP=0)	38
Abb. 3.9	Varianzanalyse mittels Kruskal-Wallis H Test als nicht parametrischer Mittelwertvergleich bei mehr als 2 Stichproben	39
Abb. 3.10	Regressionsgerade der Dosiswirkungskurve von 0-200µM DNP der pA1-Zellen bei 48h	40
Abb. 3.11	Regressionsgerade der Dosiswirkungskurve von 0-200µM DNP der BT20 -Zellen bei 48h	41
Abb. 3.12	Regressionsgerade der Dosiswirkungskurve von 0-200µM DNP der MDA-MB 231 -Zellen bei 48h	41
Abb. 3.13	Regressionsgerade der Dosiswirkungskurve von 0-200µM DNP der HACAT -Zellen bei 48h	42
Abb. 3.14	Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen der BT20-Zelllinie unter 0-200 µM 2,4-DNP bei 0,5h – 3,5h	43

Abb. 3.15	Analyse der mikrokalorimetrischen Messung des prozentualen Wärmeflusses in Bezug auf den Ausgangswert bei 0,5h bei BT20-Zellen bei 0,5h – 3,5h	44
Abb. 3.16	Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen der MDA-MB 231-Zelllinie unter 0-50 μ M 2,4-DNP bei 0,5h – 3,5h	45
Abb. 3.17	Analyse der mikrokalorimetrischen Messung des prozentualen Wärmeflusses in Bezug auf den Ausgangswert bei 0,5h bei MDA-MB 231-Zellen bei 0,5h – 3,5h	46
Abb. 3.18	Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Messungen der HACAT-Zelllinie unter 0-50 μ M 2,4-DNP bei 0,5h – 3,5h	47
Abb. 3.19	Analyse der mikrokalorimetrischen Messung des prozentualen Wärmeflusses in Bezug auf den Ausgangswert bei 0,5h bei HACAT-Zellen bei 0,5h – 3,5h	48
Abb. 3.20	Vergleich der mikrokalorimetrischen Messungen der BT20-, MDA-MB 231-, und HACAT-Zelllinien unter 0-200 μ M 2,4-DNP bei 3,5h	48

III TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1	Im Versuchsansatz der Zytotoxizitätstests und Mikrokalorimetrie verwendete Zelllinien und ihre Herkunft	22
Tab. 2.2	Im Versuchsansatz der Zytotoxizitätstests verwendete Geräte	23
Tab. 2.3	Im Versuchsansatz der Mikrokalorimetrie verwendete Geräte	23
Tab. 2.4	Im Versuchsansatz der Zytotoxizitätstests und Mikrokalorimetrie verwendete Reagenzien	24
Tab. 2.5	Im Versuchsansatz der Zytotoxizitätstests und Mikrokalorimetrie verwendetes Zubehör und Verbrauchsmaterial	24
Tab. 2.6	Im Versuchsansatz der Zytotoxizitätstests und Mikrokalorimetrie verwendete Nährmedien	25

IV DANKSAGUNG

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. Ulrike Kämmerer für die Zuteilung des interessanten Themas, die intensive Einarbeitung in die Zellkulturen und vor allem für ihre geduldige Betreuung während der gesamten Arbeit, in der Schlussphase auch über eine größere räumliche Distanz.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Michaela Kapp für ihre tatkräftige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bei den mikrokalorimetrischen Untersuchungen.

Prof. Dr. Michaela Kuhn und Priv.-Dozentin Dr. Catharina Bartmann danke ich für das Korreferat meiner Arbeit.

Meinem Ehemann Florian danke ich für das Korrekturlesen. Ohne seine immerwährende Unterstützung und Begleitung wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen. Ein großes Dankschön gilt auch unseren Kindern, die mich mit ihrer Motivation grade in der Schlussphase begleitet haben. Danke Johannes für die Hilfsbereitschaft beim Formatieren.

