

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und
Kinderchirurgie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Untersuchungen zum antikanzerogenen Potenzial von
Targetstrukturen im Stoffwechsel von Tumorzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lorenz Biggemann

aus Neuss

Würzburg, Dezember 2014

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Almut Schulze
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2015

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern und meinem Bruder.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Behandlungskonzepte in der Onkologie	- 1 -
1.2	Biochemische Grundlagen des Zellstoffwechsels	- 3 -
1.3	Mechanismen der Anpassung von Tumorzellen an Hypoxie.....	- 10 -
1.4	Ziele	- 16 -
2	Fragen	- 18 -
3	Material und Methoden	- 19 -
3.1	Zellkulturmedien und Pufferlösungen	- 19 -
3.2	Zelllinien	- 20 -
3.3	Zellkultur.....	- 20 -
3.4	Inhibitoren	- 21 -
3.5	Bestimmung von Glukose und Laktat	- 22 -
3.6	Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität	- 24 -
3.7	pH-Messungen	- 26 -
3.8	Messung der Caspase-Aktivität	- 26 -
3.9	Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies	- 26 -
3.10	Messungen zum Sauerstoffverbrauch	- 27 -
3.11	Western Blot-Analysen	- 29 -
3.12	Auswertung	- 30 -
4	Ergebnisse	- 31 -
4.1	Der Stoffwechsel von SiHa und WiDr	- 31 -
4.2	Effekte der CHC-vermittelten Hemmung von Monocarboxylat-Transporter..	- 40 -
4.3	Effekte der NaOx-vermittelten Hemmung der Laktatdehydrogenase	- 48 -
5	Beantwortung der Fragen	- 56 -
6	Diskussion	- 58 -
6.1	Bedeutung des Warburg-Effekts für den Tumorstoffwechsel	- 58 -
6.2	Biologische Effekte durch Hemmung des Laktatexports	- 63 -
6.3	Biologische Effekte durch Hemmung der Laktatbildung	- 65 -
7	Ausblick	- 69 -
8	Zusammenfassung	- 70 -
9	Literaturverzeichnis	- 72 -
10	Appendix	- 87 -
	Eigene Publikationen, Danksagung, Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Behandlungskonzepte in der Onkologie

Die Therapie maligner Erkrankungen bleibt auch weiterhin eine der größten Herausforderungen für das Gesundheitssystem. So waren nach Daten des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2011 bösartige Neubildungen die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Allein in Deutschland verursachen maligne Erkrankungen ca. 25 % aller Todesfälle (DESTATIS, 2012). Die Weltgesundheitsbehörde WHO erwartet bis zum Jahr 2030 einen dramatischen Anstieg der weltweiten Todesfälle durch maligne Neubildungen von 7,8 auf 13 Millionen pro Jahr (Ferlay J et al., 2010).

Maligne Erkrankungen sind durch verschiedene Therapieansätze zu behandeln. Hierzu gehören die chirurgische Resektion, die Chemotherapie, die Bestrahlung oder Radiatio sowie die Hormontherapie. Den Beginn der onkologischen Chirurgie stellte die Einführung der radikalen Mastektomie bei Brustkrebs durch Halsted dar (Halsted WS, 1894). Das Ziel der *en-bloc* Resektion, auch heute noch gültiges Konzept der onkologischen Chirurgie, ist die vollständige Entfernung des Tumors, um die Bildung von Lokalrezidiven durch verbleibende Tumorzellen zu verhindern. Die Radiatio ist seit der Entdeckung ihrer zellzerstörenden Wirkung bei der fraktionierten Bestrahlung von Kopf-Hals-Tumoren im Jahr 1928 fester Bestandteil der Tumorthherapie (Coutard H, 1932; zitiert nach DeVita VT, Rosenberg SA, 2012). Die Chemotherapie ist eine Entdeckung des 20. Jahrhunderts und machte durch anfängliche Erfolge bei der Behandlung von Lymphomen (Dameshek W et al., 1949) und Leukämien (Farber S, Diamond LK, 1948) auf sich aufmerksam. Durch die Kombination verschiedener Chemotherapeutika wurden dauerhafte Remission möglich, was zum endgültigen Durchbruch der Chemotherapie beitrug (Frei E et al., 1965; DeVita VT et al., 1970).

Insbesondere bei soliden Tumoren ist die alleinige chirurgische Resektion häufig nicht kurativ. Kleine, durch diagnostische Routineverfahren nicht erfassbare

Tumorzellabsiedlungen, sog. Mikrometastasen, können im Körper zurückbleiben und die Grundlage für ein Rezidiv bilden. Um dies zu verhindern, werden bei soliden Tumoren häufig verschiedene Therapien kombiniert. So erhalten Patienten nach Resektion eines Mamma- bzw. Kolonkarzinom postoperativ in bestimmten Tumorstadien eine sog. adjuvante Chemotherapie mit dem Ziel, die Rezidivrate und Mortalität zu verringern. Zusätzlich werden bei einigen Tumoren wie dem Mammakarzinom und kolorektalen Lebermetastasen gegebenenfalls auch sog. neoadjuvante, präoperative Chemotherapien eingesetzt. Hier ist das Ziel, die Größe des Primärtumors zu verringern, um eine Resektabilität zu ermöglichen (DeVita VT, Chu E, 2008).

Ein weiterer Meilenstein in der Onkologie ist die Entwicklung der gezielten Krebstherapie („*targeted therapy*“), die in erster Linie die Krebszellen, nicht aber benigne Zellen schädigt. Hierzu kommen so genannte „*biologics*“ wie monoklonale Antikörper und „*small molecules*“¹⁾ zum Einsatz. „*Biologics*“ sind so konzipiert, dass sie gezielt den Signalfluss in die Krebszelle verhindern bzw. innerhalb der Zelle solche Signale blockieren, von denen bekannt ist, dass sie zur Tumorbildung bzw. Metastasierung beitragen. Seit dem erfolgreichen Einsatz des anti-CD20-Antikörpers Rituximab bei Non-Hodgkin-Lymphomen (Maloney DG et al., 1997) werden monoklonale Antikörper mit unterschiedlichen Spezifitäten verstärkt im klinischen Alltag eingesetzt. Seit den 1990er Jahren konzentriert sich die Medikamentenentwicklung auf so genannte Protein- bzw. Tyrosinkinaseinhibitoren, da deutlich geworden ist, dass dysregulierte Tyrosinkinasen häufig eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Tumorerkrankungen einnehmen. Die Einführung von Imatinib („*Glivec*“), ein „*small molecule*“, in die Therapie der chronisch myeloischen Leukämie stellt ein Paradebeispiel für den therapeutischen Erfolg einer „*targeted therapy*“ dar (Druker BJ et al., 2006).

Trotz zahlreicher Innovationen in der Onkologie bleiben Krebserkrankungen weiterhin eine therapeutische Herausforderung. Das Ziel muss daher sein, neue Zielstrukturen zu identifizieren und ihre Eignung für therapeutische Ansätze zu

¹⁾ Niedermolekulare Verbindungen mit einer Molekülmasse von nicht über 800 g mol⁻¹; sie sind teilweise in der Lage, die Zellmembran zu passieren und in der Zelle ihre Wirkung zu entfalten.

prüfen. So wird seit einigen Jahren der Stoffwechsel von Tumoren wieder verstärkt untersucht, nachdem dieser bereits in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts im Fokus des wissenschaftlichen Interesses stand. Warburg und Minami berichteten im Jahr 1923 über eine starke Bildung von Milchsäure²⁾ an Gewebeschnitten solider Tumoren in Gegenwart von Sauerstoff (Warburg O, Minami S, 1923). In normalen Körperzellen wird die Bildung von Milchsäure durch Anwesenheit von Sauerstoff gehemmt, was als Pasteur-Effekt³⁾ bezeichnet wird (Pasteur L, 1861). Für diese hiervon abweichende Eigenschaft von Tumoren hat sich die Bezeichnung „Warburg-Effekt“ durchgesetzt. Heute ist allgemein akzeptiert, dass Tumoren, die einen Warburg-Effekt aufweisen, sich perfekt an die in soliden Tumoren vorherrschenden hypoxischen Bedingungen angepasst haben.

1.2 Biochemische Grundlagen des Zellstoffwechsels

In diesem Abschnitt werden einige grundlegende Aspekte der verschiedenen Abbauewege von Glukose erläutert. Kohlenhydrate, also die große Gruppe der Mono-, Di- und Polysaccharide, gehören neben Proteinen und Fetten zu den wesentlichen Bestandteilen der menschlichen Nahrung und liefern bei normaler Ernährung bis zu 60 % der aufgenommenen Energie. Kohlenhydrate sind somit die Hauptenergiequelle des Körpers, wobei Glukose den essentiellen Energieträger für Zellen darstellt (Rassow J et al., 2006; Löffler G et al., 2007).

Glukose wird in der Glykolyse zu Pyruvat oxidiert. Im Anschluss wird Pyruvat entweder in den Mitochondrien vollständig zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert (wozu Sauerstoff erforderlich ist) oder sauerstoffunabhängig im Zytosol zu Laktat reduziert (Abb. 1.1).

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

³⁾ Der von Louis Pasteur 1861 bei Hefen entdeckte Effekt beschreibt den unter anaeroben Bedingungen erhöhten Umsatz von Glukose (d.h. Glukose wird schneller und vermehrt verbraucht); gleichzeitig bilden sie mehr Ethanol. Ein ähnlicher Effekt unter anaeroben Bedingungen ist auch am Muskel zu beobachten, wobei dieser Laktat bildet.

Im Pentosephosphatweg, auch als Hexosemonophosphatweg bezeichnet, entstehen bei der Oxidation von Glukose Reduktionsäquivalente⁴⁾ in Form von $\text{NADPH} + \text{H}^+$, die für zahlreiche reduzierend verlaufende Biosynthesen notwendig sind. Hierzu gehören die Fettsäuresynthese sowie die Bildung von Cholesterin und Steroidhormonen. Ribose, eine Pentose, wird als Zwischenprodukt des Pentosephosphatwegs für die Synthese von DNA-Nukleotiden benötigt.

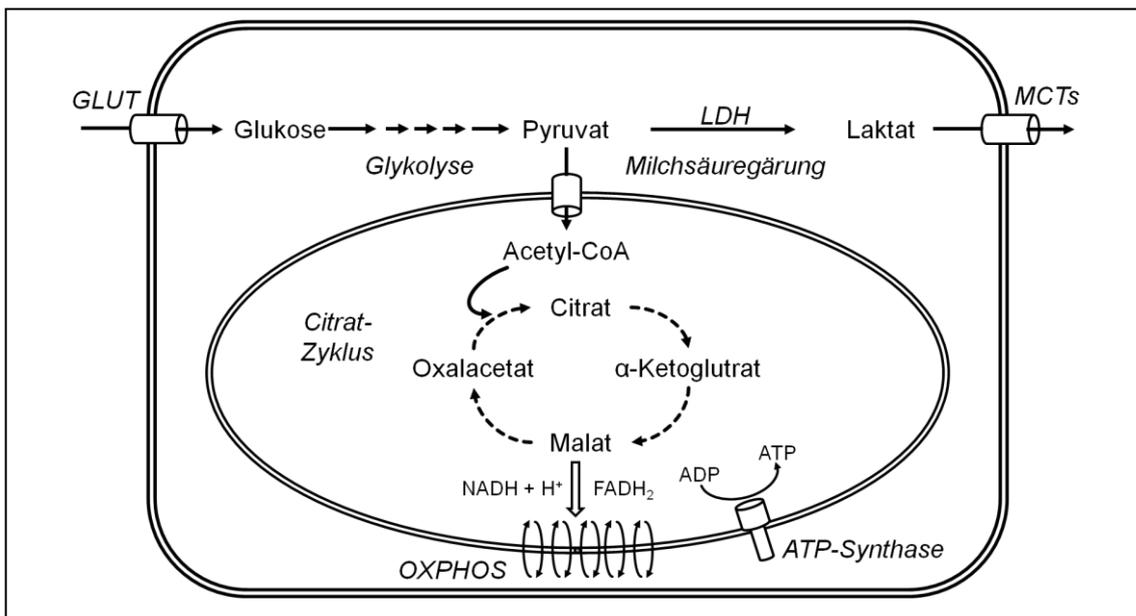


Abbildung 1.1: Der Glukosemetabolismus. Die Abbildung stellt die Abbauege von Glukose in den Zellkompartimenten Zytosol und Mitochondrium vereinfacht dar. Glukose wird über spezifische Glukose-Transporter (GLUT) von der Zelle aufgenommen und in der Glykolyse zu Pyruvat oxidiert. Bei Abwesenheit von Sauerstoff verbleibt Pyruvat im Zytosol, wird dort zu Laktat reduziert und über Monocarboxylat-Transporter (MCT) aus der Zelle befördert. Bei Anwesenheit von Sauerstoff wird Pyruvat in die Mitochondrien transportiert, zu Acetyl-CoA oxidiert und im Citratzyklus weiter zu Kohlendioxid oxidiert. Die im Citrat-Zyklus gebildeten Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 werden für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) in der Atmungskette zur Regeneration von ATP aus $\text{ADP} + \text{P}_i$ benötigt. Adenosintriphosphat (ATP) stellt den universellen Energieträger für Zellen dar. Der ebenfalls im Zytosol befindliche Pentosephosphatweg, die Verbindungsstelle zwischen anabolem und katabolem Stoffwechsel, ist nicht dargestellt. Modifiziert nach Vander Heiden MG et al., 2009.

1.2.1 Die Glykolyse

Bei der Glykolyse, über die nahezu sämtliche biologischen Systeme verfügen, handelt es sich um einen mehrstufigen enzymatischen Abbau von Glukose im

⁴⁾ Reduktionsäquivalente sind Coenzyme der Oxidoreduktasen, die sich entweder reversibel am Enzym anlagern oder als prosthetische Gruppe kovalent gebunden sind. Sie können Elektronen bzw. Wasserstoff ($\text{H}_2 \rightarrow \text{H}^+ + \text{H}^- \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) reversibel binden. Diese sind in ihrer oxidierten/reduzierten Form: $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$, $\text{NADP}^+/\text{NADPH} + \text{H}^+$, FAD/FADH_2 .

Zytosol der Zelle. In der Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat oxidiert⁵⁾, wobei Adenosintriphosphat (ATP) und die Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$ gebildet werden. Charakteristisch für die Glykolyse ist, dass sämtliche Reaktionsschritte keinen Sauerstoff benötigen (Rassow J et al., 2006; Löffler G et al., 2007).

Nachdem die Zelle Glukose über spezifische Transporter aufgenommen hat (Abb. 1.1), wird diese im ersten Abschnitt der Glykolyse über Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Pyruvat oxidiert. Glycerinaldehyd-3-Phosphat ist ebenfalls ein Zwischenprodukt des Pentosephosphatwegs und stellt damit eine wichtige Schnittstelle zwischen beiden Stoffwechselwegen dar. Im zweiten Abschnitt der Glykolyse wird jedes Molekül Glycerinaldehyd-3-Phosphat unter Bildung von Reduktionsäquivalenten und ATP zu Pyruvat oxidiert. Die Bilanz der Glykolyse sieht wie folgt aus: 1 mol Glukose werden zu 2 mol Pyruvat unter Bildung von 2 mol $\text{NADH} + \text{H}^+$ sowie 2 mol ATP oxidiert.

1.2.2 Der Citratzyklus

Der Citratzyklus, auch Krebs-Zyklus oder Tricarbonszyklus genannt, stellt den oxidativen Abbauweg von Pyruvat in den Mitochondrien dar. Hierbei werden Reduktionsäquivalente in Form von $\text{NADH} + \text{H}^+$ sowie FADH_2 gebildet. Diese geben ihren Wasserstoff bzw. Elektronen an die Komplexe der Atmungskette ab, wobei ATP durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) aus ADP und anorganischem Phosphat gebildet wird. Pyruvat wird durch einen spezifischen Transporter im Cotranstransport mit einem Proton in die mitochondriale Matrix transportiert, wo es durch den Multienzymkomplex Pyruvatdehydrogenase in einer irreversiblen Reaktion unter Freisetzung von CO_2 und Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Acetyl-CoA oxidiert wird. Die beiden Kohlenstoffatome des Acetyl-CoA werden anschließend im Citratzyklus vollständig zu CO_2 oxidiert, wobei 3 mol $\text{NADH} + \text{H}^+$, 1 mol FADH_2 sowie 1 mol GTP gebildet werden. Pro mol Acetyl-CoA entstehen 10 mol ATP^{6),7)}, wobei GTP durch Phosphat-

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

⁶⁾ Der ATP-Gewinn durch OXPHOS wurde wie folgt berechnet: Pro mol $\text{NADH} + \text{H}^+$ werden 2,5 mol ATP und pro mol FADH_2 1,5 mol ATP gebildet (Löffler et al., 2007).

gruppentransfer direkt in ATP umgewandelt wird. Im Citratzyklus wird nicht nur Glukose metabolisiert, sondern dieser Stoffwechselweg ist auch Endstrecke für den Abbau von Fetten und Proteinen. Der Citratzyklus liefert ebenfalls Substanzen für die Fettsäure-, Aminosäure- und Hämsynthese (Rassow J et al., 2006; Löffler G et al., 2007).

1.2.3 Die oxidative Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) bezeichnet den Aufbau eines Protonengradienten zwischen Matrix und Intermembranraum durch Elektronentransport über die innere Mitochondrienmembran, der von der ATP-Synthase (F_0F_1 -ATPase) zur Synthese von ATP aus ADP und P_i genutzt wird (Rassow J et al., 2006; Löffler G et al., 2007).

Die Atmungskette ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und besteht aus den 4 Proteinkomplexen I bis IV (Abb. 1.2). Die notwendigen Elektronen, die für den Transport von Protonen über die innere Mitochondrienmembran notwendig sind, werden durch die Reduktionsäquivalente $NADH + H^+$ und $FADH_2$ bereitgestellt, die in der Glykolyse (Kapitel 1.2.1) sowie im Citratzyklus (Kapitel 1.2.2) gebildet werden. Am Ende der Atmungskette werden die Elektronen durch Komplex IV auf ein Sauerstoffatom unter Bildung von H_2O übertragen.

Pro Molekül $NADH+H^+$ werden 10 Protonen (je 4 über Komplex I und III und 2 über Komplex IV) in den Intermembranraum transportiert. Aufgrund der Aussparung von Komplex I ist bei $FADH_2$ die Anzahl der transportierten Protonen mit 6 geringer. Der Protonengradient wird von der ATP-Synthase zur Synthese von ATP aus ADP und P_i genutzt. Der Protoneneinstrom führt zu einer Konformationsänderung der ATP-Synthase, die die ATP-Bildung katalysiert. Zur Synthese von einem Molekül ATP werden ca. 3,5 Protonen benötigt, so dass pro Mo-

⁷⁾ Nach neueren Erkenntnissen wird aufgrund von unspezifischen Protonenrückströmen während der oxidativen Phosphorylierung nur 9,3 mol ATP pro Mol Acetyl-CoA *in vivo* gebildet (Löffler et al., 2007).

lekül $\text{NADH} + \text{H}^+$ ca. 2,5 mol ATP und pro Molekül FADH_2 ca. 1,5 mol ATP gebildet werden.

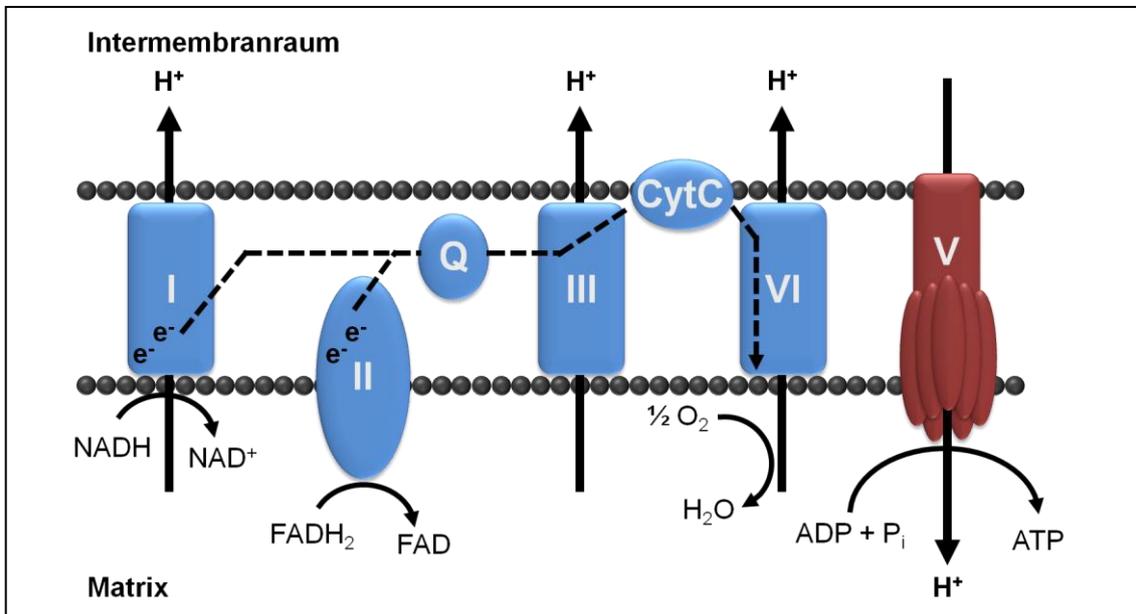


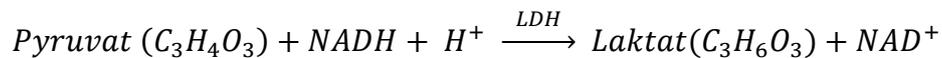
Abbildung 1.2: Die oxidative Phosphorylierung an der mitochondrialen Atmungskette. Dargestellt sind die Protonentransporte der einzelnen Komplexe. $\text{NADH} + \text{H}^+$ überträgt 2 Elektronen auf Komplex I der Atmungskette. Die Elektronen werden entlang der verschiedenen Komplexe „bergab“ transportiert und über Komplex IV auf ein Sauerstoffatom unter Bildung von H_2O übertragen. Während des Elektronentransports werden Protonen durch die Komplexe I, III und IV in den Intermembranraum transportiert. Der Elektronentransport zwischen Komplex I und III wird durch das Coenzym Ubichinon (Q) und zwischen Komplex III und IV durch das Coenzym Cytochrom c (CytC) vermittelt. Komplex II überträgt die Elektronen von FADH_2 auf Ubichinon, ohne dass dabei Protonen in den Intermembranraum transportiert werden. Die ATP-Synthase (F_0F_1 -ATPase), hier als Komplex V bezeichnet, nutzt den Protonengradienten zur Bildung von ATP aus ADP und P_i . Modifiziert nach Löffler G et al., 2007.

Citratzyklus und OXPHOS im Anschluss an die Glykolyse ermöglichen die vollständige Oxidation von Glukose zu CO_2 und H_2O bei maximalem Energiegewinn. Energieverluste durch einen Protonenrückstrom über die ATP-Synthase, über die Membran sowie über andere Mechanismen begrenzen den Wirkungsgrad von OXPHOS auf ca. 60 % (Löffler G et al., 2007). Der maximale Gewinn an ATP ist somit nur bei ausreichender Sauerstoffversorgung möglich.

1.2.4 Die Milchsäuregärung

Als Milchsäuregärung wird die Umwandlung von Glukose zu Milchsäure bezeichnet. Diese im Zytosol ablaufende Reaktion wird durch die Laktatdehydro-

genase (LDH) insbesondere bei anaeroben Bedingungen katalysiert (Rassow J et al., 2006; Löffler G et al., 2007):



Durch die Reduktion von Pyruvat zu Laktat verfügt die Zelle auch in Hypoxie über ausreichend Reduktionsäquivalente für die Glykolyse, da diese durch die Reduktion von Pyruvat regeneriert (oxidiert) werden. Ohne diese Regeneration würde die Glykolyse zum Stillstand kommen bzw. es würde weniger Glukose umgesetzt werden. Dadurch wäre das Überleben der Zelle in Hypoxie gefährdet. Die Reaktion der Laktatdehydrogenase wurde bereits vor mehr als 100 Jahren beschrieben. So reichern isolierte amphibische Muskelzellen mehr Laktat in Hypoxie als bei oxygenierten Bedingungen an (Fletcher WM, 1907). Eine Akkumulation von Laktat wurde später auch *in vivo* nachgewiesen und auf eine unzureichende Versorgung der Muskeln mit Sauerstoff bei körperlicher Aktivität zurückgeführt (Hill AV et al., 1924). Dagegen stellt die Bildung von Laktat bei aeroben Bedingungen eine Besonderheit des malignen Stoffwechsels dar (Warburg-Effekt). In der englischen Literatur wird dieser Stoffwechsel maligner Zellen als aerobe Glykolyse („*aerobic glycolysis*“⁸⁾) bezeichnet. Eine ausgeprägte Milchsäuregärung wird als Indiz für eine starke glykolytische Aktivität⁹⁾ angesehen (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004).

Vom Tetramer Laktatdehydrogenase sind insgesamt 5 Isoformen beschrieben, die sich jeweils aus den beiden Untereinheiten LDH-H und LDH-M zusammensetzen. Die LDH-H-Untereinheit, die vom LDH-B-Gen kodiert wird, befindet sich hauptsächlich im Herzen und die LDH-M-Untereinheit, die vom LDH-A-Gen kodiert wird, hauptsächlich im Muskel (Porporato PE et al., 2011).

⁸⁾ Die Begriffe „aerobe“ und „anaerobe“ Glykolyse, die im englischsprachigen Raum häufig verwendet werden (*aerobic*, *anaerobic glycolysis*), sind problematisch, da die Glykolyse per se keinen Sauerstoff benötigt. Mit dem Begriff „*aerobic glycolysis*“ werden sowohl die Zellatmung als auch der Warburg-Effekt bezeichnet und mit dem Begriff „*anaerobic glycolysis*“ die Gärung bzw. Fermentation.

⁹⁾ Zellen mit einer starken glykolytischen Aktivität weisen einen glykolytischen Stoffwechsel oder Phänotyp auf (Auswirkung bzw. Konsequenz des Warburg-Effekts). Hierzu gehört neben der gesteigerten Laktatbildung ein verstärkter Umsatz von Glukose (Aufnahme und Verstoffwechslung). Solche Zellen exprimieren z. B. verstärkt Glukosetransporter (GLUT1).

Tabelle 1.1:Die Isoformen der Laktatdehydrogenase (LDH): Modifiziert nach Porporato PE et al., 2011.

Isoform	Untereinheiten	Expression
LDH-1	4 H	Herz, Erythrozyten
LDH-2	3 H, 1 M	Lymphgewebe
LDH-3	2 H, 2 M	Lunge
LDH-4	1 H, 3 M	Nieren, Pankreas
LDH-5	4 M	Leber, Skelettmuskel

Die in der Literatur zu findenden Bezeichnungen LDH-A für die Isoform LDH-5 (4 M-Untereinheiten) und LDH-B für die Isoform LDH-1 (4 H-Untereinheiten) werden für diese Arbeit übernommen. Da die M-Untereinheit im Vergleich zur H-Untereinheit eine höhere maximale Umsatzgeschwindigkeit V_{max} für die Reduktion von Pyruvat zur Laktat aufweist, wird angenommen, dass die Reduktion von Pyruvat zu Laktat die bevorzugte Reaktion der LDH-A darstellt (Markert CL et al., 1975). Seit längerem ist bekannt, dass insbesondere LDH-A von verschiedenen Neoplasien überexprimiert wird (Goldman RD et al., 1964; Balinsky D et al., 1983), was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Koukourakis MI et al., 2003; Koukourakis MI et al., 2011).

Die Familie der Monocarboxylat-Transporter (MCT) vermittelt den Membrantransport von Laktat. Aktuell sind 14 MCT-Isoformen bekannt, von denen 7 funktionell charakterisiert sind, während die Rolle der anderen MCT-Isoformen weitgehend unklar ist. Die für diese Arbeit wichtigen Transportmoleküle MCT1 und MCT4 transportieren Monocarboxylate wie Laktat im Symport mit H^+ . In Tabelle 1.2 sind einige Mitglieder der MCT-Familie aufgeführt (Morris ME, Felmlee MA, 2008).

Tabelle 1.2: Mitglieder der MCT-Familie: Modifiziert nach Morris ME, Felmlee MA (2008).

Isoform	K_m Laktat (mmol/l) ¹⁰⁾	Expression
MCT1	3,5 - 6	ubiquitär
MCT2	-	Hoden, Nieren, ZNS
MCT3	-	Retina, glatte Gefäßmuskulatur
MCT4	28	Stark glykolytische Zellen, u.a. Skelettmuskelzellen, Lymphozyten, Tumoren
MCT6*	-	Gastrointestinaltrakt
MCT8*	-	Leber, Gehirn, Nieren
MCT10*	-	Nieren, Muskel, Leber

* MCT6, 8 und 10 transportieren nicht Laktat sondern verschiedene Substrate wie Pharmazeutika (MCT6), Schilddrüsenhormone (MCT8) und aromatische Amine (MCT10). Nach Morris et. al. wurde die Michaeliskonstante K_m für Laktat bisher lediglich für MCT1 und MCT4 genau bestimmt, alle anderen MCT-Isoformen wurden bisher nicht charakterisiert.

Für MCT1 und MCT4 wurde eine starke Expression durch verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen (Pinheiro C et al., 2008; Pinheiro C et al., 2010). Dabei wird die Expression von MCT4 in Hypoxie über den Transkriptionsfaktor HIF (s. Kapitel 1.3) reguliert (Ullah MS et al., 2006). Außerdem scheint eine verstärkte Expression von MCT1 und MCT4 mit einer Zunahme der Invasivität maligner Zellen zu korrelieren (Izumi H et al., 2011).

1.3 Mechanismen der Anpassung von Tumorzellen an Hypoxie

Es ist allgemein akzeptiert, dass Tumoren durch eine bestimmte Reihenfolge von Mutationen im Erbgut der Zellen entstehen (Fearon ER, Vogelstein B, 1990). Hanahan und Weinberg haben im Jahr 2000 die durch Mutationen ausgelösten Veränderungen zu sechs charakteristischen Eigenschaften von Krebszellen zusammengefasst, den sog. „Hallmarks of Cancer“ (Hanahan D, Weinberg RA, 2000). Neuere Studien belegen, dass Mutationen im Rahmen der Karzinogenese auch den Metabolismus von Tumorzellen beeinflussen. Die ektope Expression der Telomerase hTERT sowie der Onkogene H-ras und

¹⁰⁾ Die Michaeliskonstante K_m ist eine wichtige Kenngröße für enzymatische Reaktionen und gibt die Substratkonzentration an, bei der die Geschwindigkeit der Enzymreaktion (Umsatzgeschwindigkeit) halbmaximal ist ($K_m = \frac{1}{2} V_{max}$). Auch für Transportmoleküle gilt der K_m -Wert. Wichtig an dieser Stelle ist zu erwähnen, dass bei kleinen K_m -Werten das Substrat durch die Transportmoleküle fester gebunden wird und die Transportgeschwindigkeit dadurch höher ist.

SV40-T in humanen Fibroblasten führen nicht nur zu einer malignen Entartung (Hahn WC et al., 1999), sondern auch zu einer zunehmenden Abhängigkeit der Energiegewinnung von der Glykolyse (Ramanathan A et al., 2005). Die Aktivierung der Onkogene *AKT* und *MYC* ist mit einer verstärkten Aufnahme und Umsetzung von Glukose sowie Bildung und Freisetzung von Laktat verbunden (Elstrom RL et al., 2004; Fan Y et al., 2010). Der Verlust des Tumorsuppressorgens *P53* hemmt die oxidative Energiegewinnung und steigert den Glukoseumsatz in der Glykolyse (Matoba S et al., 2006).

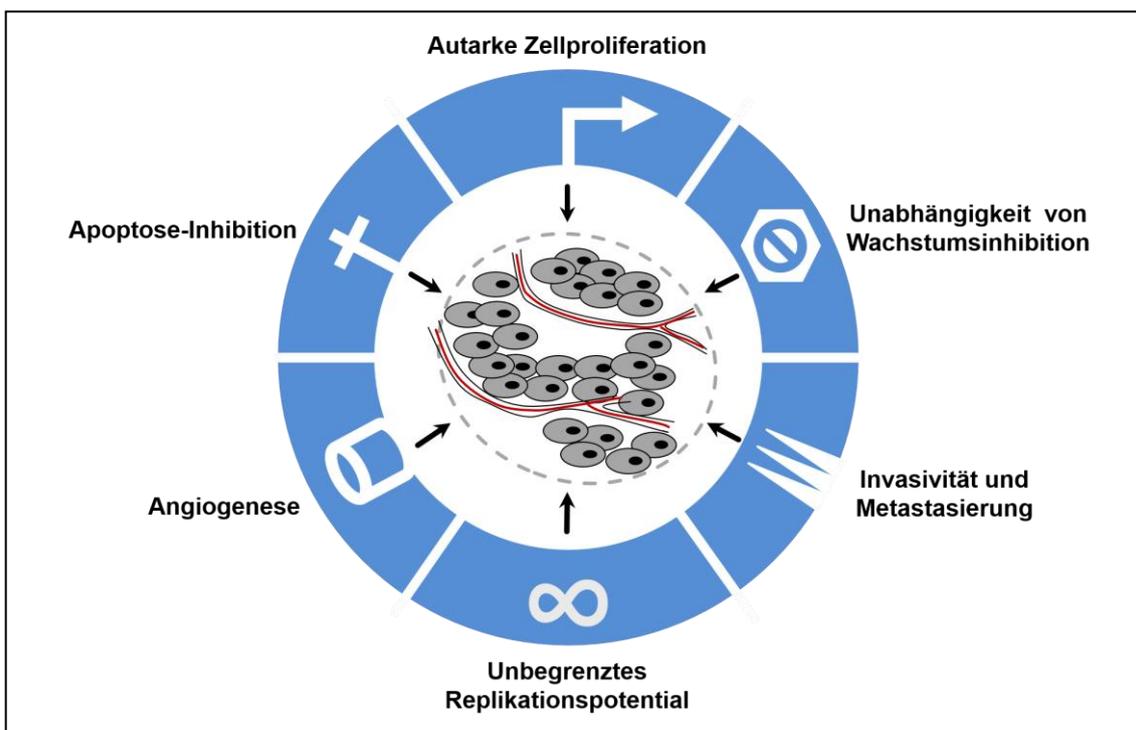


Abbildung 1.3: Die Hallmarks of Cancer. Dargestellt sind die von den Autoren Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 beschriebenen 6 Eigenschaften malignen Wachstums. Im Jahr 2008 erweiterten Kroemer und Pouyssegur diese Liste u.a. um Charakteristika im Tumorstoffwechsel (Kroemer G, Pouyssegur J, 2008). Hierauf hatten bereits Gatenby und Gillies im Jahr 2004 hingewiesen (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004). Modifizierte Darstellung nach Hanahan D, Weinberg RA, 2000.

Als Auslöser für den in Normoxie nachweisbaren Warburg-Effekt wird im Wesentlichen die unzureichende Versorgung solider Tumoren mit Sauerstoff verantwortlich gemacht. Es ist allgemein akzeptiert, dass von Hypoxie gesprochen wird, wenn die Sauerstoffkonzentration im Gewebe weniger als 2 % beträgt (Bertout JA et al., 2008). Der wesentliche Grund für Tumorphypoxie ist die ab-

norme Vaskularisation und Perfusion von Tumoren, die zu einer verminderten Diffusion führen (Höckel M, Vaupel P, 2001; Vaupel P, Mayer A, 2007). Untersuchungen von Gatenby und Gillies verdeutlichen eindrucksvoll das Ausmaß dieser Minderversorgung. So geraten in einem soliden Tumor Zellen bereits in Hypoxie, wenn sie mehr als 5 bis 10 Zellschichten von einem versorgenden Blutgefäß entfernt liegen (Gillies RJ, Gatenby RA, 2007). Die sich in Hypoxie befindenden Tumorzellen sichern dabei ihr Überleben ausschließlich mit Glukose, dem einzigen Energieträger, aus dem auch ohne Sauerstoff („anaerob“) Energie in Form von ATP gewonnen werden kann (Krebs HA, 1972; Racker E, 1974).

Für das Überleben von Tumorzellen in Hypoxie ist von großer biologischer Bedeutung, dass die Diffusion von Glukose extrem weit in das Tumorgewebe reicht. So diffundiert Glukose aus einem Blutgefäß in das Tumorgewebe mit einer Strecke von ca. 200 µm mehr als doppelt so weit wie Sauerstoff mit einer Diffusionsstrecke von ca. 80 µm (Kallinowski F et al., 1987). Messungen *in vivo* zum Sauerstoffgehalt von Zervixkarzinomen belegen eine zu benignen Zervixgeweben bestehende Unterversorgung mit Sauerstoff, die mit fortschreitender Erkrankung zunimmt (Kolstad P, 1968). Entsprechendes wurde bei Brustkrebs (Vaupel P et al., 1991) und Melanomen (Endrich B et al., 1988) beobachtet. Für die verminderte Sauerstoffversorgung von Tumoren wird der im Vergleich zu gesundem Gewebe vergrößerte Abstand zwischen den Kapillaren im Tumorgewebe verantwortlich gemacht. Große Anteile des Tumors sind somit der Hypoxie ausgesetzt. So kann der interkapillare Abstand in Zervixkarzinomen mehr als 450 µm betragen (Kolstad P, 1968).

Hypoxie bringt nicht nur die Zellatmung (oxidative Phosphorylierung) in den Mitochondrien zum Erliegen, sondern löst ebenfalls eine Reihe zellulärer Anpassungen aus, die durch eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, die als Hypoxie-induzierter Faktor oder HIF bezeichnet werden. HIF ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β - Untereinheit. Bis heute sind die Isoformen HIF-1 (Semenza GL, Wang GL, 1992), HIF-2 (Tian H et al., 1997) und HIF-3

(Gu YZ et al., 1998) beschrieben. Die Wirkung von HIF-1 ist dabei am besten untersucht. HIF-1 wird bei normaler Sauerstoffversorgung konstitutiv exprimiert (Huang LE et al., 1996) und proteosomal abgebaut (Pugh CW et al., 1997). Ein Abfall der Sauerstoffkonzentration bewirkt dagegen eine Stabilisierung von HIF-1 (Huang LE et al., 1998). So ist eine Überexpression von HIF-1 und HIF-2 für verschiedene Tumorentitäten und Metastasen beschrieben (Zhong H et al., 1999; Talks KL et al., 2000). Durch Bindung an sog. *HIF-responsive elements* (HREs) auf der DNA beeinflusst HIF die Expression einer Vielzahl von Genen. HIF-1 vermittelt u.a. die metabolische Anpassung der Zelle an Hypoxie durch Förderung der Glykolyse und Suppression der mitochondrialen Energiegewinnung (Carmeliet P et al., 1998). So steigert HIF-1 die Expression der Glukosetransporter GLUT 1 und 3, der Schlüsselenzyme der Glykolyse Hexokinase 1 und 2 und der Pyruvatkinase (Iyer NV et al., 1998) sowie der Laktatdehydrogenase A als dem Schlüsselenzym zur Bildung von Laktat (Iyer NV et al., 1998; Ryan HE et al., 1998).

Die Bedeutung der Mitochondrien im Tumorstoffwechsel ist bis heute wenig verstanden. Warburgs Überzeugung, dass Mitochondrien von Krebszellen in ihrer Funktion „geschädigt“ sind, gilt als widerlegt. Stattdessen werden andere Gründe für die geringere Zellatmung von Tumorzellen verantwortlich gemacht, wie z. B. eine geringere Anzahl an Mitochondrien (Pedersen PL, 1978). Auch Mutationen in der mitochondrialen DNA sind für verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen (Alonso A et al., 1997; Polyak K et al., 1998; Yeh JJ et al., 2000). Sie können zu einer verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen (Mattiuzzi M et al., 2004), die die Funktion der Atmungskette und damit die oxidative Energiegewinnung beeinträchtigen (Carew JS, Huang P, 2002; Brandon M et al., 2006).

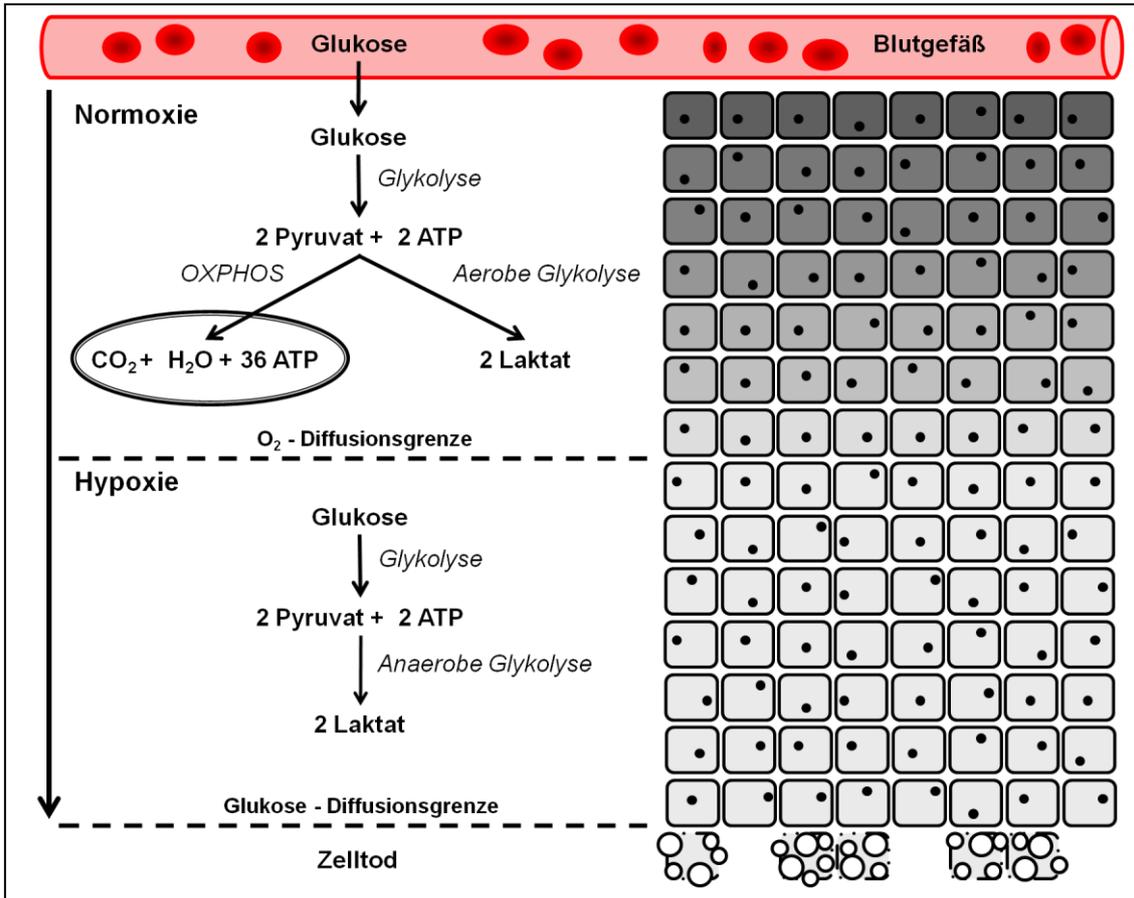


Abbildung 1.4: Der Glukosestoffwechsel von Tumorzellen. Der Glukosestoffwechsel von Tumorzellen wird vom Warburg-Effekt und von der lokalen Versorgung mit Sauerstoff beeinflusst. In Anwesenheit von Sauerstoff wird der Großteil der intrazellulären Glukose in den Mitochondrien vollständig zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert (OXPHOS). Je nach Ausprägung des Warburg-Effekts (Abb. 6.1) wird im Rahmen der aeroben Glykolyse ein bestimmter Anteil der Glukose zu Laktat verstoffwechselt (Kapitel 1.2.4). Da Glukose eine deutlich längere Diffusionsstrecke ausweist als Sauerstoff, ist das Überleben von Tumorzellen in Hypoxie durch die sauerstoffunabhängige Metabolisierung von Glukose zu Laktat möglich (Kapitel 1.3). Bei fehlender Versorgung mit Glukose ist der Erhalt der Zellintegrität nicht möglich und die Zellen sterben ab. Diese nekrotischen Areale sind häufig im Inneren von Tumoren zu finden. Eigener Entwurf inspiriert durch Gatenby RA und Gillies RJ, 2004. Die hellere Färbung der Zellen symbolisiert die mit zunehmender Distanz zum Blutgefäß abnehmende Sauerstoffkonzentration.

Der glykolytische Stoffwechsel¹¹⁾ von Tumoren wird als Anpassung an Hypoxie bereits im Rahmen der Karzinogenese interpretiert. Dieser Stoffwechsel ist von klinischer Relevanz, da z. B. eine starke Expression des Glukosetransporters GLUT1, Voraussetzung für einen erhöhten Umsatz von Glukose, mit einem verkürzten Gesamtüberleben der Patienten einhergeht. Dies wurde für das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle (Kunkel M et al., 2003; Eckert AW et al.,

¹¹⁾ Siehe Fußnote 9.

2011), das Gallenblasenkarzinom (Sung JY et al., 2010), das Ovarialkarzinom (Semaan A et al., 2011) und das Nebennierenrindenzellkarzinom (Fenske W et al., 2009) gezeigt. Zudem wird eine Verbindung zwischen der Expression von GLUT1 und der Invasivität von Tumoren diskutiert (Sakashita M et al., 2001; Jang SM et al., 2012).

Die Positronenemissionstomographie (PET) mit dem radioaktiv markierten Glukoseanalogon ¹⁸Fluor-2-Deoxyglukose (FDG-PET) ermöglicht Messungen zum Tumorstoffwechsel *in vivo*. So wurde ein glykolytischer Metabolismus für Sarkome, Glioblastome, Mammakarzinome und Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen (Rajendran JG et al., 2004). Eine starke Aufnahme von FDG durch Tumoren korreliert negativ mit dem Patientenüberleben. Dies wurde für das Magenkarzinom (Mochiki E et al., 2004), das Osteosarkom (Costelloe CM et al., 2009), das Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (Lim R et al., 2012) und nicht-kleinzellige Bronchiolalkarzinome (Chen HH et al., 2012) gezeigt. Eine starke glykolytische Aktivität von Tumoren kann mit einer erhöhten Rezidivrate (z. B. beim Ösophaguskarzinom; Westerp M et al., 2008) und einem verstärkten Auftreten von Lymphknotenmetastasen (z. B. beim Zervixkarzinom; Crivellaro C et al., 2012) einhergehen. Auch die starke Anreicherung von Laktat in Tumoren, eine Konsequenz des glykolytischen Stoffwechsels, korreliert mit einem erhöhten Rezidiv- und Metastasierungsrisiko sowie mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben (Walenta S et al., 1997; Walenta S et al., 2000). Der Tumorstoffwechsel ist nicht nur von prognostischer Relevanz, er hat auch direkte Auswirkungen auf die Therapie. So weisen Tumoren mit einer starken glykolytischen Aktivität eine erhöhte Strahlenresistenz auf (Quennet V et al., 2006; Sattler UG et al., 2010).

Die Positronenemissionstomographie mit FDG ist für verschiedene Tumorentitäten bereits fester Bestandteil der Routinediagnostik (Goeckenjan G et al., 2010; Rancea M et al., 2013). Für therapeutische Ansätze wurden bisher nur wenige vielversprechende Targetstrukturen im Tumorstoffwechsel identifiziert (Le A et al., 2012).

1.4 Ziele

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, inwieweit Laktatdehydrogenase und Monocarboxylat-Transporter geeignete Strukturen für eine gezielte Hemmung des Tumorstoffwechsels darstellen. Hierdurch sollen zytostatische bzw. zelltoxische Effekte in Tumorzellen ausgelöst werden. Das dahinter stehende Konzept basiert auf dem Warburg-Effekt und der Minderversorgung solider Tumoren mit Sauerstoff („Tumorhypoxie“). Demgegenüber erscheint die Hemmung einzelner Enzyme der Glykolyse als dem zentralen Abbauweg der Glukose wenig sinnvoll, da auch benigne Zellen zur Energiegewinnung auf diesen Stoffwechselweg angewiesen sind. Die Strategie, dass die bei Tumoren gesteigerte Glykolyse als Unterschied zu benignen Zellen ausreicht, um selektiv in den Tumorstoffwechsel eingreifen zu können, hat sich bisher aufgrund massiver Nebenwirkungen nicht bewährt (Porporato PE et al., 2011; Ko YH et al., 2012).

Sowohl der Warburg-Effekt bei Normoxie als auch die anaerobe Glykolyse bei Hypoxie führen zu einer massiven Bildung von Laktat. Wird die Tumorzelle daran gehindert, die für die Glykolyse notwendigen Reduktionsäquivalente mit Hilfe der Laktatdehydrogenase zu reoxidieren, sollte es zu einer Mangelsituation für die Zelle kommen, in der der Glukoseumsatz durch die eingeschränkte Glykolyse die Integrität der Zelle nicht mehr erhalten kann (Li X et al., 2013; Zhai X et al., 2013). Wird andererseits die Tumorzelle daran gehindert, Laktat über die Transporter MCT1 und MCT4 nach außen zu schleusen, so kommt es durch die intrazelluläre Übersäuerung ebenfalls zur Induktion von Apoptose (Izumi H et al., 2003; Pinheiro C et al., 2010; Kumar A et al., 2013)

Durch den Warburg-Effekt bei Normoxie und der anaeroben Glykolyse bei Hypoxie ist die Tumorzelle somit darauf angewiesen, Pyruvat zu Laktat zu reduzieren und dieses aus der Zelle zu entfernen. Mit der Hemmung der Laktatdehydrogenase und von MCT werden diese beiden Funktionen in der Tumorzelle gestört. Als Hemmstoffe hierfür wurden Natriumoxamat (NaOx) zur Hemmung der Laktatdehydrogenase und α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHC) zur Hemmung

von MCT1 und MCT4 gewählt. Ihre Wirkung auf die Zellvitalität wurde an der Zervixkarzinomzelllinie SiHa und der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie WiDr untersucht. Beide Zelllinien wurden bereits für Untersuchungen zum Stoffwechsel von Tumorzellen verwendet und sollen einen unterschiedlichen Zellstoffwechsel aufweisen: WiDr den für Tumoren typischen Warburg-Effekt und SiHa einen stärker oxidativen Stoffwechsel (Sonveaux P et al., 2008).

Untersuchungen zum Stoffwechsel von Tumorzellen werden *in vitro* in aller Regel bei einer Sauerstoffkonzentration von 21 % durchgeführt, obgleich die meisten Gewebe eine physiologische Sauerstoffkonzentration zwischen 2 % und 11 % aufweisen. In Tumorgeweben sind Sauerstoffkonzentrationen von weniger als 2 % eher die Regel als die Ausnahme (Vaupel P, Mayer A, 2007; Bertout JA et al., 2008; Solaini G et al., 2011). Messungen *in vivo* zur Oxygenierung von Tumorgeweben belegen, dass 1 % Sauerstoff repräsentativ für hypoxische und 5 % Sauerstoff für oxygenierte Bedingungen sind (Kallinowski F et al., 1990). Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit zum Stoffwechsel von Tumoren bei Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % durchgeführt. Für beide Sauerstoffkonzentrationen wurden Zellvitalität und Zellmetabolismus untersucht. Hierzu wurden der Glukoseverbrauch und die Laktatbildung gemessen. Zusätzlich wurde die Funktion der Mitochondrien mit einer Clark-Elektrode überprüft.

Die Wirksamkeit der beiden Inhibitoren wurde mit der Wirksamkeit des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil (5-FU) verglichen bzw. wurde untersucht, ob die Kombination von 5-FU mit den beiden Inhibitoren zu einer Steigerung der Wirksamkeit führt. 5-FU wurde gewählt, da es zur standardisierten Behandlung des kolorektalen Karzinoms gehört (de Gramont A et al., 2000; Andre T et al., 2009; Pox CP, Schmiegel W, 2013).

2 Fragen

1) WiDr soll den für Tumoren typischen glykolytischen Stoffwechsel aufweisen, SiHa einen oxidativen Stoffwechsel (Sonveaux P et al., 2008). Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % sind typisch für die Oxygenierung solider Tumoren (Kallinowski F et al., 1990). Wie wirken sich diese Bedingungen auf Zellvitalität und Stoffwechsel von SiHa und WiDr aus?

2) Der Export von Laktat wird durch die Familie der Monocarboxylat-Transporter (MCT) vermittelt (Morris ME, Felmlee MA, 2008). Welche Auswirkung hat die Hemmung von MCT mit α -Cyano-4-Hydroxymizimsäure (CHC) auf Zellvitalität, und Stoffwechsel von SiHa und WiDr?

3) Die Laktatdehydrogenase (LDH) ermöglicht, dass bei einem glykolytischen Stoffwechsel die für die Glykolyse notwendige oxidierte Form der Reduktionsäquivalente zur Verfügung steht. Hierbei wird Pyruvat zu Laktat reduziert, was als Milchsäuregärung bezeichnet wird. Welche Auswirkungen hat die durch Natriumoxamat vermittelte Hemmung der LDH auf Zellvitalität und Stoffwechsel von SiHa und WiDr?

4) Warburg-Effekt und anaerobe Glykolyse lösen eine starke Laktatbildung aus. Welche Auswirkung hat die Kombination von Natriumoxamat und 5-FU auf die Zellvitalität von SiHa und WiDr?

3 Material und Methoden

3.1 Zellkulturmedien und Pufferlösungen

Für die Experimente mit malignen Zellen wurde als Kulturmedium DMEM („Dulbeccos Modified Eagle Medium“) mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (25, 5, 0 mmol/L) mit folgenden Zusätzen (in Klammern jeweils die Endkonzentration) verwendet: Penicillin G (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/L), Natriumpyruvat (1 mmol/L), Glutamin (2 mmol/L), 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (alle Zusätze von Invitrogen GmbH, Karlsruhe) sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Cell Concepts GmbH, Umkirch). Für einige Versuche wurde zusätzlich L-Laktat (Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 10 mmol/L ins Medium zugegeben. Messungen zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurden in Phenolrot-freiem DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose (ohne weitere Zusätze) durchgeführt.

Phosphatgepufferte Salzlösung („Phosphate buffered Saline“, PBS) wurde in folgender Zusammensetzung verwendet: Natriumchlorid (140 mmol/L), Kaliumchlorid (2,7 mmol/L), Natriumdihydrogenphosphat (7,2 mmol/L) sowie Kaliumhydrogenphosphat (1,47 mmol/L) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

Tabelle 3.1: Kulturmedien.

Medium	Glukose [mmol/L]	Hersteller
„DMEM High Glukose“ ^{*)}	25	Cell Concepts
„DMEM Low Glukose“ ^{**)}	5	Gibco
„DMEM No Glukose“	0	Gibco

^{*)} Sämtliche Stammmedien wurden aus Medium ohne Zusätze hergestellt. Messungen zur Bestimmung von ROS erfolgten in „DMEM High Glukose“ ohne Zusätze und ohne Phenolrot.

^{**)} DMEM-Medium mit 5 mmol/L Glukose („DMEM Low Glukose“) wurde aus Glukose-freiem DMEM-Medium durch Zugabe einer steril filtrierten 1 molaren Glukosestammlösung hergestellt.

3.2 Zelllinien

Für die Untersuchungen wurden die squamöse Zervixkarzinomzelllinie SiHa und die kolorektale Adenokarzinomzelllinie WiDr eingesetzt (Tab. 3.2). Alle Zelllinien waren frei von Mycoplasmen.

Tabelle 3.2: Zelllinien.

Zelllinie	Charakteristika	Zellstoffwechsel ^{*)}	Bezugsquelle
SiHa	squamöses Zervixkarzinom	oxidativ	ATCC ^{**)}
WiDr	kolorektales Adenokarzinom	glykolytisch	ATCC ^{**)}

^{*)} Nach Angaben von Sonveaux P et al., 2008. Danach soll WiDr den für Tumoren charakteristischen Warburg-Effekt aufweisen und SiHa einen oxidativen Stoffwechsel.

^{**)} American Type Culture Collection (www.atcc.org).

3.3 Zellkultur

Die Zellen der beiden Tumorzelllinien (Tab. 3.2) wachsen adhärent und wurden in 750 ml Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen wurden in DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose kultiviert. Das Zellwachstum wurde täglich unter dem Mikroskop kontrolliert und die Zellen bei einer Konfluenz von > 80 % passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium vollständig entfernt, die Zellen mit Trypsin 0,5 % /EDTA 0,22 % in PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, diese in 50 mL PBS für 6 min bei 150 xg zentrifugiert und anschließend in DMEM-Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µL Zellsuspension mit 90 µL 10 % Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis) sorgfältig gemischt (Verhältnis 1:10) und 10 µL auf eine Neubauerzählkammer übertragen. Sämtliche Zellen, die sich in den 4 Großquadranten im Zählfeld der Neubauer-Zählkammer befanden und nicht durch Trypanblau angefärbt waren, wurden gezählt. Trypanblau dient der Differenzierung vitaler Zellen von toten Zellen. Da beim Zelltod die Zellmembran permeabel wird, diffundiert Trypanblau in tote Zellen und färbt diese dunkelblau. Vitale Zellen werden nicht angefärbt. Die Zellzahl pro mL wurde mit folgender Formel

bestimmt (wobei mit dem Faktor 10^4 vom Kammervolumen, das $0,1 \mu\text{L}$ beträgt, auf ein Volumen von 1 mL umgerechnet wird):

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen} \times \text{Verdünnung} \times 10^4}{4}$$

Die Zellen wurden entweder zur weiteren Kultivierung in Zellkulturflaschen ausgesät oder für Versuche aufgearbeitet.

Versuche bei 5% und 1% Sauerstoff wurden in der Hypoxiewerkbank von Coy Laboratory Products (Grass Lake, USA) durchgeführt. Hierzu wurden die Tumorzellen bei 5% CO_2 und 90% Stickstoff (um eine 5% ige Sauerstoffatmosphäre einzustellen) bzw. bei 99% Stickstoff (um eine 1% ige Sauerstoffatmosphäre einzustellen) inkubiert. Zu Versuchsbeginn in Hypoxie erhielten alle Zellkulturen frisches Medium, das zuvor für mindestens 12 Stunden bei der jeweiligen Sauerstoffkonzentration inkubiert wurde.

3.4 Inhibitoren

Der MCT-Inhibitor α -Cyano-4-hydroxymizsäure (CHC) und Natriumoxamat (beide Sigma Aldrich, St. Louis, USA) wurden in Glukose-freiem DMEM-Medium bzw. in DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose ohne Zusätze gelöst. Die Konzentrationen der Stammlösungen betragen 50 mmol/L für CHC und 250 mmol/L für Natriumoxamat. Der pH-Wert wurde mit einer 1 mol/L NaOH-Lösung bzw. mit 4 mol/L HCl-Lösung auf einen pH-Wert von $7,4 \pm 0,02$ eingestellt. Die Stammlösungen wurden mit Spritzenfilter (Porengröße: $0,2 \mu\text{m}$) sterilfiltriert. Zur Messung reaktiver Sauerstoffspezies in Phenolrot-freiem Medium wurden CHC und Natriumoxamat in Konzentrationen von 50 mmol/L bzw. 500 mmol/L , gelöst in PBS, eingesetzt.

CHC weist eine Dissoziationskonstante von $425 \mu\text{mol/L}$ für MCT1 und $991 \mu\text{mol/L}$ für MCT 4 auf. Das bedeutet, dass MCT1 durch CHC stärker gehemmt wird als MCT4 (Morris ME, Felmlee MA, 2008). Darüber hinaus ist CHC in der Lage, die mitochondrialen Monocarboxylat-Transporter und damit die mi-

tochondriale Pyruvataufnahme *in vitro* zu hemmen (Halestrap AP, 1975). Natriumoxamat ist ein Substratanalogon von Pyruvat, das die Laktatdehydrogenase kompetitiv hemmt (Novoa WB et al., 1959; Goldberg EB, Colowick SP, 1965). Insbesondere die hemmende Wirkung von Natriumoxamat auf die Isoform LDH-A ist untersucht, wobei eine Dissoziationskonstante von 136 $\mu\text{mol/L}$ angegeben wird (Thornburg JM et al., 2008). Der Folsäureantagonist 5-Fluorouracil (5-FU) wurde als Stammlösung aus der Universitätsapotheke bezogen und für die jeweiligen Versuche entsprechend mit Medium verdünnt.

Die EC_{50} -Werte für CHC, Natriumoxamat und 5-FU wurden mit dem Kristallviolettassay nach folgender Formel berechnet (Huber W, Koella JC (1993):

$$\log(EC50) = \log(x1) + \frac{y1 - \frac{y0}{2}}{y1 - y2} \times (\log(x2) - \log(x1))$$

Die x-Werte repräsentieren die unterschiedlichen Konzentrationen an Inhibitor (Bedingung: $x_2 > x_1$), während die y-Werte Endpunktmessungen (in „Optischer Dichte“, OD), bestimmt mit dem Kristallviolett-Assay nach 24 Stunden, darstellen.

y_0 = OD unbehandelter Zellen

y_1 = OD von Zellen mit Konzentration x_1 behandelt

y_2 = OD von Zellen mit Konzentration x_2 behandelt

3.5 Bestimmung von Glukose und Laktat

Die Konzentrationen von Glukose und Laktat wurden in Zellkulturüberständen von konfluenten Kulturen (Zelldichte > 80 %) bestimmt (Abb. 3.1). Zu Versuchsbeginn erhielten die Kulturen frisches Medium mit den entsprechenden Inhibitoren bzw. Inhibitor-freies Medium als Kontrolle. In Intervallen von 24 Stunden wurden 600 μL Überstand entnommen, zentrifugiert und der zellfreie Überstand bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt. Die durch die Kulturen verbrauchte Glukose und das von ihnen gebildete Laktat sind in mmol/L für 1×10^6

Zellen und für eine Inkubationszeit von 24 Stunden angegeben. Hierzu wurde die Zellzahl mit der Neubauerzählkammer bestimmt.

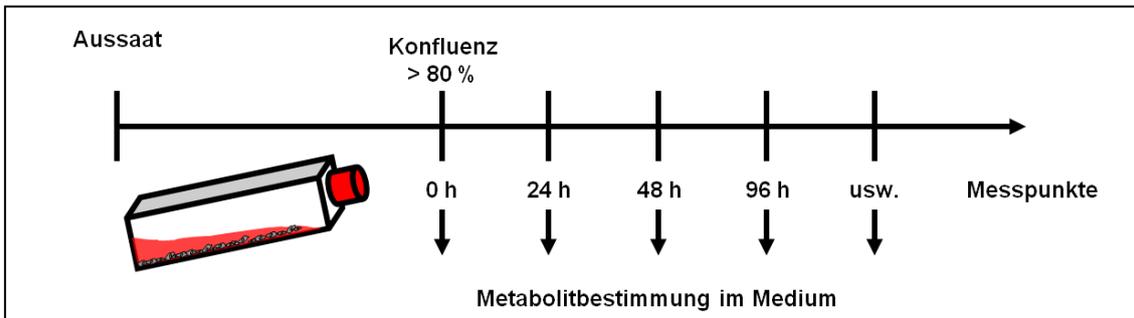
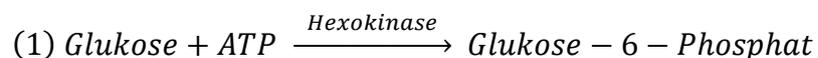


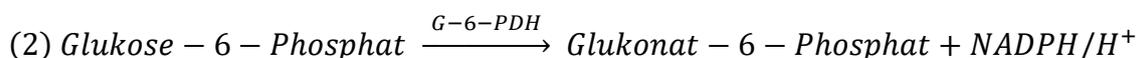
Abbildung 3.1: Messung von Glukose und Laktat im Überstand konfluenter Kulturen. Die Untersuchungen wurden in mittleren Zellkulturflaschen mit 75 cm² Fläche durchgeführt.

3.5.1 Glukose

Glukose wurde mit dem Analysegerät cobas[®] c 701 (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) bestimmt. Der Nachweis beruht auf einem kombinierten Enzymassay nach Warburg:



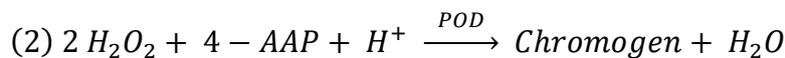
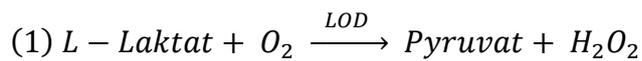
In einem 2. Reaktionsschritt wird Glukose-6-phosphat durch die Glukose-6-phosphatdehydrogenase zu Gluconat-6-phosphat oxidiert. Dabei wird das Coenzym NADP zu NADPH+H⁺ reduziert:



Die Reaktionsgeschwindigkeit zur Bildung von NADPH ist direkt proportional zur Glukosekonzentration und wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Konzentrationsangaben in „mg/dL“ wurden mit dem Faktor 0,05 in mmol/L umgerechnet.

3.5.2 Laktat

L-Laktat wurde ebenfalls mit dem Analysesystem cobas[®] c 701 (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) bestimmt. Hierbei handelt es sich um einen kombinierten Enzymassay, bei dem ein Chromogen gebildet wird. Die Farbintensität ist proportional zur Konzentration von L-Laktat. Die Extinktion wird bei einer Wellenlänge von 552 nm bestimmt.



3.6 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Die Zellzahl wurde sowohl in konfluenten als auch in wachsenden Kulturen bestimmt (Abb. 3.2). Hierzu wurden die Zellen entweder in kleinen Zellkulturflaschen (konfluente Kulturen) oder in 96-Well-Zellkulturschalen (wachsende Kulturen) gezogen. Bei einer Zelldichte (Konfluenz) von ca. 80 % wurde alle 24 Stunden die Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer durch Auszählen von jeweils drei Zellproben bestimmt. Zusätzlich wurden Proben zur pH-Bestimmung abgenommen. Die Zellvitalität von wachsenden Kulturen wurde mit dem Kristallviolettassay bestimmt. Wo nicht anders angegeben, wurden alle Zellen mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Vertiefung ausgesät und über Nacht inkubiert. Bei Versuchsbeginn am nächsten Tag wurden zu sämtlichen Vertiefungen 200 μL frisches Medium gegeben. Die Zellzahl wurde zu den entsprechenden Zeitpunkten bestimmt (Abb. 3.2).

Der Kristallviolettassay ist ein Proliferationsassay für adhärente Zellen (Gillies RJ et al., 1986), der in der vorliegenden Arbeit auch als Vitalitätsassay eingesetzt wurde. Tote bzw. sterbende Zellen verlieren ihre Adhärenz, weshalb der Verlust der Zelladhärenz auch als das letzte Stadium des Zelltods angesehen werden kann. Am Versuchsende wurde der Überstand mit allen abgestorbenen Zellen entfernt und zu jeder Vertiefung der 96-Well-Zellkulturplatte 100 μL Methanol zur Fixierung der Zellen pipettiert. Nach 10 min wurde das Methanol entfernt und die Zellen für weitere 10 min mit 100 μL Kristallviolett gefärbt. Die

überschüssige Farbe wurde durch viermaliges Waschen mit Aqua dest. abgespült und die Platte für 30 min unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurde der Farbstoff mit 200 μL 10 %iger Essigsäure in Lösung gebracht. Um den Farbstoff gleichmäßig zu lösen, wurden die Zellkulturplatten für 30 min auf einen Schüttler gestellt. Die Bestimmung der Farbintensität erfolgte photometrisch mit einem ELISA-Reader bei 570 nm. Vertiefungen mit Medium, aber ohne Tumorzellen, waren Kontrollen zur Bestimmung des „Leerwertes“ (Optische Dichte des Kulturmediums). Zur Erstellung der Standardkurve wurden folgende Zellzahlen ausgesät: $1,25 \times 10^3$, $2,5 \times 10^3$, 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 , 8×10^4 . Nach Inkubation für 1 Stunde sowie mikroskopischer Kontrolle der Adhärenz wurde der Kristallviolettassay wie oben beschrieben durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen Zellzahl und gemessener Optischer Dichte ($\text{OD}_{570\text{nm}}$) war stets linear (siehe Anhang).

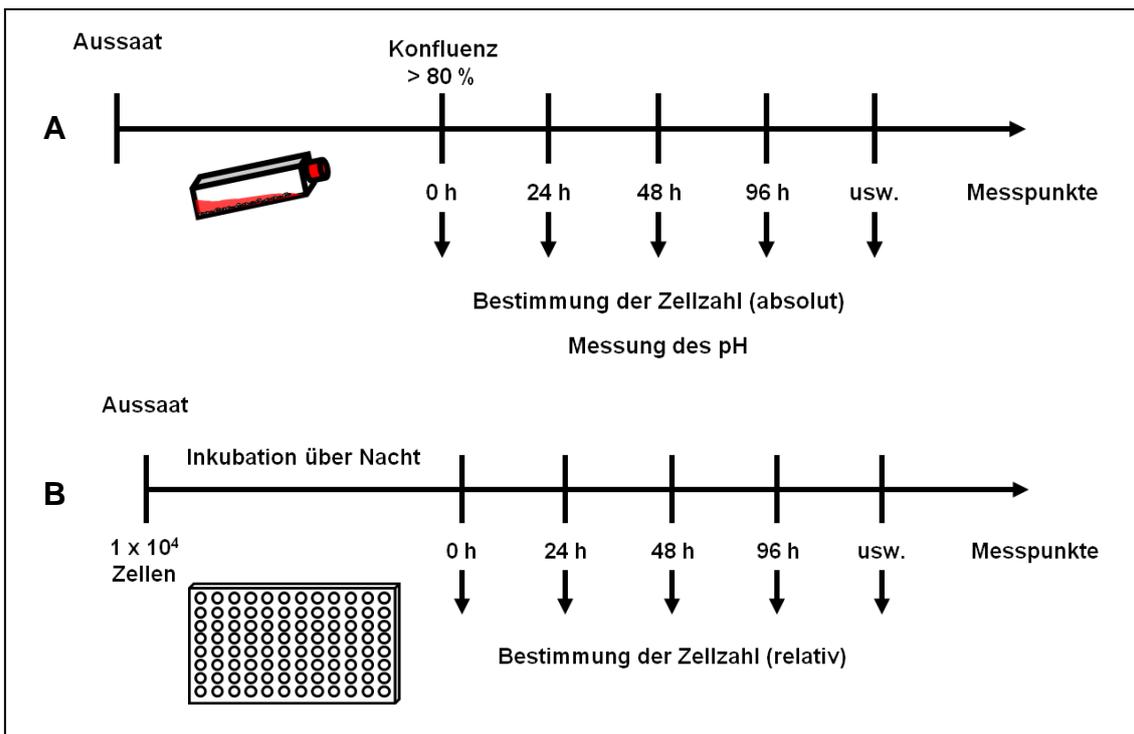


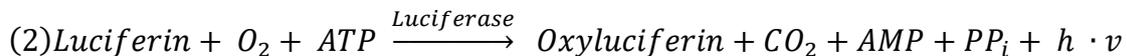
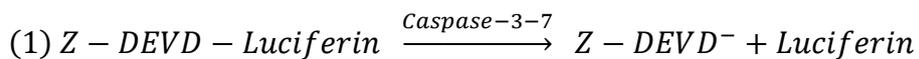
Abbildung 3.2: Bestimmung der Zellvitalität von konfluenten (A) und wachsenden (B) Kulturen. Konfluente Kulturen wurden in 25 cm^2 Zellkulturflaschen kultiviert; wachsende Kulturen wurden mit einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen pro Vertiefung in 96-Well-Zellkulturplatten gestartet. Die Zellzahl wurde entweder mit der Neubauer-Zahlkammer (A) oder mit dem Kristallviolettassay (B) bestimmt.

3.7 pH-Messungen

Der pH-Wert wurde bei Zimmertemperatur in drei unabhängigen Messungen bestimmt. Die Messsonde wurde zwischen jeder Einzelmessung mit Aqua dest. gereinigt. Das Messgerät (pH 526, WTW GmbH, Weilheim, Deutschland) wurde nach Herstellerangaben mit definierten Standardlösungen mit pH-Werten von 4,0 bzw. 7,0 geeicht.

3.8 Messung der Caspase-Aktivität

Die Caspase-Aktivität wurde mit dem Caspase-Glo[®]-3/7-Assay (Promega, Madison, USA) bestimmt. Dieser Assay beruht auf dem Prinzip der Biolumineszenz. Hierzu ist Luciferin mit einem Tetrapeptid (Z-DEVD) substituiert, das durch Caspasen gespalten wird. Das freigesetzte Luciferin wird durch das Enzym Luciferase zu Oxyluciferin umgewandelt und die dabei entstehende Biolumineszenz mit einem Luminometer gemessen. Die Reaktion lautet:



Im ersten Reaktionsschritt entsteht durch Abspaltung des substituierten Peptids (Z-DEVD) das Substrat Luciferin, das im zweiten Reaktionsschritt zu Oxyluciferin umgewandelt wird. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µL Reagenz gestartet und der Ansatz zur Stabilisierung des Signals bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lumineszenzsignal wurde 40 Minuten nach Zugabe des Reagenz in 20-minütigen Intervallen gemessen. Für diesen Assay wurden 1 x 10⁴ Zellen pro Vertiefung einer weißen 96-Well-Platte am Vortag ausgesät.

3.9 Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies

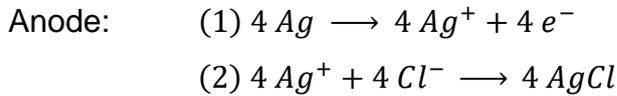
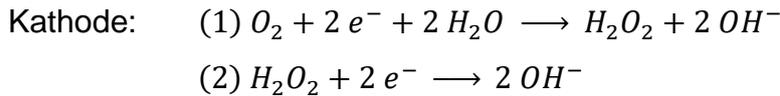
Der Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erfolgte mit dem Fluoreszenzmarker 2', 7'- Dichlorodihydrofluoresceindiazetat (DCFH-DA) von Sigma Aldrich (St. Louis, USA). DCFH-DA ist eine nicht-fluoreszierende Vorstufe, die in der Lage ist durch Zellmembranen zu diffundieren. Durch intrazelluläre Esterasen wird DCFH-DA zu nicht-fluoreszierendem 2', 7'- Dichlorodihydro-

fluorescein (DCFH) gespalten. Reaktive Sauerstoffspezies oxidieren DCFH zu fluoreszierendem 2', 7'- Dichlorodihydrofluorescein (DCF). Zur Messung der reaktiven Sauerstoffspezies wurden 1×10^4 Zellen in durchsichtigen 96-Well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Zu Versuchsbeginn wurde DCFH-DA in einer Konzentration von 20 mmol/L, gelöst in Methanol, und 1:200 in DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose verdünnt (DCFH-DA-Medium). Die Zellen wurden für 1 Stunde mit DCFH-DA-Medium inkubiert, der Überstand abgenommen, die Zellen mit 100 μ L PBS pro Vertiefung gewaschen und anschließend Phenolrot-freies DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose und ohne weitere Zusätze hinzugegeben. Bei Versuchsende wurden die Zellen lysiert, um eine weitere Bildung von DCF zu verhindern. Die Fluoreszenz wurde mit einem TECAN-Fluorometer (Anregung 485 nm, Emission 530 nm) nach 120 min bestimmt. Als Positivkontrolle wurde Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in einer Konzentration von 100 μ mol/L eingesetzt. Die glukoseunabhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurde in PBS bestimmt (Negativkontrolle). Ebenfalls wurde die Autofluoreszenz der Medien (ohne Zellen) wurde bestimmt (Leerwert). Die gemessene Fluoreszenz in RFU-Einheiten („relative fluorescence units“) wurde auf die Fluoreszenz vom DMEM-Medium bei 21 % Sauerstoff bezogen.

3.10 Messungen zum Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch wurde mit einer Clark-Elektrode von Hansatech, Norfolk, Großbritannien, bestimmt (Šerák L et al., 1987; Wu C-C et al., 2010). Hierbei wird die Reduktion von Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O) gemessen.

Die Clark-Elektrode besteht aus einer Platinkathode sowie einer Bezugsanode aus Silber. Über die Elektroden wird eine semipermeable, mit Kaliumchlorid-Lösung (0,24 mmol/L) getränkte Membran gespannt, die die Elektroden von der Messkammer mit der zu untersuchenden Probe trennt. An die Elektroden wird eine negative Spannung von $-0,6$ bis $-0,8$ mV angelegt. Sobald die Messkammer mit der Probe gefüllt ist, diffundiert der Sauerstoff durch die semipermeable Membran zu den Elektroden; dabei laufen folgende Reaktionen ab:



Der Sauerstoff wird an der Kathode zum Hydroxidion (OH^-) reduziert. Der bei der Reaktion fließende Strom I ist proportional zum Sauerstoffpartialdruck $p(O_2)$ an der Elektrode und somit proportional zum Sauerstoffgehalt der gesamten Messprobe. Da die Löslichkeit von Sauerstoff durch die Temperatur beeinflusst wird und die Messung an vitalen Zellen durchgeführt wird, wurden alle Proben bei konstant $37^\circ C$ gemessen. Die Zellsuspension wurde kontinuierlich mit einem Magnetrührer durchmischt, um den Aufbau eines Sauerstoffgradienten zu verhindern. Die Elektrode wurde vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende sorgfältig gereinigt, um insbesondere an der Anode angelagertes Silberchlorid ($AgCl$) zu entfernen.

Für jede Messung wurden $300 \mu L$ Zellsuspension mit je 5×10^6 bzw. 1×10^7 Zellen mit $300 \mu L$ frischem Medium in die Messkammer der Clark-Elektrode überführt und mit einem Deckel luftdicht verschlossen. Anschließend wurde die Messung sofort gestartet, wobei die Messdauer jeweils 5 min betrug. Die Messwerte wurden mit dem Computerprogramm „O2view Version 1.04“ (Hansatech Instruments, Norfolk, Großbritannien) aufgenommen, ausgewertet und graphisch dargestellt. Der Sauerstoffverbrauch der Tumorzellen wurde als Respirationsrate in $nmol O_2 \times min^{-1}$ für 1 Millionen Zellen umgerechnet. Vor jedem Versuch wurde die Clark-Elektrode mit Aqua dest. bei $37^\circ C$ nach Herstellerangaben geeicht. Die Nullpunkt-Bestimmung erfolgte mit Dithionid bis sich stabile Werte einstellten. Zusätzlich vor Versuchsstart wurde eine „Leerkontrolle“ (Medium ohne Zellen) für die Dauer von 5 min gemessen.

3.11 Western Blot-Analysen

Die Western Blot-Technik ist ein Nachweisverfahren für Proteine in einem Proteingemisch. Hierzu wird das Gemisch nach elektrophoretischer Trennung auf eine Trägermembran übertragen und die gesuchten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen („Immunoblot“). Zuerst wird der an das Protein bindende primäre Antikörper auf die Membran gegeben und im Anschluss der zweite enzymmarkierte sekundäre Antikörper. Dieser Antikörper, der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist, das das Chemilumineszenz-Reagenz Luminol umsetzt, dient zu Sichtbarmachung der nachgewiesenen Proteine. Bei dieser Oxidation wird Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm emittiert, das einen entsprechend empfindlichen Röntgenfilm belichtet.

Für die Western Blot-Analysen wurden 1×10^6 Zellen in einem Reaktionsgefäß bei 600 xg für 5 Minuten zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen, in Stickstoffschockgefroren und bei -20°C gelagert. Das Zellpellet wurde mit RIPA-Puffer (Thermo Fisher, Pierce), der zusätzlich mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt war, lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford Assay (Roti-Quant, Carls-Roth GmbH, Katalog Nr.: K015.3) bestimmt. Jeweils 30 μg Protein wurden pro Geltasche in ein 9 %iges Agarosegel (Amresco, Katalog-Nr. J234) aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 80 V für 30 Minuten und bei 120 V für 90 Minuten. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran (2 μm Porengröße, Hartenstein, Katalog Nr.: BA 83) übertragen und der Transfer wurde mit Hilfe der Ponceau-Rot Färbung (Sigma, Katalog Nr.: P7170-1L) überprüft. Einen Überblick über die primären und sekundären Antikörper gibt Tab. 3.3. Das Chemilumineszenz-Reagenz wurde von GE Healthcare, Amersham (Katalog Nr.: 2132), der Proteinstandard von Fermentas, Life Science (Katalog Nr.: SM0671) bezogen. Die quantitative densitometrische Analyse der Proteine MCT1, MCT4, LDH-A und LDH-B wurde auf β -Aktin normalisiert und mit dem Programm „ImageJ 1.41“ (Wayne Rasband, National Insitution of Health, USA) durchgeführt.

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

Antikörper	Bezugsquelle	Katalog Nr.:	Verdünnung	Größe (kDa)
MCT1	Sigma	HPA003324	1:500	48
MCT4	Sigma	HPA021451	1:1 000	43
LDHA	abcam	ab47010	1:20 000	36
LDHB	abcam	ab75167	1:40 000	37
β-Aktin	abcam	Ab8226	1:7 500	42
Anti-Mouse ¹⁾	KPL	074-1806	1:10 000	-----
Anti-Rabbit ¹⁾	Invitrogen	A-10547	1:15 000	-----

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

3.12 Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Excel 2007 der Firma Microsoft. Bei Wiederholungen der Messungen wurden Mittelwert und Standardabweichung gebildet. Die Zellvitalität wurde zum besseren Vergleich zwischen den Zelllinien auf die Aussaat in Prozent umgerechnet. Die statistischen Tests zur Signifikanzberechnung wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 (Statcon, Witzenhausen, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde der „Mann-Whitney-U-Test“ für den Vergleich von 2 Gruppen bzw. der „Kruskal-Wallis-Test“ mit „Dunn’s post-hoc Test“ für den Vergleich mehrerer Gruppen verwendet. Unterschiede von $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Die Darstellung der Graphen erfolgte mit OriginPro 9.1 (OriginLab, Northampton, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Der Stoffwechsel von SiHa und WiDr

4.1.1 Bestimmung des Zellwachstums nicht-konfluenten Kulturen

Als erstes wurde untersucht, ob SiHa und WiDr auch bei 1 % Sauerstoff wachsen. Hierzu wurden jeweils 1×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 1 % Sauerstoff und zum Vergleich bei 21 % Sauerstoff inkubiert. Am nächsten Tag erhielten die Zellen zum Versuchsbeginn jeweils 200 μ L frisches DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose. Das Zellwachstum wurde mit dem Kristallviolettassay nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt (Abb. 4.1).

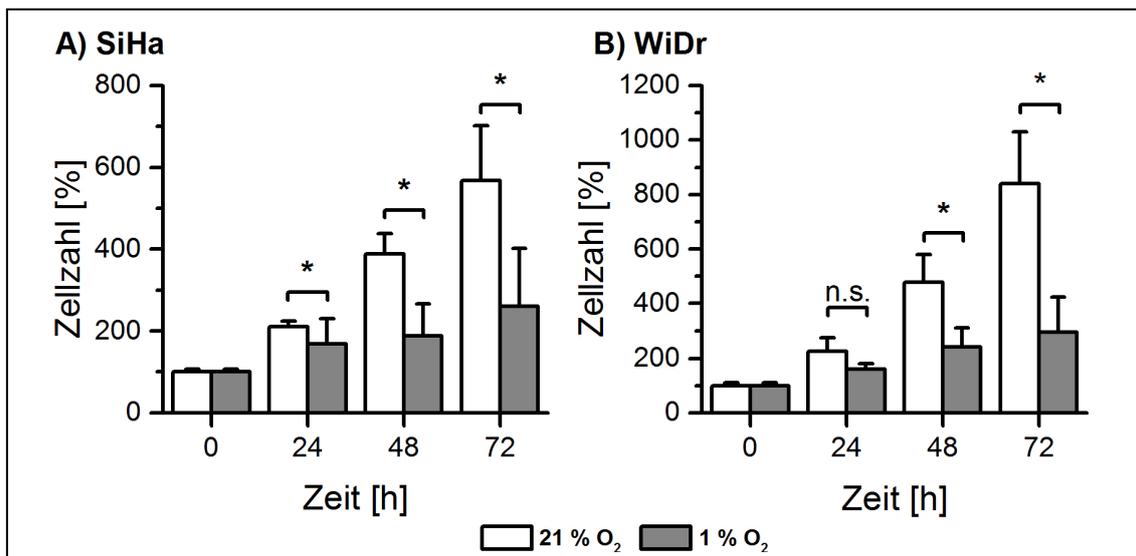


Abbildung 4.1: Zellwachstum von SiHa (A) und WiDr (B) bei 21 % und 1 % Sauerstoff. Dargestellt sind die prozentualen Änderungen der Zellzahlen zur Ausgangszellzahl als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Versuchen mit jeweils 6 Parallelwerten. Bei Versuchsbeginn erhielten alle Kulturen frisches DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Bei 21 % Sauerstoff zeigten beide Zelllinien ein starkes Zellwachstum, wobei WiDr stärker wuchs als SiHa. Auch bei 1 % Sauerstoff war für beide Zelllinien ein deutliches, aber doch geringeres Zellwachstum zu beobachten als bei 21 % Sauerstoff.

4.1.2 Bestimmung der Zellvitalität konfluenter Kulturen

Die Zellvitalität von SiHa und WiDr wurde zusätzlich zur Wachstumskultur (Kapitel 4.1.1) auch in konfluenten Kulturen (Zelldichte >80 %) bei Sauerstoffkonzentrationen von 21 %, 5 % und 1 % in DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose im Intervall von 24 Stunden mit Trypanblau bestimmt. Der Grund hierfür war, mögliche metabolische Unterschiede von wachsenden und konfluenten Kulturen zu erkennen. Bis auf die Untersuchungen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und zum therapeutischen Effekt der Kombination aus Natriumoxamat und 5-FU (Kapitel 4.1.6 und 4.4) wurden sämtliche Versuche mit konfluenten Kulturen durchgeführt.

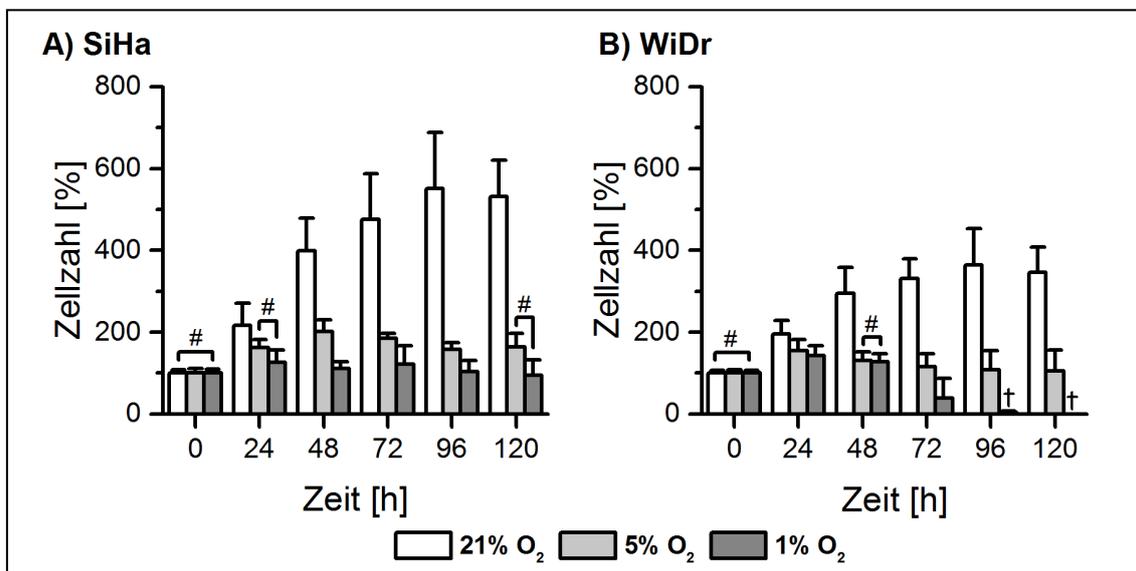


Abbildung 4.2: Zellwachstum konfluenter Kulturen von SiHa (A) und WiDr (B). Konfluente Kulturen von WiDr reagieren empfindlicher auf die Inkubation mit 1 % Sauerstoff als SiHa. Dargestellt sind die prozentualen Änderungen der Zellzahlen zur Ausgangszellzahl als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=3-5$ unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 Parallelwerten. Die Messungen wurden bei Sauerstoffkonzentrationen von 21 %, 5 % und 1 % durchgeführt. Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent und erhielten frisches DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose. Das Kreuz markiert komplett abgestorbene Kulturen von WiDr bei 1 % Sauerstoff nach 72 Stunden. Kruskal-Wallis-Test (Dunn's Multiple Comparison post-hoc Test) mit $p < 0,05$. Zur besseren Übersicht sind ausschließlich nicht-signifikante Ergebnisse mit einer Raute (#) markiert. Die Unterschiede zwischen den anderen Gruppen sind signifikant.

Bei 21 % Sauerstoff wuchsen Zellen von SiHa deutlich schneller als Zellen von WiDr. Bei dieser Sauerstoffkonzentration kam es zu einer weiteren Zunahme der Zellzahl bis 72 Stunden nach Versuchsbeginn; danach blieben die Zellzah-

len nahezu unverändert (Abb. 4.2). Das Zellwachstum war bei 5 % Sauerstoff im Vergleich zu 21 % Sauerstoff stark verringert. Dennoch kam es bei beiden Zelllinien zu einer Verdoppelung der Zellzahl. Bei 1 % Sauerstoff war kein Zellwachstum mehr zu beobachten: während bei SiHa zytostatische Effekte im gesamten Untersuchungszeitraum auftraten, kam es bei Kulturen von WiDr zum vollständigen Verlust der Zelladhärenz zwischen 72 und 96 Stunden (Abb. 4.2).

4.1.3 Der pH-Wert im Zellkulturüberstand konfluenter Kulturen

Durch die Stoffwechselaktivität vitaler Tumorzellen wird Laktat produziert, das in den Zellkulturüberstand abgegeben wird; hierdurch ändert sich der pH-Wert.

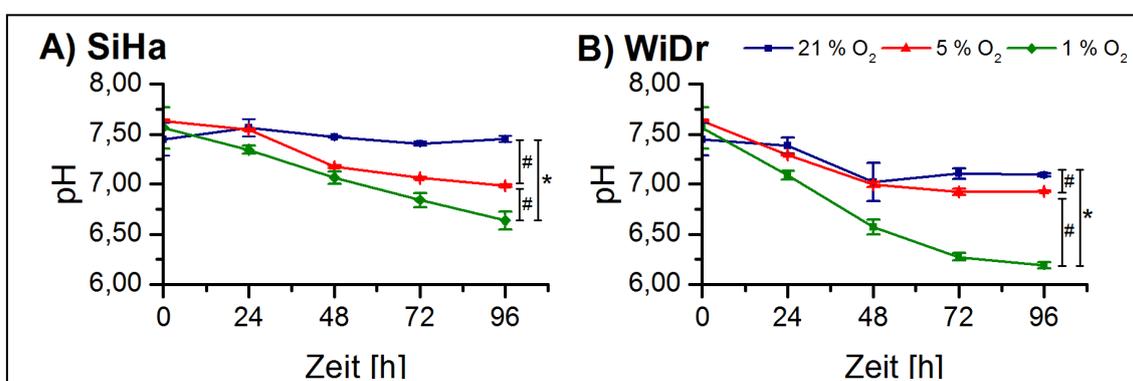


Abbildung 4.3: Der pH-Wert im Zellkulturüberstand von SiHa (A) und WiDr (B). Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=2-3$ unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Messungen. Die Werte für 5 % Sauerstoff basieren auf einem Experiment mit jeweils drei Messungen. Kruskal-Wallis-Test (Dunn's Multiple Comparison post-hoc Test). * $p < 0,05$, # = nicht signifikant.

Zu Versuchsbeginn wies das Kulturmedium einen pH-Wert von 7,5 auf. Bei 21 % Sauerstoff blieb der pH-Wert für SiHa-Kulturen im zeitlichen Verlauf nahezu konstant, während er für WiDr-Kulturen leicht abfiel (Abb. 4.3). Bei 5 % Sauerstoff unterschieden sich der pH-Wert von SiHa- und WiDr-Kulturen nicht wesentlich über den gesamten Beobachtungszeitraum. Bei 1 % Sauerstoff änderte sich der pH-Wert bei beiden Zelllinien am stärksten. Nach 96 Stunden Inkubation fiel bei SiHa-Kulturen der pH-Wert auf $6,6 \pm 0,05$ und bei WiDr-Kulturen auf $6,2 \pm 0,03$ ab (Abb. 4.3).

4.1.4 Glukoseverbrauch und Laktatbildung konfluenten Kulturen

Glukoseverbrauch und Laktatbildung wurde im Zellkulturüberstand von SiHa- und WiDr-Kulturen mit ca. 80 % Konfluenz in DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose nach 24 Stunden bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff untersucht. Der Glukoseverbrauch und die Laktatbildung sind zum besseren Vergleich in mmol/L für 1×10^6 Zellen angegeben.

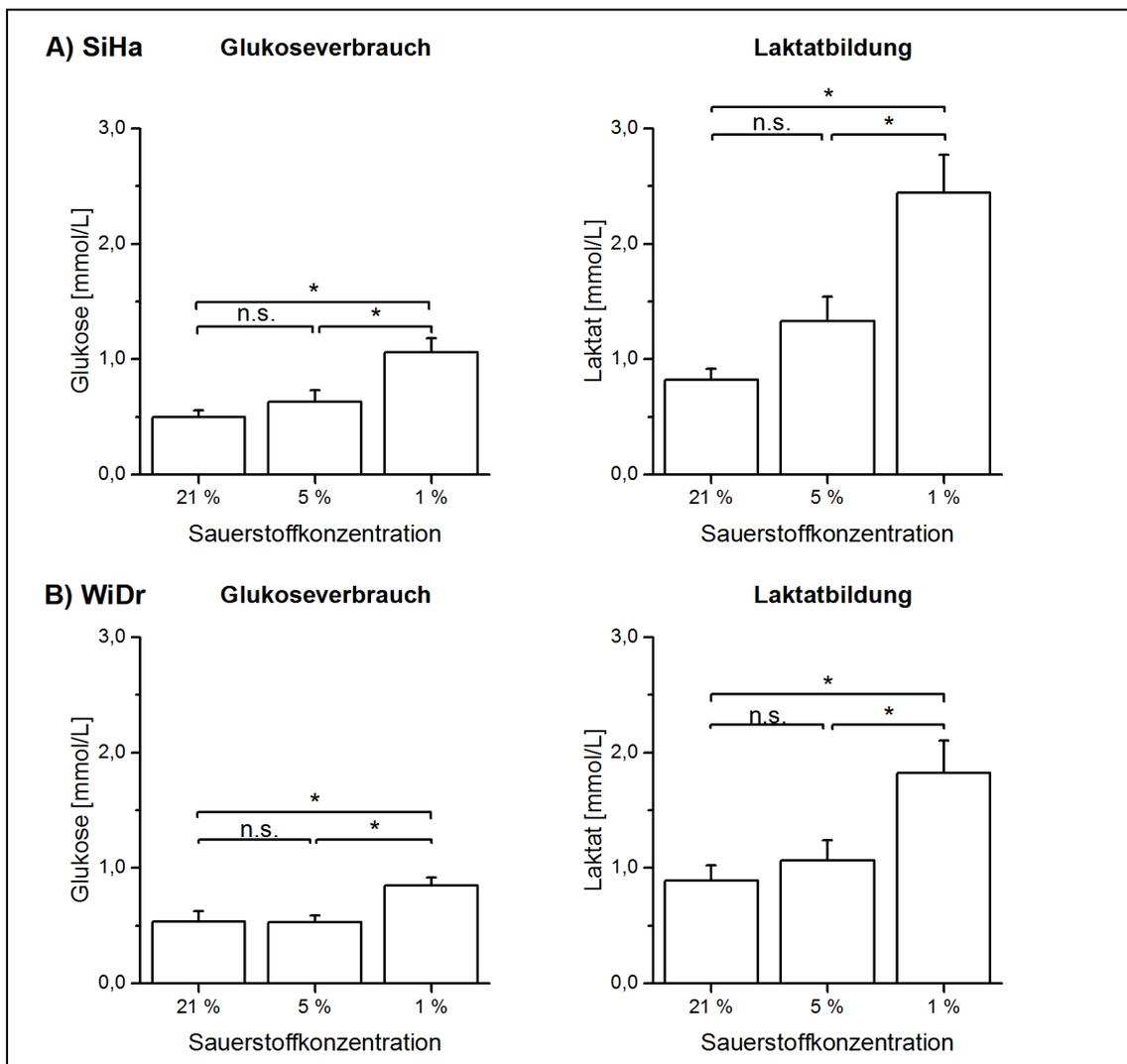


Abbildung 4.4: Änderungen der Konzentration von Glukose und Laktat im Zellkulturüberstand von SiHa (A) und WiDr (B). Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet. Dargestellt ist die Änderung der Glukose- und Laktatkonzentration im Medium innerhalb von 24 Stunden für 1×10^6 Zellen. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=9-11$ unabhängigen Einzelbestimmungen angegeben. Die Werte für 5 % Sauerstoff basieren auf 7 unabhängigen Einzelbestimmungen. Kruskal-Wallis-Test (Dunn's Multiple Comparison post-hoc Test). * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Bei 21 % Sauerstoff verbrauchte SiHa innerhalb von 24 Stunden $0,5 \pm 0,05$ mmol/L Glukose. Bei 1 % Sauerstoff stieg der Glukoseverbrauch signifikant auf $1,1 \pm 0,12$ mmol/L an. Entsprechend zum Glukoseverbrauch stieg die Konzentration an Laktat von $0,8 \pm 0,10$ mmol/L bei 21 % Sauerstoff auf $2,4 \pm 0,33$ mmol/L bei 1 % Sauerstoff an. WiDr wies bei 21 % Sauerstoff einen Glukoseverbrauch von $0,5 \pm 0,09$ mmol/L und eine Laktatproduktion von $0,9 \pm 0,14$ mmol/L auf. Bei 1 % Sauerstoff wurden $0,9 \pm 0,07$ mmol/L Glukose verbraucht und $1,8 \pm 0,28$ mmol/L Laktat gebildet.

Mit Hilfe der stöchiometrischen Beziehung zwischen Glukoseverbrauch und Laktatbildung (1 mol Glukose \rightarrow 2 mol Laktat) wurden die erhobenen Daten auf eine mögliche Korrelation zwischen Sauerstoffkonzentration und der Stärke des Glukoseverbrauchs bzw. der Milchsäurebildung untersucht (Tab. 4.1). Tatsächlich nahm bei SiHa der Glukoseverbrauch um 46 % bei 5 % Sauerstoff und um 74 % bei 1 % Sauerstoff zu. Das Verhältnis von Laktatbildung zu Glukoseverbrauch änderte sich von 1,3 bei 21 % Sauerstoff, über 1,7 bei 5 % Sauerstoff auf 2,4 bei 1 % Sauerstoff.

Auch bei WiDr waren ähnliche Tendenzen in geringerer Ausprägung zu erkennen. Der Glukoseverbrauch stieg um 12,4 % bei 5 % Sauerstoff und um 35 % bei 1 % Sauerstoff. Das Verhältnis von Laktatbildung zu Glukoseverbrauch änderte sich von 1,8 bei 21 % und 5 % Sauerstoff auf 2,4 bei 1 % Sauerstoff (Tab. 4.1).

Im Vergleich zu SiHa verbrauchte WiDr bei 21 % Sauerstoff 97 % mehr Glukose und ca. 52 % mehr Glukose bei 5 % und 1 % Sauerstoff. Dementsprechend bildete WiDr im Vergleich zu SiHa bei 21 % Sauerstoff 166 % mehr Laktat bzw. 61 % Laktat bei 5 % Sauerstoff und 56 % Laktat bei 1 % Sauerstoff. Die Daten lassen somit den Schluss zu, dass sich der Stoffwechsel beider Zelllinien am stärksten unterscheidet, wenn die Sauerstoffversorgung maximal ist – in diesem Fall bei der unphysiologischen Sauerstoffkonzentration von 21 %.

Tabelle 4.1: Bestimmung des glykolytischen Index für SiHa und WiDr. Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von frischem DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von n=2 unabhängigen Versuchen. Der glykolytische Index gibt an, wie viel Prozent der Gesamtglukose die Zelle zur Bildung von Laktat nutzt. Die Werte in Spalte A und B wurden gemessen; die Werte in Spalte C und D sind berechnet. **Hinweis:** Da thermodynamisch relevante Größen wie Temperatur und Druck nicht konstant gehalten wurden, sind die Messdaten und die hierauf beruhenden Berechnungen als Tendenzen zu werten.

SiHa	A	B	C ¹⁾	D ²⁾	E ³⁾
Sauerstoff	Glukoseverbrauch	Laktatbildung	Glukose für Laktatbildung	Glukose in OXPHOS	Glykolytischer Index
[%]	[mmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]	[%]
21	5,0 \pm 1,30	6,6 \pm 0,35	3,3 \pm 0,18	1,7 \pm 1,47	68,8 \pm 21,5
5	7,2 \pm 1,06	12,5 \pm 0,96	6,2 \pm 0,46	1,0 \pm 0,60	86,4 \pm 6,3
1	8,7 \pm 3,30	20,4 \pm 0,49	10,2 \pm 0,25 ⁴⁾	100 ⁵⁾

WiDr	A	B	C ¹⁾	D ²⁾	E ³⁾
Sauerstoff	Glukoseverbrauch	Laktatbildung	Glukose für Laktatbildung	Glukose in OXPHOS	Glykolytischer Index
[%]	[mmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]	[mmol/L]	[%]
21	9,8 \pm 1,10	17,4 \pm 1,70	8,7 \pm 0,85	1,1 \pm 0,25	89,1 \pm 1,3
5	11,0 \pm 0,71	20,1 \pm 1,20	10,0 \pm 0,60	1,0 \pm 1,31	91,6 \pm 11,4
1	13,2 \pm 2,55	31,7 \pm 1,48	15,8 \pm 0,74 ⁴⁾	100 ⁵⁾

¹⁾ Anteil der Glukose, der zur Bildung von Laktat genutzt wird: $B / 2$; ²⁾ Anteil der Glukose, der für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) genutzt wird: $A - C$; ³⁾ Glykolytischer Index: $C * 100 / A$; ⁴⁾ Keine Angabe möglich, da bei dieser Sauerstoffkonzentration sämtliche Glukose zur Laktatbildung genutzt wird. ⁵⁾ Der Index hat bei diesen Sauerstoffbedingungen seinen Höchstwert von 100 Prozent erreicht.

Zum gleichen Resultat gelangt man bei der Betrachtung des glykolytischen Index, d.h. wieviel Prozent der vorhandenen Glukose die Zelle zur Bildung von Laktat nutzt (Tab. 4.1). Während bei 21 % Sauerstoff SiHa-Zellen von 10 Molekülen Glukose ca. 7 Moleküle für die Bildung von Laktat einsetzen, sind es bei WiDr ca. 9 von 10 Molekülen, was einer Zunahme von 29 % entspricht. Bei 5 % und 1 % Sauerstoff unterscheiden sich beide Zelllinien nicht in ihrem glykolytischen Index.

4.1.5 Messungen zur Zellatmung

Die Zellatmung von SiHa und WiDr in Form der Respirationsrate wurde mit Hilfe einer Clark-Elektrode für 5×10^6 und 1×10^7 Zellen bestimmt. SiHa und WiDr wiesen eine vergleichbare Zellatmung auf und die Verdoppelung der Zellzahl führte zu einer nahezu Verdoppelung der Respirationsrate (Abb. 4.5).

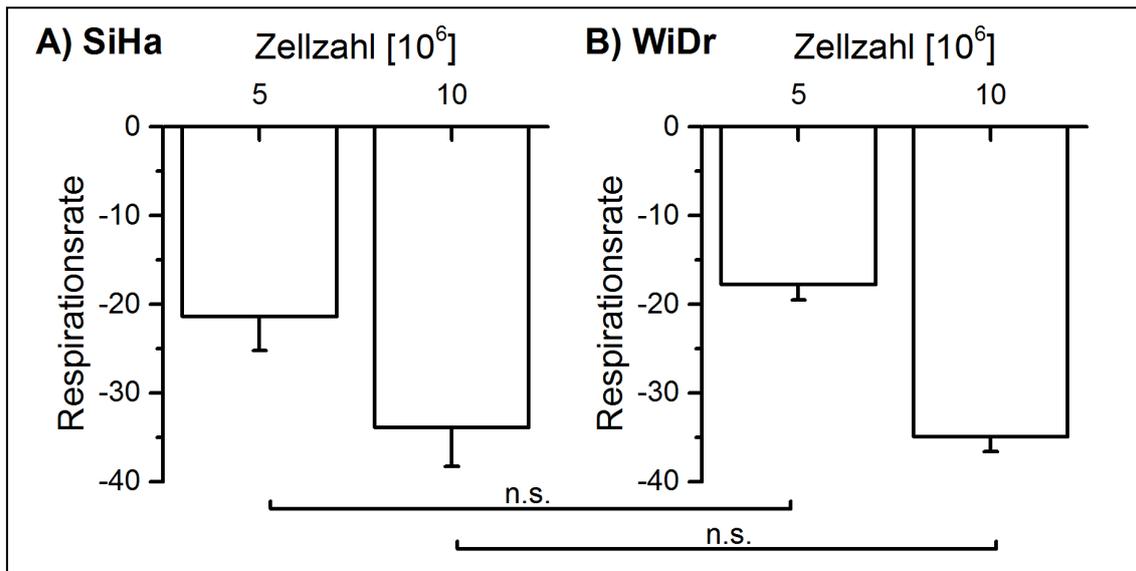


Abbildung 4.5: Die Zellatmung von SiHa (A) und WiDr (B). Die Zellatmung ist als Respirationsrate dargestellt. Für die Messungen wurden die Zellen in DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose resuspendiert und der Sauerstoffverbrauch über einen Zeitraum von 5 Minuten gemessen. Die Änderung der Sauerstoffkonzentration ist in nmol/L O_2 pro Minute als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=2$ unabhängigen Versuchen mit insgesamt 5-6 Messwerten für 5×10^6 Zellen und 3 Messwerten für 1×10^7 Zellen angegeben. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Der Vergleich der Daten aus diesem und dem vorherigen Kapitel zum Stoffwechsel von SiHa und WiDr lässt folgende Schlüsse zu: der Nachweis der Zellatmung (Respiration) bei beiden Zelllinien deutet darauf hin, dass beide ATP durch oxidative Phosphorylierung generieren und die Mitochondrien folglich keinen Defekt aufweisen (Kapitel 1.3). Die starke Laktatbildung bei beiden Zelllinien ist ein Hinweis darauf, dass Glykolyse und oxidative Phosphorylierung bei ausreichender Sauerstoffversorgung (hier 21 % Sauerstoff) parallel ablaufen, während bei verminderter Sauerstoffversorgung (5 % bzw. 1 % Sauerstoff) die bereits „umsatzstarke“ Glykolyse die Bildung von ATP durch Substratkettenphosphorylierung allein sicherstellt (Tab. 4.1).

4.1.6 Nachweis der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als zelltoxisches Nebenprodukt des oxidativen Stoffwechsels wurde mit dem DCFH-DA-Assay gemessen.

Für SiHa und WiDr wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei allen Sauerstoffkonzentrationen nachgewiesen. Das Ergebnis bestätigt, dass die Atmungskette auch noch bei 5 % und 1 % Sauerstoff aktiv sein muss und damit Elektronen transportiert, wenn auch nicht im korrekten stöchiometrischen Verhältnis, was die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies verursacht.¹²⁾

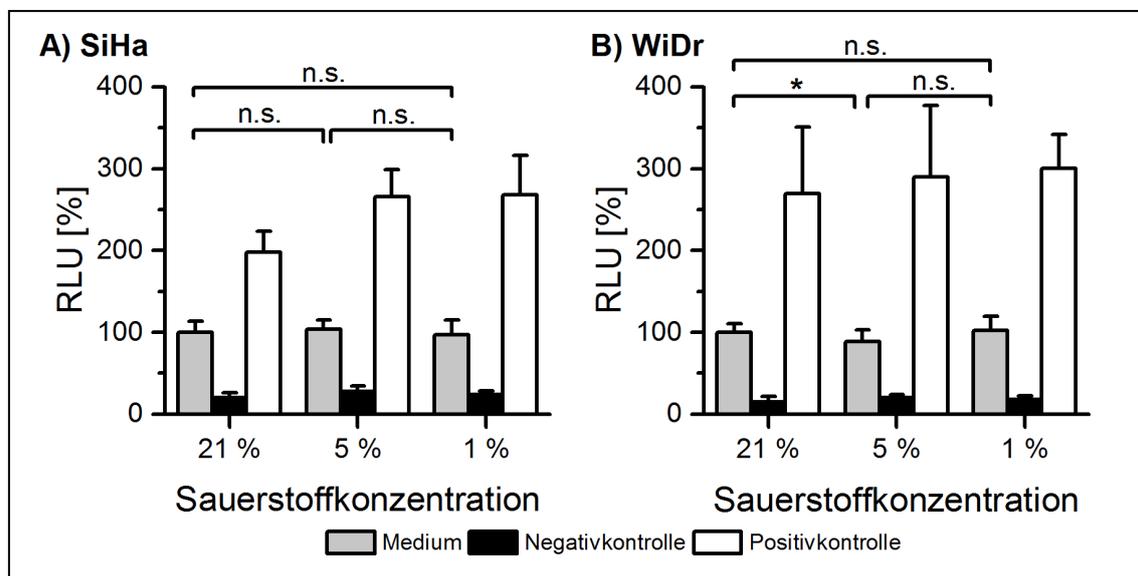


Abbildung 4.6: Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei SiHa (A) und WiDr (B). Dargestellt ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=2-3$ unabhängigen Versuchen mit 6 Parallelwerten. Als Medium wurde Phenolrot-freies DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose verwendet. Negativkontrolle war Glukose-freies PBS und Positivkontrolle war eine Wasserstoffperoxidlösung (H_2O_2) in einer Konzentration von 100 μ mol/L. Alle Werte wurden auf die Fluoreszenzwerte bei 21 % Sauerstoff bezogen und in Prozent angeben. RLU: relative fluorescence unit. Kruskal-Wallis-Test (Dunn's Multiple Comparison post-hoc Test). * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Hinweis: Die mögliche Beteiligung der membranständigen Nicotinamid-adenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase (NOX) an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurde nicht untersucht.

¹²⁾ Um molekularen Sauerstoff zu Wasser zu reduzieren, sind vier Elektronen notwendig: $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow H_2O$. Geschieht die Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff nicht in diesem stöchiometrischen Verhältnis, so entstehen reaktive Sauerstoffspezies an der Atmungskette. Bis zu 3 % Sauerstoff werden nicht vollständig zu Wasser reduziert und gelangen als Sauerstoffradikale in das Zytosol.

4.1.7 Nachweis der Expression von MCT und LDH

Die beiden Zelllinien SiHa und WiDr wurden auf die Expression von MCT1 und MCT4 sowie von LDH-A und LDH-B im Western Blot untersucht. SiHa wies dabei keine wesentlichen Unterschiede in der Stärke der Expression zwischen MCT1 und MCT4 sowie zwischen den beiden LDH-Isoformen auf (Abb. 4.7 und Abb. 10.5 im Anhang).

Auffällig bei WiDr war, dass die Zellen mehr LDH-B als LDH-A und mehr MCT1 als MCT4 exprimierten, auch wenn die Expression sämtlicher Moleküle in WiDr geringer war als in SiHa.

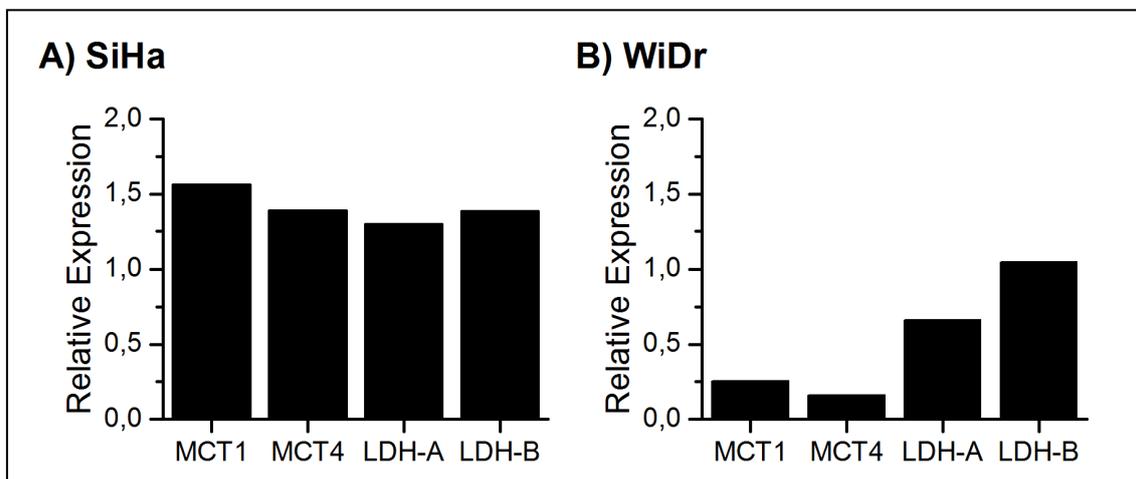


Abbildung 4.7: Nachweis der Expression von MCT1, MCT4, LDH-A und LDH-B im Western Blot. Die quantitative densitometrische Analyse der Proteine wurde auf β -Aktin normalisiert und mit dem Programm "ImageJ 1.41" (Wayne Rasband, National Insitution of Health, USA) durchgeführt.

Zusammenfassung von Kapitel 4.1: SiHa und WiDr weisen einen vergleichbaren glykolytischen Stoffwechsel bei 5 % und 1 % Sauerstoff auf – also bei Sauerstoffkonzentrationen, die *in vivo* auch in soliden Tumoren nachzuweisen sind. Für beide Zelllinien wurde zudem die Expression von MCT und LDH erfolgreich nachgewiesen.

4.2 Effekte der CHC-vermittelten Hemmung von Monocarboxylat-Transporter (MCT)

4.2.1 Bestimmung der EC₅₀-Werte

Der EC₅₀-Wert von CHC für SiHa und WiDr wurde in Verdünnungsreihen von 1, 3, 5, 10 und 30 mmol/L mit dem Kristallviolettassay nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bestimmt.

Tabelle 4.2: Die EC₅₀-Werte von CHC für SiHa und WiDr. Die EC₅₀-Werte wurden im Kristallviolettassay nach 24 Stunden Inkubation mit einer Verdünnungsreihe von CHC in DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose bestimmt. Hierzu wurden vor Versuchsbeginn 10⁴ Zellen pro Vertiefung einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht inkubiert. Die EC₅₀-Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung von n=3 unabhängigen Versuchen mit jeweils 6 Parallelwerten.

Zelllinie	SiHa	WiDr
EC50 [mmol/L]	12,5 ± 0,77	11,9 ± 2,24

Für beide Zelllinien ist der EC₅₀-Wert von CHC nahezu identisch (Abweichung ca. 5 %), was darauf hindeutet, dass SiHa und WiDr ähnlich empfindlich auf CHC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden reagieren. Für die Versuche wurde mit 8 mmol/L CHC eine Inhibitor-Konzentration gewählt, die ca. 1/3 unter den gemessenen EC₅₀-Werten für beide Zelllinien liegt.

4.2.2 Einfluss der Hemmung von MCT auf die Zellvitalität

Die Wirkung von 8 mmol/L CHC auf die Zellvitalität wurde an konfluenten Kulturen von SiHa und WiDr untersucht. Bei SiHa führte die MCT-Hemmung bei 21 % Sauerstoff zu einer Zytostase über den gesamten Untersuchungszeitraum. Nach 96 Stunden waren zelltoxische Effekte nachweisbar und die Anzahl vitaler Zellen verringerte sich dabei auf 81 % (berechnet auf Zellzahl bei Konfluenz). Bei 5 % Sauerstoff war ebenfalls eine Zytostase für die ersten 72 Stunden mit anschließender Abnahme der vitalen Zellen auf 66 % zu beobachten. Bei 1 % Sauerstoff wirkte CHC bei SiHa zelltoxisch und verringerte die Anzahl vitaler Zellen auf 37 %. Für WiDr waren 8 mmol/L CHC bei allen 3 Sauerstoffbedingungen zytotoxisch.

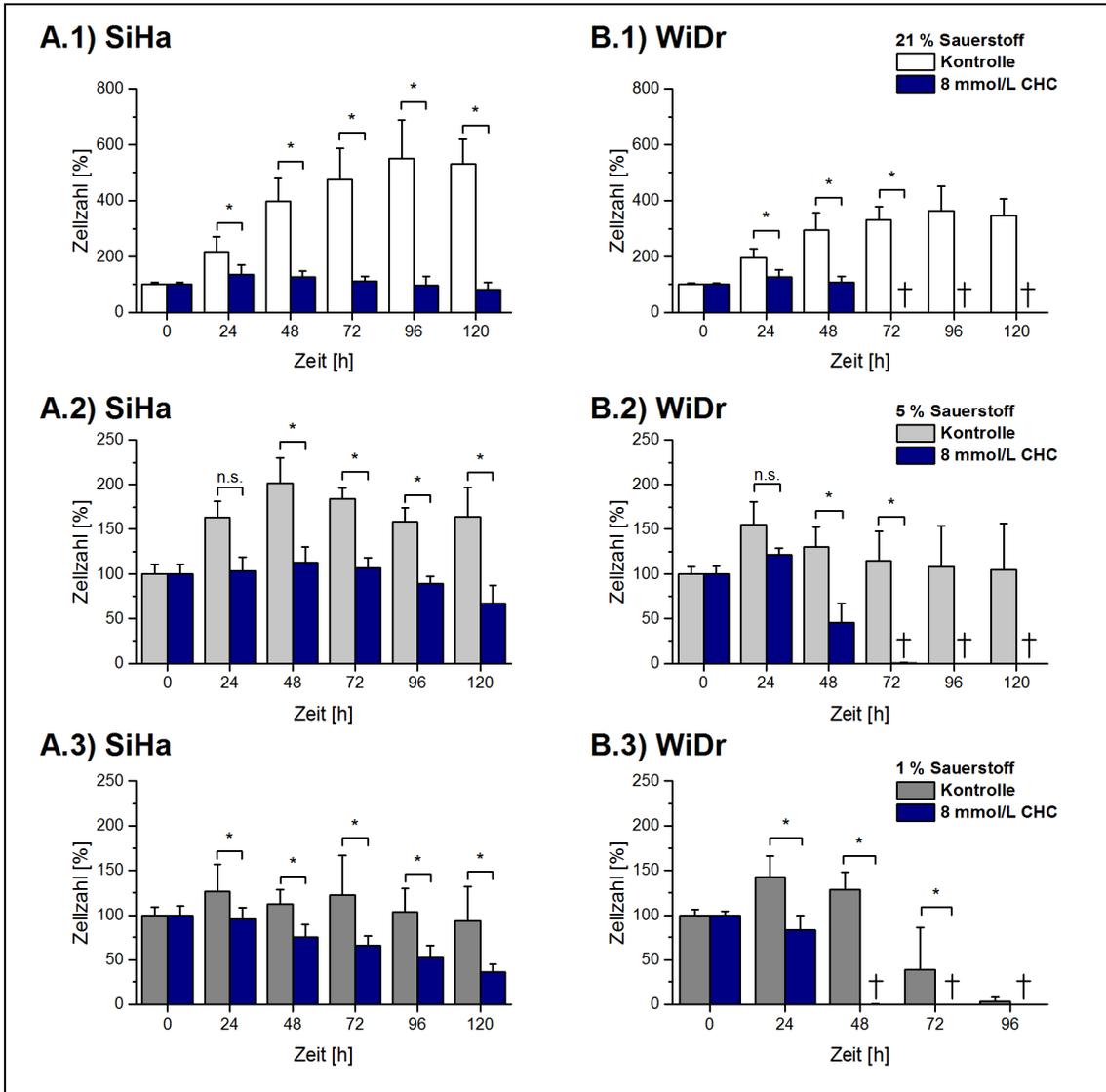


Abbildung 4.8: Die durch CHC vermittelte Hemmung von MCT beeinflusst die Zellvitalität von SiHa (A) und WiDr (B) bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff. Dargestellt sind die prozentualen Änderungen der Zellzahlen zur Ausgangszellzahl als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=2-3$ unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 Parallelwerten. Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet. Je nach Versuchsgruppe wurde das Medium mit 8 mmol/L CHC versetzt. Parallel hierzu wurden Wachstumsversuche in DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose ohne Inhibitor durchgeführt (Kontrolle). Die Zellzahl wurde mit Trypanblau bestimmt. Das Kreuz markiert vollständig abgestorbene Zellkulturen. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

4.2.3 Einfluss der Hemmung von MCT auf den pH-Wert

Die Hemmung der Monocarboxylat-Transporter (MCT) durch CHC sollte zu einem verminderten Export von Laktat und somit zu einer geringeren Änderung im pH-Wert der Kulturüberstände führen als bei Kulturen ohne CHC. Da die Laktatbildung bei einer geringeren Oxygenierung stärker ist (Tab. 4.1), waren bei 5 % und 1 % Sauerstoff größere Unterschiede im pH-Wert zu erwarten.

Diese Annahme schien sich für SiHa zu bestätigen. Bei 21 % Sauerstoff wurde der pH-Wert durch CHC über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht beeinflusst. Ein signifikanter, aber biologisch wohl nicht relevanter Unterschied im pH-Wert wurde nach 96 Stunden beobachtet (Abb. 4.9). Dagegen war ein Unterschied im pH-Wert von Kulturen mit und ohne CHC bei 1 % Sauerstoff nachweisbar. Nach 96 Stunden betrug die Änderung im pH-Wert $7,1 \pm 0,04$ für die Kulturen mit CHC gegenüber $6,6 \pm 0,09$ für die Kontrollen.

Für WiDr dagegen ließ sich die oben formulierte Annahme nicht bestätigen. Im Gegenteil: Kulturen mit CHC wiesen teilweise niedrigere pH-Werte auf als Kulturen ohne CHC und bei 1 % Sauerstoff waren keine Unterschiede zwischen Kulturen mit und ohne CHC zu messen gewesen.

Dieses unerwartete Ergebnis – zumal nach den Daten aus Tab. 4.1 beide Zelllinien sich bei 5 % und 1 % Sauerstoff bei Verbrauch von Glukose und Bildung von Laktat nicht wesentlich unterscheiden – beruht möglicherweise darauf, dass WiDr sehr viel empfindlicher auf die Inkubation mit CHC reagierte als SiHa (Abb. 4.8). Vermutlich führte der ungewöhnlich hohe Anteil an toten Zellen zu einer starken Freisetzung an Laktat, wodurch der pH-Wert im Kulturüberstand beeinflusst wurde.

Für weiterführende Versuche sollte die EC_{50} -Bestimmung für CHC den Inkubationszeiten angepasst werden. Eine Inkubationszeit von 24 Stunden (Tab. 4.2) scheint nicht immer aussagekräftig genug zu sein.

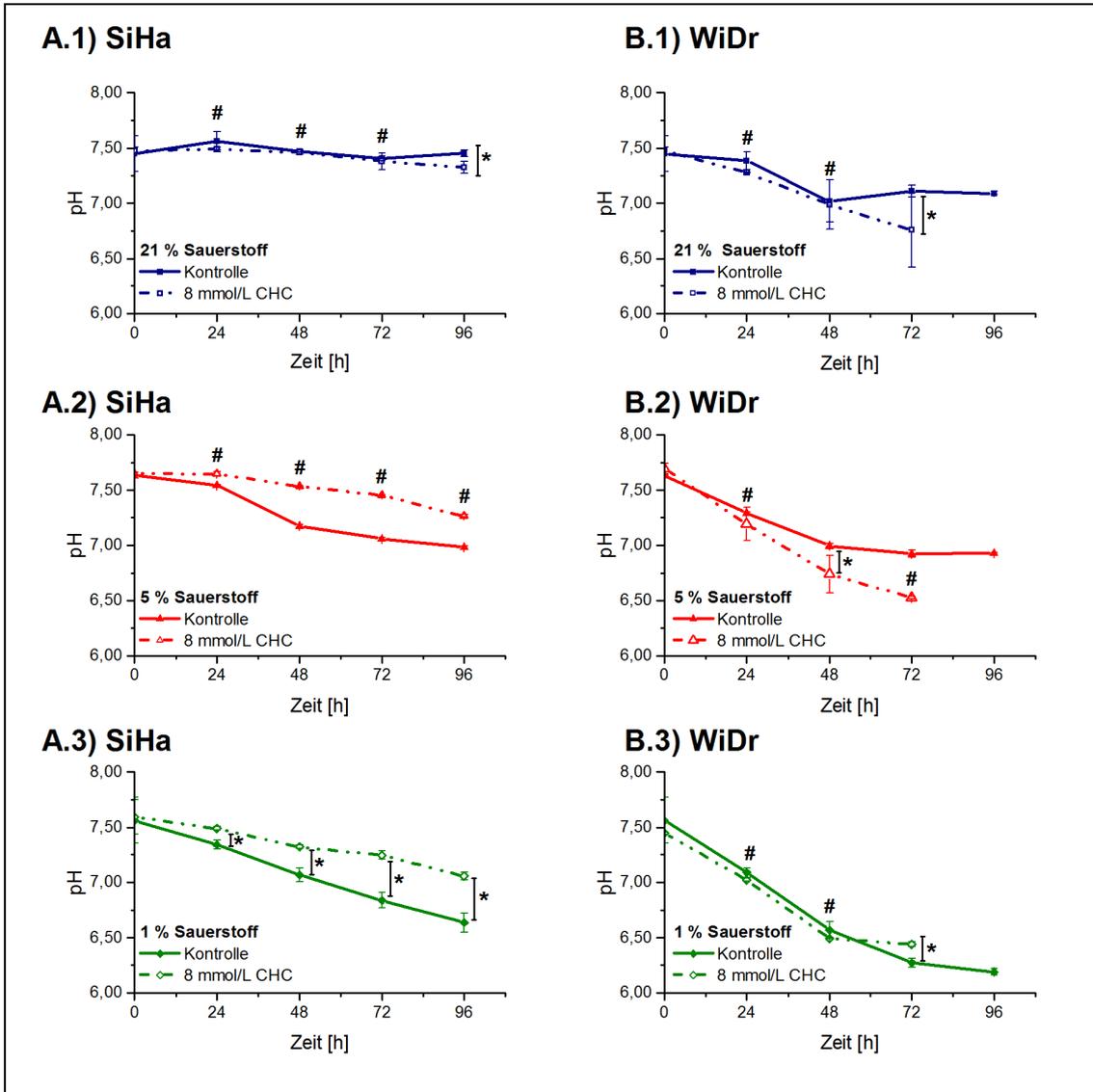


Abbildung 4.9: Die durch CHC vermittelte Hemmung von MCT beeinflusst den pH-Wert in Zellkulturüberständen von SiHa und WiDr bei 21 % (A.1), 5 % (A.2) und 1% (A.3) Sauerstoff. Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet. Je nach Versuchsgruppe wurde das Medium mit 8 mmol/L CHC versetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=2 unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Messungen. Die Werte für 5 % Sauerstoff basieren auf einem Experiment mit jeweils drei Messungen. Die Messungen wurden nach Absterben der Zellen beendet. Manche Standardabweichungen sind kleiner als die Datenpunkte. Mann-Whitney-U-Test. * p < 0,05, # = nicht signifikant.

4.2.4 Einfluss der Hemmung von MCT auf den Stoffwechsel

Im vorherigen Kapitel wurde untersucht, inwieweit die Inkubation mit CHC das Absinken des pH-Wertes verhindert, da dies als Hinweis auf einen verminderten Export von Laktat gewertet werden kann. Für dieses Kapitel wurde der Anteil an Glukose und Laktat im Zellkulturüberstand bestimmt. Diese Vorgehensweise erlaubt den Einfluss von CHC auf den Verbrauch von Glukose und den Export von Laktat zu untersuchen. Die Inkubation von SiHa und WiDr mit CHC sollte zu einer verminderten Freisetzung von Laktat führen. Bei 5 % und 1 % Sauerstoff sollte sich die Wirkung von CHC zudem stärker bemerkbar machen als bei 21 % Sauerstoff.

Die Zugabe von 8 mmol/L CHC verringerte die Freisetzung von Laktat durch SiHa bei 1 % Sauerstoff signifikant um ca. 30 % (Abb. 4.10). Dies ging gleichzeitig mit einem signifikant verringerten Glukoseverbrauch einher. Der verringerte Anteil an Laktat im Zellkulturüberstand bestätigt sehr gut die Ergebnisse zum pH-Wert (Abb. 4.9). Bei 21 % Sauerstoff war keine biologisch relevante Wirkung von CHC auf die Freisetzung von Laktat zu messen gewesen, auch wenn der Unterschied statisch signifikant ist (Abb. 4.10).

Dagegen wurde für WiDr keine verminderte Freisetzung von Laktat nachgewiesen (Abb. 4.10), wie die Messungen zum pH-Wert erwarten ließen (Abb. 4.9). Interessanterweise wurden für WiDr bei 21 % Sauerstoff signifikant erhöhte Laktatkonzentrationen im Zellkulturüberstand gemessen; dies steht im Einklang mit dem stärkeren Abfall des pH-Wertes (Abb. 4.9). Die Ursache hierfür ist zurzeit noch unklar; insbesondere, ob eine fehlende Wirksamkeit von CHC auf den Laktatexport hierfür verantwortlich ist.

Die Inkubation mit dem MCT-Inhibitor CHC löste zwar zahlreiche biologische Effekte bei SiHa und WiDr aus (Abb. 4.8-4.10), die aber nicht in jedem Fall mit den primären Annahmen dieser Arbeit zu erklären sind, nämlich dass CHC den Export von Laktat hemmt und dass die hierdurch ansteigenden intrazellulären Laktatspiegel die Glykolyse hemmen. Dadurch, dass die gewählte Konzentration

on an CHC unter dem EC₅₀-Wert liegt (Tab. 4.2), sollten unspezifische toxische Effekte von CHC auf SiHa und WiDr ausgeschlossen sein. Dies lässt vermuten, dass CHC möglicherweise noch bisher unbekannte Effekte in der Zelle auslöst. Das Konzept, intrazelluläre Effekte durch Hemmung des Laktatexports auszulösen, wird durch die Ergebnisse für die Zelllinie SiHa sehr gut bestätigt (nicht aber durch die Ergebnisse für WiDr). Inwieweit es sich bei dem Konzept möglicherweise doch um kein allgemeingültiges Phänomen handelt, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unzureichend verstanden.

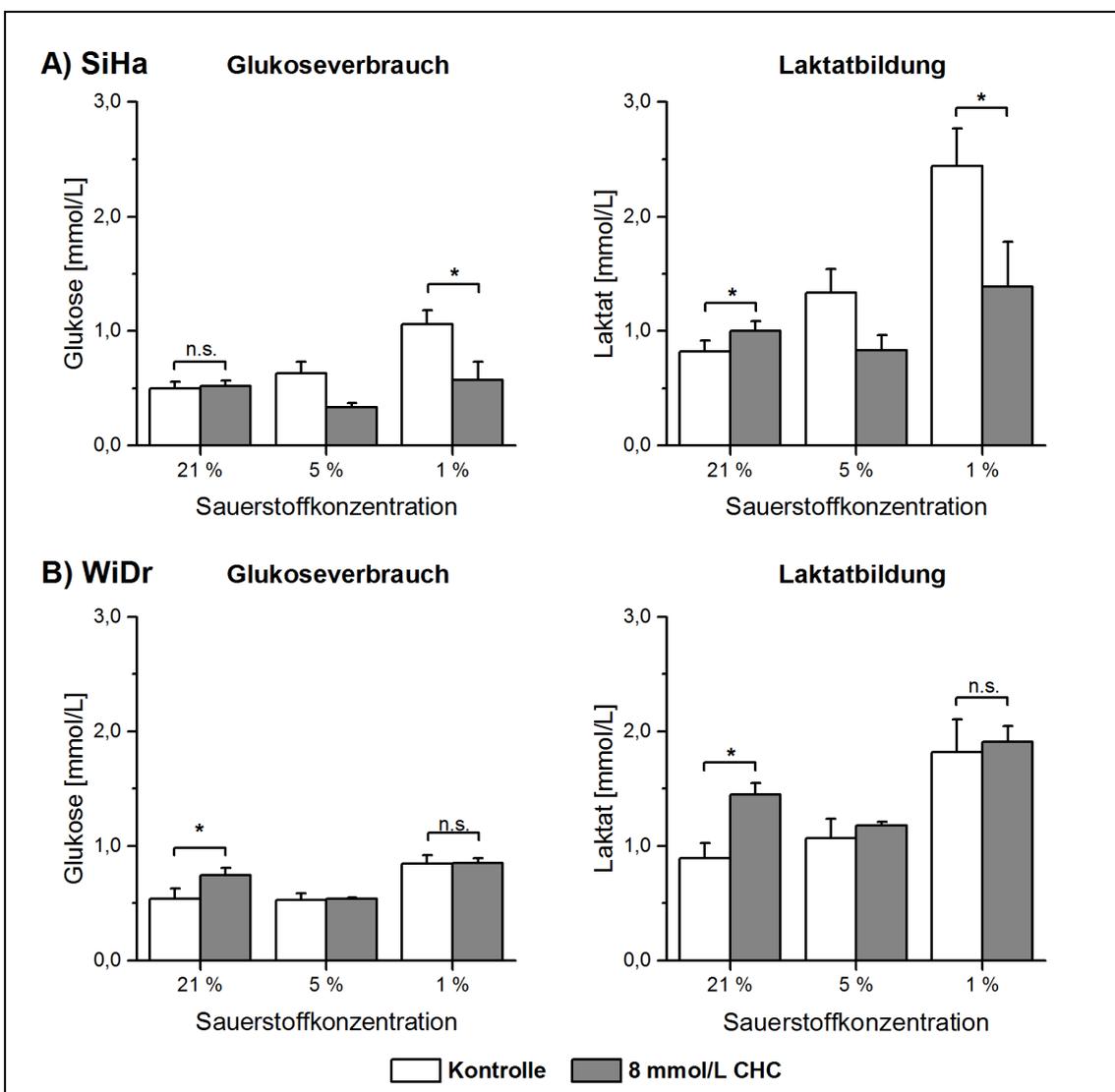


Abbildung 4.10: Die durch CHC vermittelte Hemmung von MCT führt zu Änderungen bei der Konzentration von Glukose und Laktat im Zellkulturüberstand von SiHa (A) und WiDr (B). Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet. Je nach Versuchsgruppe wurde das Medium mit 8 mmol/L CHC versetzt. Die Änderungen in der Konzentration von Glukose und

Laktat in den Zellkulturüberständen sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=4 unabhängigen Versuchsserien. Die Werte für 5 % Sauerstoff basieren auf n=2 unabhängigen Versuchsserien. Die Werte sind auf 1×10^6 Zellen umgerechnet, die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden. Aufgrund des geringen Probenumfangs wurde auf eine statistische Auswertung bei 5 % Sauerstoff verzichtet. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

4.2.5 Einfluss der Hemmung von MCT auf den oxidativen Stress

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch 8 mmol/L CHC wurde mit dem DCFH-DA-Assay bestimmt. Das Konzept hierzu basiert auf der Erkenntnis, dass SiHa und WiDr respiratorische Aktivität aufweisen (Abb. 4.5), was bedeutet, dass beide Zelllinien wohl doch über aktive Mitochondrien verfügen. Wie in der Einleitung dargelegt, impliziert der Warburg-Effekt nicht, dass Tumorzellen ausschließlich Glykolyse betreiben, sondern dass in Abhängigkeit von der Sauerstoffversorgung Glykolyse und OXPHOS in einem bestimmten Verhältnis zueinander stehen, das stark vom dem in benignen Zellen abweicht.

In diesem Kapitel wird die Frage untersucht, ob eine Hemmung des Laktatexports und eine damit verbundene Verminderung der Glykolyse Auswirkungen auf die Atmungskette und möglicherweise auf die Induktion von oxidativem Stress hat.

Die CHC-vermittelte Hemmung der Monocarboxylat-Transporter (MCT) induzierte bei den drei Sauerstoffkonzentrationen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in SiHa und WiDr (Abb. 4.11). Diese war im Vergleich zur Mediumkontrolle um den Faktor 4 bis 5 erhöht. Die gemessene Fluoreszenz überstieg sogar den durch Wasserstoffperoxid ausgelösten oxidativen Stress als Positivkontrolle.

Die Daten belegen, dass CHC einen massiven oxidativen Stress auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff auslöst – vermutlich die Konsequenz einer intrazellulären Ansäuerung durch Laktat.

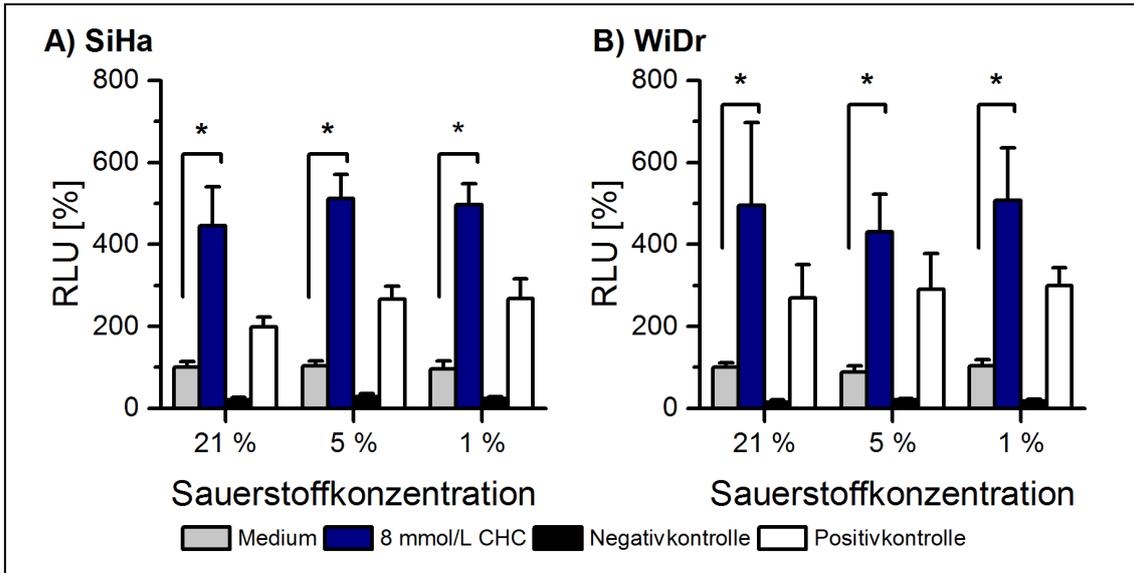


Abbildung 4.11: Nachweis von oxidativem Stress bei SiHa (A) und WiDr (B). Die CHC-vermittelte Hemmung von MCT induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dargestellt ist die prozentuale Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=2-3$ unabhängigen Versuchen mit 6 Parallelwerten. Die Messungen wurden in Phenolrot-freiem DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose und 8 mmol/L CHC durchgeführt. Negativkontrolle war Glukose-freies PBS und Positivkontrolle war eine Wasserstoffperoxidlösung (H_2O_2) in einer Konzentration von 100 μ mol/L. Alle Werte wurden auf die Fluoreszenzwerte bei 21 % Sauerstoff bezogen und in Prozent angeben. RLU: relative fluorescence unit. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Zusammenfassung von Kapitel 4.2: Die CHC-vermittelte Inhibition der Monocarboxylat-Transporter (MCT) 1 und 4 löste folgende biologische Effekte aus: (1) Beeinflussung der Zellvitalität von SiHa und WiDr (Abb. 4.8); (2) Beeinflussung des Laktatexports (wurde nur bei SiHa beobachtet): hierzu gehört auch, dass der pH-Wert der Zellkulturüberstände weniger stark absank, da die Zellen weniger Laktat in das Zellkulturmedium ausschleusten (Abb. 4.9 und 4.10); (3) Induktion von oxidativem Stress durch die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (bei SiHa und WiDr).

4.3 Effekte der Natriumoxamat-vermittelten Hemmung der Laktatdehydrogenase

4.3.1 Bestimmung der EC₅₀-Werte

Wie für den Inhibitor CHC (Tab. 4.2) wurden auch für Natriumoxamat die EC₅₀-Werte für SiHa und WiDr bestimmt. Die hierfür verwendete Verdünnungsreihe wurde mit folgenden Konzentrationen an Natriumoxamat hergestellt: 5, 10, 20, 40, 80 und 160 mol/L. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde der Anteil vitaler Zellen mit dem Kristallviolettassay bestimmt. Der EC₅₀-Wert von Natriumoxamat lag für beide Zelllinien bei über 160 mmol/L innerhalb von 24 Stunden. Für die nachfolgenden Versuche wurde mit 80 mmol/L Natriumoxamat eine Konzentration gewählt, die deutlich unterhalb der bestimmten EC₅₀-Werte lag.

4.3.2 Einfluss der Hemmung von LDH auf die Zellvitalität

Die aus der Hemmung der Laktatdehydrogenase mit 80 mmol/L Natriumoxamat resultierenden Effekte auf die Zellvitalität von SiHa und WiDr wurden an konfluenten Kulturen untersucht.

Die Hemmung der Laktatdehydrogenase durch Natriumoxamat inhibierte effektiv das Zellwachstum von SiHa bei 21 % Sauerstoff (Abb. 4.12). Nach einer initialen Zytostase in den ersten 48 Stunden verdoppelte sich die Zellzahl bis zum Versuchsende. Die Wachstumsverminderung war bei 5 % Sauerstoff im Vergleich zur Normoxie deutlich stärker, so dass es während der Dauer des Versuchs zur keiner Verdoppelung der Zellzahl kam. Bei 1 % Sauerstoff kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der Zellvitalität auf 36 % des Ausgangswertes.

Das Zellwachstum von WiDr war bei 21 % Sauerstoff in Gegenwart von Natriumoxamat ebenfalls niedriger als in der Wachstumskontrolle. Bei 5 % Sauerstoff waren zytostatische Effekte zu beobachten. Wie bei SiHa kam es in Hypoxie bei 1 % Sauerstoff zu zytotoxischen Effekten; die Anzahl vitaler Zellen verringerte sich bis auf 11 % der Ausgangszellzahl.

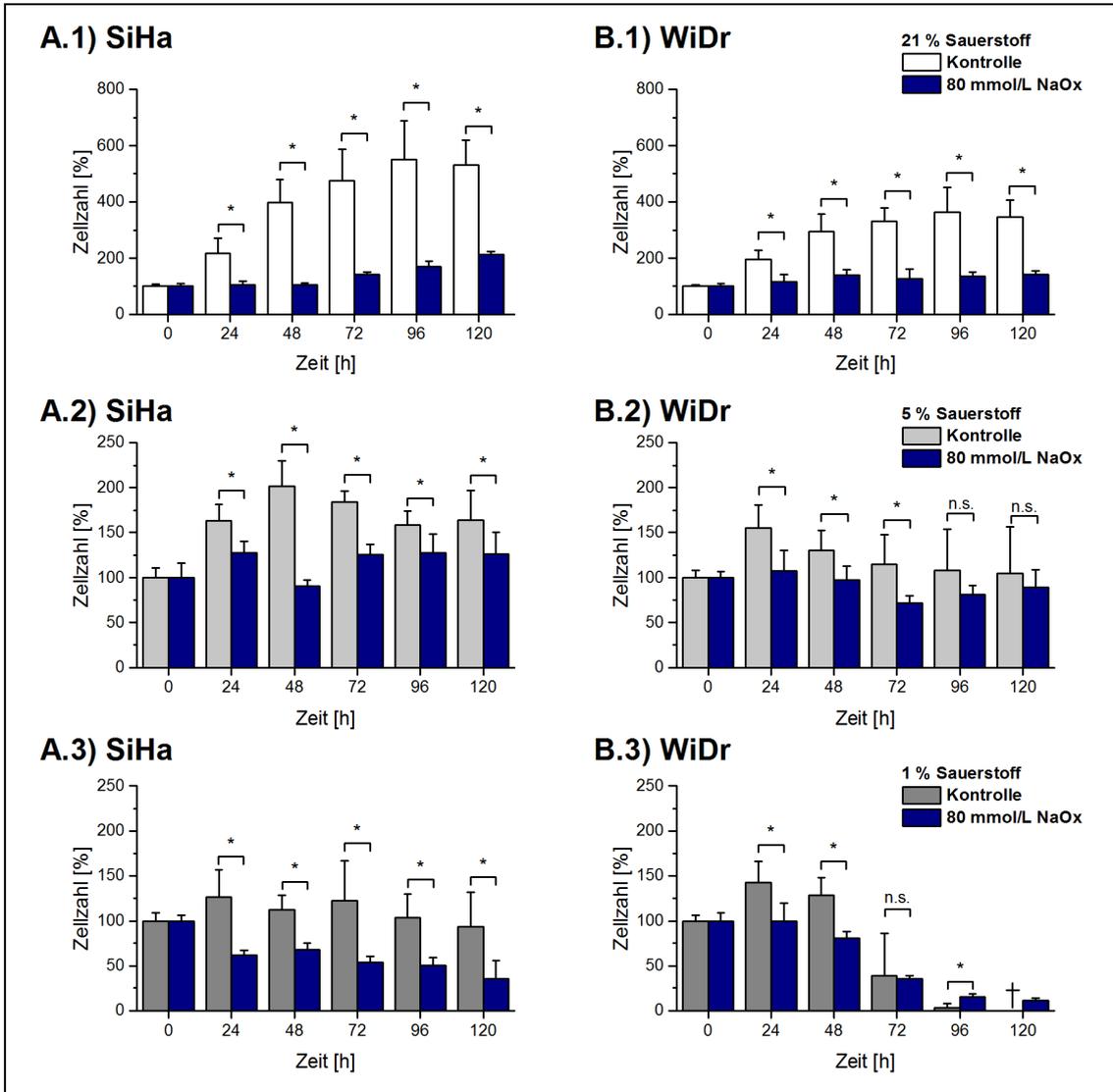


Abbildung 4.12: Die durch Natriumoxamat vermittelte Hemmung der Laktatdehydrogenase beeinflusst die Zellvitalität von SiHa (A) und WiDr (B) bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff. Dargestellt sind die prozentualen Änderungen der Zellzahlen zur Ausgangszellzahl bei Konfluenz als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=1-2$ unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 Parallelwerten. Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet. Je nach Versuchsgruppe wurde das Medium mit 80 mmol/L Natriumoxamat (NaOx) versetzt. Parallel hierzu wurden Wachstumsversuche in DMEM-Medium (25 mmol/L Glukose) ohne Inhibitor durchgeführt (Kontrolle). Die Zellzahl wurde mit Trypanblau bestimmt. Das Kreuz markiert vollständig abgestorbene Zellkulturen. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

4.3.3 Einfluss der Hemmung der LDH auf den pH-Wert

Das Konzept zur Hemmung der Laktatdehydrogenase basiert auf der Vorstellung, dass sich hierdurch die Bildung von Laktat verringert. Da weniger Laktat in den Zellen gebildet wird, verringert sich der Export von Laktat und als Folge davon säuert sich das Zellkulturmedium weniger stark an.

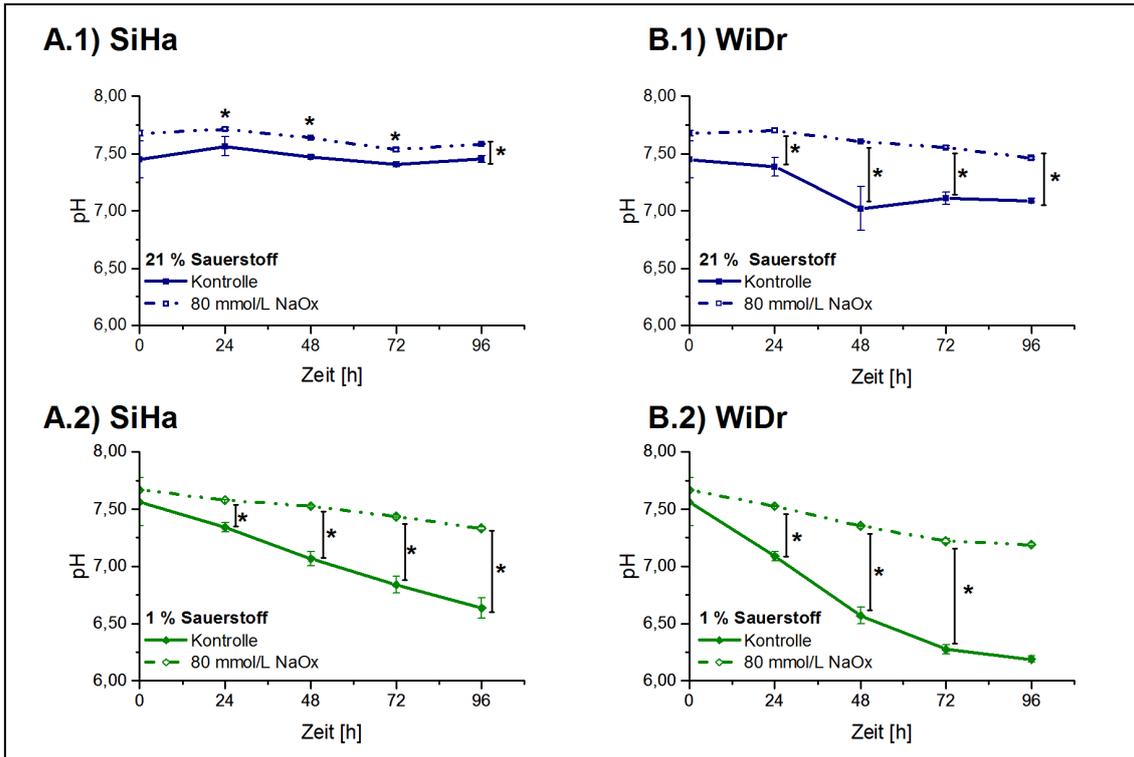


Abbildung 4.13: Die durch Natriumoxamat vermittelte Hemmung der Laktatdehydrogenase beeinflusst den pH-Wert in Zellkulturüberständen von SiHa und WiDr bei 21% (A) und 1% (B) Sauerstoff. Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet. Je nach Versuchsgruppe wurde das Medium mit 80 mmol/L Natriumoxamat (NaOx) versetzt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von einem Versuchen mit jeweils drei Messungen; 5 % Sauerstoff wurde nicht untersucht. Die Messungen wurden nach Absterben der Zellen beendet. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, # = nicht signifikant. WiDr-Kulturen ohne NaOx wiesen nach 96 Stunden bei 1 % Sauerstoff keine vitalen Zellen mehr auf und wurden deswegen nicht statistisch ausgewertet.

Wie erwartet, verringerte die Inkubation mit Natriumoxamat signifikant das Absinken des pH-Wertes im Zellkulturüberstand von SiHa und WiDr. Die Ansäuerung des Mediums war bei 1 % Sauerstoff stärker als bei 21 % Sauerstoff (Abb. 4.13), da erwartungsgemäß die Bildung von Laktat bei geringer Oxygenierung stärker ist als bei ausreichender Oxygenierung.

4.3.4 Einfluss der Hemmung der LDH auf den Stoffwechsel

Die durch Natriumoxamat vermittelte Hemmung der Laktatdehydrogenase (LDH) führte zu einer Verringerung der Laktatkonzentration im Zellkulturüberstand; gleichzeitig nahm die Glukosekonzentration weniger stark ab. Die Beeinflussung der Glukose- und Laktatkonzentration im Überstand durch Natriumo-

xamat bei beiden Zelllinien und den drei Sauerstoffkonzentrationen ist dahingehend zu interpretieren, dass die Zellen daran gehindert werden Laktat zu bilden, wodurch weniger oxidierte Reduktionsäquivalente zur Verfügung stehen. Dies führt zu einer Hemmung der Glykolyse und damit zu einer Abnahme des Glukoseverbrauchs. Somit erscheint Natriumoxamat als ein potenter Inhibitor der Laktatbildung in Tumorzellen.

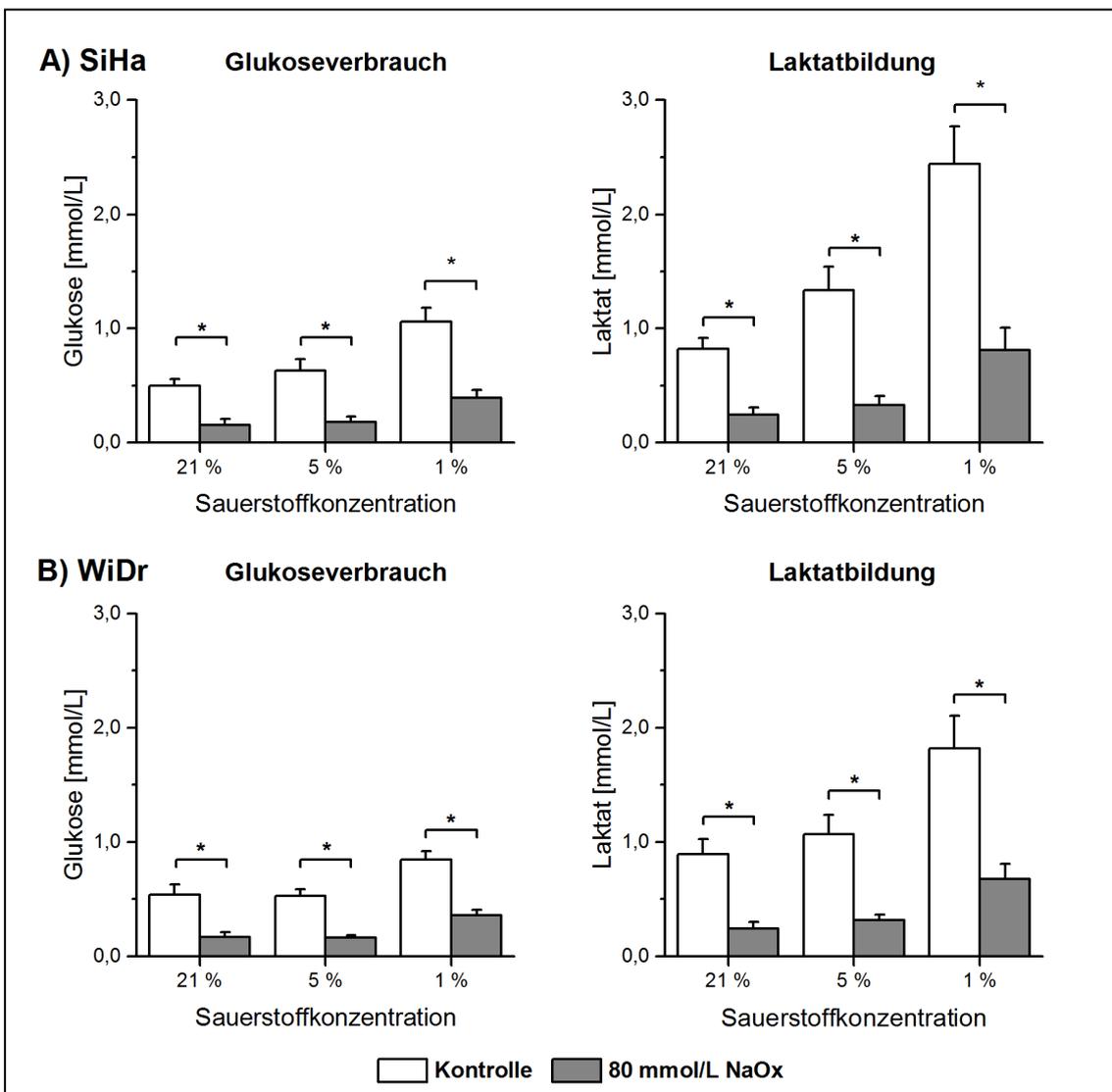


Abbildung 4.14: Die durch Natriumoxamat (NaOx) vermittelte Hemmung der LDH führt zu Änderungen bei der Konzentration von Glukose und Laktat in Zellkulturüberständen von SiHa (A) und WiDr (B). Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet. Je nach Versuchsgruppe wurde das Medium mit 80 mmol/L Natriumoxamat (NaOx) versetzt. Die Änderungen in der Konzentration von Glukose und Laktat in den Zellkulturüberständen sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=4 unabhängigen Versuchsserien. Die Werte

sind auf 1×10^6 Zellen umgerechnet, die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

4.3.5 Einfluss der Hemmung der LDH auf den oxidativen Stress

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Hemmung der Laktatdehydrogenase mit 80 mmol/L Natriumoxamat wurde mit dem DCFH-DA-Assay bestimmt. Natriumoxamat induzierte sowohl bei SiHa als auch bei WiDr signifikant oxidativen Stress (Abb.4.14), der auch für Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % nachweisbar war.

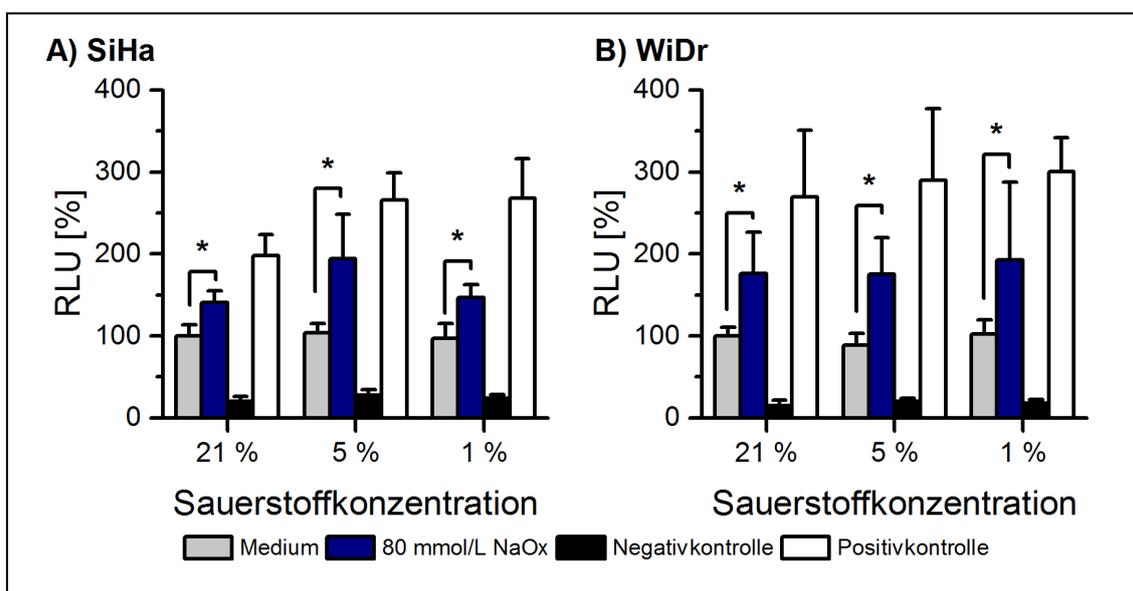


Abbildung 4.15: Nachweis von oxidativem Stress bei SiHa (A) und WiDr (B). Die durch Natriumoxamat vermittelte Hemmung der Laktatdehydrogenase induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dargestellt ist die prozentuale Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=2-3$ unabhängigen Versuchen mit 6 Parallelwerten. Die Messungen wurden in Phenolrot-freiem DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose und 80 mmol/L Natriumoxamat (NaOx) durchgeführt. Negativkontrolle war Glukose-freies PBS und Positivkontrolle war eine Wasserstoffperoxidlösung (H_2O_2) in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$. Alle Werte wurden auf die Fluoreszenzwerte bei 21 % Sauerstoff bezogen und in Prozent angegeben. RLU: relative fluorescence unit. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

Zusammenfassung von Kapitel 4.3: Die durch Natriumoxamat vermittelte Hemmung der Laktatdehydrogenase löste folgende biologische Effekte bei Zellen von SiHa und WiDr aus: (1) Beeinflussung der Zellvitalität (Abb. 4.12); (2) geringerer Abfall des pH-Werts der Zellkulturüberstände, da weniger Laktat gebildet wurde und somit auch weniger Laktat durch die Zellen in den Überstand

ausgeschleust wurde (Abb. 4.13); verminderter Glukoseverbrauch (Abb. 4.14); (3) Induktion von oxidativem Stress durch vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (Abb. 4.15).

4.4 Zur Wirksamkeit der Kombination aus Natriumoxamat und 5-FU

Da durch die Hemmung der Laktatdehydrogenase mit Natriumoxamat (80 mmol/L) sowohl der Verbrauch an Glukose als auch die Bildung von Laktat bei SiHa und WiDr signifikant verringert wurde, sollte anschließend untersucht werden, ob durch die Kombination von Natriumoxamat mit dem Zytostatikum 5-FU die Wirksamkeit von 5-FU zu steigern ist.

Als erstes wurde der EC₅₀-Wert von 5-FU für SiHa und WiDr in Verdünnungsreihen von 10⁻⁹ bis 10⁻¹ mol/L 5-FU mit dem Kristallviolettassay nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bestimmt.

Tabelle 4.3: Die EC₅₀-Werte von 5-FU für SiHa und WiDr: Die EC₅₀-Werte wurden im Kristallviolettassay nach 24 Stunden Inkubation mit einer Verdünnungsreihe von 5-FU in DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose bestimmt. Hierzu wurden vor Versuchsbeginn 10⁴ Zellen pro Vertiefung einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht inkubiert. Die EC₅₀-Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung von n=2 unabhängigen Versuchen mit jeweils 6 Parallelwerten.

Zelllinie	SiHa	WiDr
EC ₅₀ [mmol/L]	> 10 ⁻¹	7,00 x 10 ⁻³

Die Wirkung von 5-FU auf Zellen von SiHa war nicht nachweisbar, da selbst bei der höchsten Konzentration von 10⁻¹ mmol/L 5-FU der Anteil avitaler Zellen nicht unter 50 % fiel; d.h. der EC₅₀ von 5-FU muss somit über 10⁻¹ mmol/L liegen. Im Gegensatz dazu reagierte WiDr mit einem EC₅₀-Wert von 7,0 x 10⁻³ mmol/L deutlich sensitiver auf 5-FU. Für die Kombinationsversuche mit Natriumoxamat wurde die Konzentration von 5-FU auf die jeweilige Zelllinie angepasst: diese betrug für SiHa 1 x 10⁻² mmol/L und für WiDr 1 x 10⁻⁴ mmol/L 5-FU.

Die zytostatische bzw. zelltoxische Wirkung der Kombination aus Natriumoxamat und 5-FU wurde bei 21 % und 1 % Sauerstoff untersucht (Abb. 4.16, 4.17). Zusätzlich wurde die Einzelwirkung von Natriumoxamat und 5-FU auf die Zellvitalität überprüft.

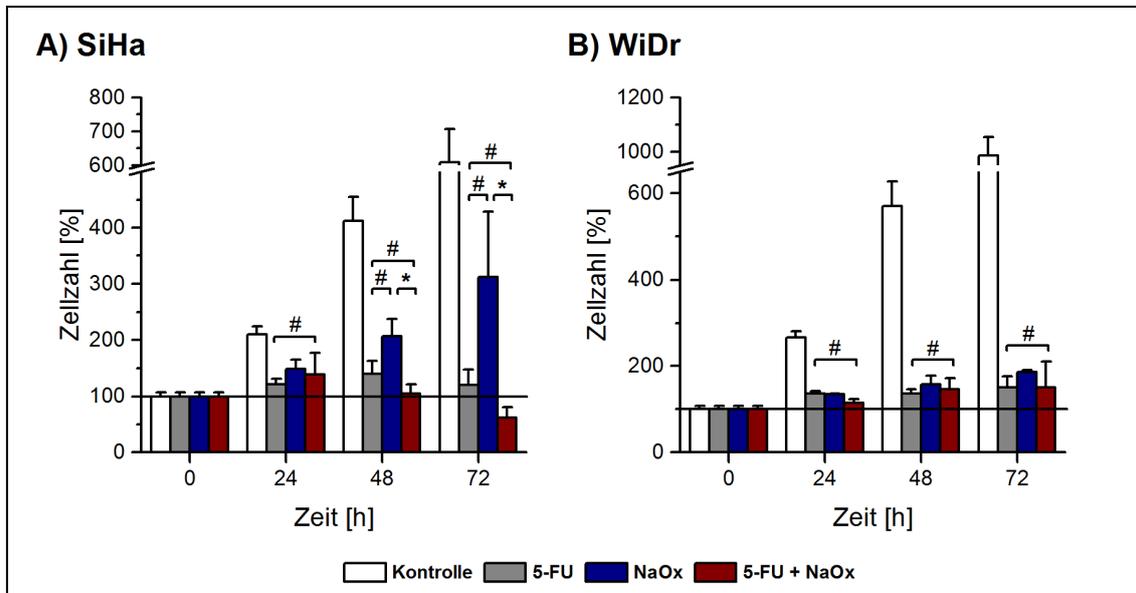


Abbildung 4.16: Die Kombination aus Natriumoxamat (NaOx) und 5-FU beeinflusst die Zellvitalität von SiHa (A) und WiDr (B) bei 21 % Sauerstoff. Dargestellt sind die prozentualen Änderungen der Zellzahlen zur Ausgangszellzahl (Aussaat) als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=2 unabhängigen Versuchen für SiHa und einem Versuch für WiDr mit jeweils 6 Parallelwerten. Bei Versuchsbeginn erhielten alle Kulturen frisches DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose. Die horizontale Linie stellt die 100 %-Marke und damit die Ausgangszellzahl dar. Kruskal-Wallis-Test (Dunn's Multiple Comparison post-hoc Test). * p < 0,05, # = nicht signifikant.

Das Zytostatikum 5-FU in Konzentrationen von 1×10^{-2} mmol/L für SiHa und 1×10^{-4} mmol/L für WiDr induzierte zytostatische Effekte bei 21 % Sauerstoff für den Untersuchungszeitraum aus (Abb. 4.16). Auch Natriumoxamat verhinderte die Zunahme vitaler Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle überaus deutlich, auch wenn keine zelltoxischen Effekte beobachtet wurden. Die Kombination aus Natriumoxamat und 5-FU induzierte bei SiHa nach einer Inkubation von 72 Stunden eindeutige zelltoxische Effekte; der Anteil vitaler Zellen verringerte sich dabei auf 62 %. Bei WiDr war die zytostatische Wirkung von 5-FU, Natriumoxamat und die Kombination gleichstark. Zytotoxische Effekte wie bei SiHa wurden nicht beobachtet.

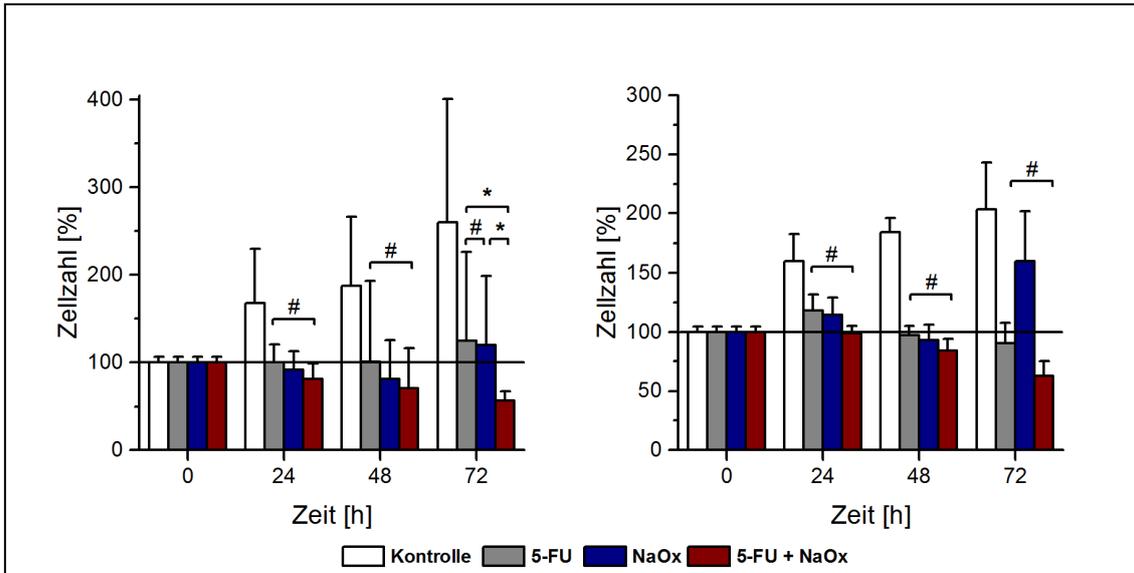


Abbildung 4.17: Die Kombination aus Natriumoxamat (NaOx) und 5-FU beeinflusst die Zellvitalität von SiHa (A) und WiDr (B) bei 1 % Sauerstoff. Dargestellt sind die prozentualen Änderungen der Zellzahlen zur Ausgangszellzahl (Aussaat) als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=3 unabhängigen Versuchen für SiHa und einem Versuch für WiDr mit jeweils 6 Parallelwerten. Bei Versuchsbeginn erhielten alle Kulturen frisches DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose. Die horizontale Linie stellt die 100 % Marke und damit die Ausgangszellzahl dar. Kruskal-Wallis-Test (Dunn's Multiple Comparison post-hoc Test). * $p < 0,05$, # = nicht signifikant.

Auch bei 1 % Sauerstoff lösten 5-FU und Natriumoxamat zytostatische Effekte aus (Abb. 4.17). Die durch Natriumoxamat induzierte Zytostase war bei dieser Sauerstoffkonzentration deutlich stärker als bei 21 % Sauerstoff. Die Kombination aus Natriumoxamat und 5-FU löste nach einer Inkubation von 72 Stunden eindeutige zytotoxische Effekte bei SiHa und WiDr aus. So verringerte sich der Anteil vitaler Zellen bei SiHa auf 56 % und bei WiDr auf 62 %.

Zusammenfassung von Kapitel 4.4: Die Daten zur Kombination aus Natriumoxamat und 5-FU belegen, dass die Inhibition der Laktatdehydrogenase die Wirksamkeit von 5-FU erhöht und dass diese Kombination nicht nur bei 21 % Sauerstoff wirksam ist, sondern auch bei der für Tumoren physiologisch relevanten Sauerstoffkonzentration von 1 %.

5 Beantwortung der Fragen

1) WiDr soll den für Tumoren typischen glykolytischen Stoffwechsel aufweisen, SiHa einen oxidativen Stoffwechsel (Sonveaux P et al., 2008). Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % sind typisch für die Oxygenierung solider Tumoren (Kallinowski F et al., 1990). Wie wirken sich diese Bedingungen auf Zellvitalität und Stoffwechsel von SiHa und WiDr aus?

Die Angaben in der Literatur zum Stoffwechsel von SiHa und WiDr werden durch die Daten der vorliegenden Arbeit nicht gestützt. Ob der Unterschied im glykolytischen Index von 20 % zwischen beiden Zelllinien bei 21 % Sauerstoff (Tab. 4.1) ausreicht, beiden Zelllinien einen unterschiedlichen Stoffwechsel zuzuweisen, muss angezweifelt werden. Bei den für solide Tumoren typischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % unterschieden sich SiHa und WiDr nicht im Verbrauch von Glukose und in der Bildung von Laktat (Abb. 4.4). Dieses Beispiel verdeutlicht, dass Untersuchungen zum Tumorstoffwechsel *in vitro* ausschließlich bei tumortypischen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt werden sollten.

2) Der Export von Laktat wird durch die Familie der Monocarboxylat-Transporter (MCT) vermittelt (Morris ME, Felmlee MA, 2008). Welche Auswirkung hat die Hemmung von MCT mit α -Cyano-4-Hydroxymethylpantothensäure (CHC) auf Zellvitalität und Stoffwechsel von SiHa und WiDr?

CHC wurde in einer Konzentration von 8 mmol/L eingesetzt und lag damit um ca. 1/3 unter der EC_{50} -Konzentration von CHC für SiHa und WiDr. In dieser Konzentration beeinflusste CHC die Zellteilung und Zellvitalität bei den drei Sauerstoffkonzentrationen. Bei SiHa wurden zytostatische Effekte und bei WiDr zelltoxische Effekte beobachtet (Abb. 4.8). Auch waren bei SiHa der Verbrauch an Glukose und der Zellexport von Laktat verringert. Diese Daten unterstützen das Konzept, dass CHC den Transport von Laktat aus der Zelle ins Zellkulturmedium vermindert. Für WiDr wurde eine größere Empfindlichkeit der Zellen auf die Inkubation mit CHC beobachtet, was vermutlich der Grund dafür ist, dass bei WiDr die für SiHa beschriebenen Effekte nicht auftraten.

3) Die Laktatdehydrogenase (LDH) ermöglicht, dass bei einem glykolytischen Stoffwechsel die für die Glykolyse notwendige oxidierte Form der Reduktionsäquivalente zur Verfügung steht. Hierbei wird Pyruvat zu Laktat reduziert, was als Milchsäuregärung bezeichnet wird. Welche Auswirkungen hat die durch Natriumoxamat vermittelte Hemmung der LDH auf Zellvitalität und Stoffwechsel von SiHa und WiDr?

Die Ergebnisse zur Hemmung der LDH bestätigen das Konzept der vorliegenden Arbeit, dass Natriumoxamat die aus dem Warburg-Effekt bei Normoxie als auch aus der anaeroben Glykolyse bei Hypoxie resultierende massive Bildung von Laktat substantiell hemmt. Hierdurch werden folgende biologischen Effekte bei SiHa und WiDr ausgelöst: eine generelle Abnahme der Zellvitalität (Abb. 4.12) in Verbindung mit einer verminderten Ansäuerung des Mediums (Abb. 4.13) als Resultat einer verringerten Bildung von Laktat (Abb. 4.14). Hierzu passt, dass auch der Verbrauch an Glukose vermindert ist, was darauf hindeutet, dass die Glykolyse in Gegenwart von Natriumoxamat einen geringeren Umsatz an Glukose aufweist.

4) Warburg-Effekt und anaerobe Glykolyse lösen eine starke Laktatbildung aus. Welche Auswirkung hat die Kombination von Natriumoxamat und 5-FU auf die Zellvitalität von SiHa und WiDr?

Die Daten zur Kombination aus Natriumoxamat und 5-FU belegen, dass die Inhibition der Laktatdehydrogenase die Wirksamkeit von 5-FU erhöht und dass diese Kombination nicht nur bei 21 % Sauerstoff Wirkung zeigt, sondern auch bei der für Tumoren physiologischen Sauerstoffkonzentration von 1 %. Inwieweit die Kombination aus Hemmung der LDH und 5-FU auch für Tumoren von Relevanz sein wird, die wie SiHa eine Chemoresistenz aufweisen, sollte in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

6 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob durch die Hemmung von Targetstrukturen im Glukosestoffwechsel von Tumorzellen zytostatische bzw. zytotoxische Effekte ausgelöst werden. An der Zervixkarzinomzelllinie SiHa und der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie WiDr wurden die Monocarboxylat-Transporter MCT1 und MCT4 sowie die Laktatdehydrogenase (LDH) mit geeigneten Inhibitoren gehemmt. Das Konzept zu dieser Vorgehensweise basiert auf dem Warburg-Effekt und der Minderversorgung solider Tumoren mit Sauerstoff („Tumorhypoxie“). In beiden Fällen bildet die Zelle große Mengen an Laktat, das zudem aus der Zelle geschleust werden muss (Kapitel 1.4, Fig. 6.1). Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Arbeiten wurden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bei Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % durchgeführt. Messungen zur Oxygenierung von Tumoren *in vivo* belegen, dass in aller Regel oxygenierte Tumorareale mit ca. 5 % Sauerstoff und hypoxische Tumoreareale mit ca. 1 % Sauerstoff versorgt sind (Kallinowski F et al., 1990).

6.1 Bedeutung des Warburg-Effekts für den Tumorstoffwechsel

Bereits 1923 berichtete Otto Warburg, dass Tumorzellen einen im Vergleich zu benignen Zellen veränderten Stoffwechsel aufweisen: Tumorzellen bilden auch bei ausreichender Oxygenierung große Mengen an Laktat (Warburg O, 1924). Diese Beobachtung wird heute nach ihrem Entdecker als Warburg-Effekt oder aerobe Glykolyse („*aerobic glykolysis*“)¹³⁾ bezeichnet (Abb. 6.1).

Seit der Entdeckung des Warburg-Effekts wurde dieser charakteristische Zellstoffwechsel bei zahlreichen Tumorzelllinien nachgewiesen (Reitzer LJ et al., 1979; Gatenby RA, Gillies RJ, 2004; Sonveaux P et al., 2008; Sakamoto T et al., 2011). Auch die in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien SiHa und WiDr weisen eine ausgeprägte aerobe Glykolyse auf (Abb. 4.4). Der glykolytische Index (Tab. 4.1) von SiHa und WiDr bei 21 % Sauerstoff zeigt, dass SiHa

¹³⁾ Siehe auch Fußnote 8.

ca. 70 % und WiDr ca. 90 % ihrer intrazellulären Glukose zur Bildung von Laktat einsetzen. Messungen mit radioaktiv markierter Glukose bestätigen, dass Krebszellen Glukose überwiegend im Rahmen der aeroben Glykolyse zu Laktat metabolisieren und nur zu einem geringen Anteil oxidativ verstoffwechseln (Reitzer LJ et al., 1979; DeBerardinis RJ et al., 2007).

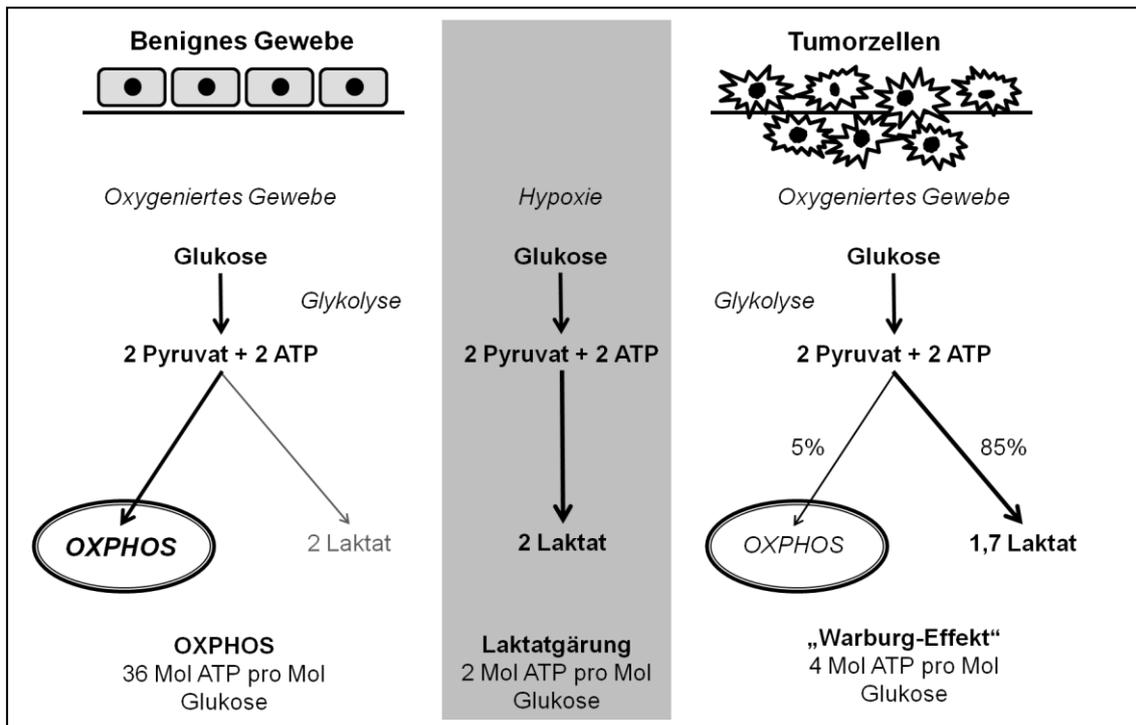


Abbildung 6.1: Der Glukosestoffwechsel in Abhängigkeit von der Sauerstoffversorgung. Die Abbildung veranschaulicht die metabolischen Unterschiede zwischen benignen und malignen Geweben. Die oxidative Metabolisierung von Glukose in benignen Zellen ermöglicht eine vollständige Oxidation von Glukose mit einer Bildung von 36 Mol ATP¹⁴⁾ pro Mol Glukose (Zellatmung). Dagegen bilden Tumorzellen auch bei ausreichender Versorgung mit Sauerstoff große Mengen an Laktat. Der Grund hierfür ist, dass der Großteil des Pyruvats durch die Laktatdehydrogenase zu Laktat reduziert und nur ein geringer Teil in den Mitochondrien oxidativ verstoffwechselt wird. Die für die Glykolyse notwendigen regenerierten Reduktionsäquivalente werden durch die Laktatdehydrogenase bereitgestellt und nicht durch die Atmungskette. Der Warburg-Effekt ist somit energetisch ineffizienter als die Zellatmung, aber effizienter als die anaerobe Glykolyse. Vander Heiden et. al. schätzen, dass Tumoren *in vivo* pro Molekül Glukose ca. 4 Moleküle ATP im Rahmen des Warburg-Effekts bilden. In Hypoxie beschränkt sich der ATP-Gewinn ausschließlich auf die durch Substratkettenphosphorylierung gebildeten 2 mol ATP pro mol Glukose (Vander Heiden MG et al., 2009). Dieser anaerobe Stoffwechsel wird auch als Milchsäuregärung bezeichnet (Kapitel 1.2.4). Die ausführliche Energiebilanz des Warburg-Effekts ist in Kapitel 10.10 dargestellt. Modifizierter Entwurf nach Vander Heiden MG et al., 2009.

¹⁴⁾ Siehe Fußnote 6.

Verglichen mit der vollständigen Oxidation von Glukose ist der Warburg-Effekt, der hauptsächlich ATP aus der Glykolyse und nur zu einem geringen Teil aus der Atmungskette gewinnt, energetisch ineffizienter (Abb. 6.1). Dies wird aber mit einer gesteigerten Aufnahme von Glukose und einer schnelleren Umsetzung über die Glykolyse kompensiert. Aktuelle Untersuchungen kommen zu dem Ergebnis, dass der Warburg-Effekt keinen Nachteil für die Tumorzelle hinsichtlich der Versorgung mit ATP bedeutet, da mit der Glykolyse wesentlich schneller ATP produziert wird als mit der Atmungskette (Waddell TG et al., 1999; Pfeiffer T et al., 2001). Neue Untersuchungen *in vitro* haben tatsächlich zeigen können, dass Tumorzellen keinen Mangel an ATP aufweisen (Christofk HR et al., 2008). Des Weiteren stellt die Glykolyse essentielle Zwischenprodukte für den gesteigerten anabolen Stoffwechsel von Tumorzellen bereit. Diese ermöglichen die Synthese von Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen, die Tumorzellen für ihr schnelles Zellwachstum benötigen (Vander Heiden MG et al., 2009; Weinberg F, Chandel NS, 2009).

Wie bereits in Abschnitt 1.3 erläutert, wird der Warburg-Effekt vor allem als Anpassung des Tumors an die Unterversorgung mit Sauerstoff interpretiert. Da der Sauerstoffpartialdruck deutlich schneller abfällt als der Konzentrationsgradient von Glukose, sind hypoxische Areale innerhalb eines Tumors nicht per se mit Glukose unterversorgt (Kallinowski F et al., 1987). In solchen mit Glukose versorgten hypoxischen Arealen können Tumorzellen überleben, da die im Rahmen des Warburg-Effekts gesteigerte Glykolyse ihnen eine ausreichende Bildung von ATP und Stoffwechselprodukten ermöglicht. Die über den Transkriptionsfaktor HIF vermittelte Adaption an eine geringe Sauerstoffversorgung führt zu einer dauerhaften Umstellung des Energiestoffwechsels von der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) zur aeroben Glykolyse. Dieser Wechsel wird in der Literatur auch als „*glycolytic shift*“ bezeichnet und findet bereits in sehr frühen Tumorstadien statt (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004; Gillies RJ, Gatenby RA, 2007; Kroemer G, Pouyssegur J, 2008; Chiche J et al., 2010).

Eigene Berechnungen zum glykolytischen Index von SiHa und WiDr bei 21 % Sauerstoff (Tab. 4.1) scheinen solche Daten zu bestätigen, die SiHa einen oxidativen Stoffwechsel und WiDr einen glykolytischen Stoffwechsel zuweisen (Sonveaux P et al., 2008). Doch bereits bei tumortypischen Sauerstoffbedingungen von 5 % und 1 % sind keine wesentlichen Unterschiede mehr im Stoffwechsel beider Zelllinien zu messen. Dieses Beispiel verdeutlicht die Notwendigkeit, Untersuchungen zum Tumorstoffwechsel *in vitro* ausschließlich bei tumortypischen Sauerstoffkonzentrationen durchzuführen. Beide Zelllinien weisen bei 5 % und 1 % Sauerstoff einen deutlich gesteigerten Verbrauch an Glukose in Verbindung mit einer gesteigerten Bildung von Laktat auf (Abb. 4.4). Der Stoffwechsel bei der unphysiologischen Sauerstoffkonzentration von 21 % demonstriert in erster Linie eindrucksvoll, dass Tumorzellen auch bei der Gewinnung von Energie sehr flexibel sind. Der Stoffwechsel von Tumoren ist nicht ausschließlich auf die aerobe Glykolyse fixiert, sondern passt sich der jeweiligen Versorgung mit Sauerstoff an, wodurch sich auch der Anteil der oxidativen Phosphorylierung an der Bildung von ATP ändert. Mit abnehmender Sauerstoffkonzentration verringert sich zwar die oxidative Phosphorylierung, sie scheint aber – zumindest bei 1 % Sauerstoff – nicht zum Erliegen zu kommen, da reaktive Sauerstoffspezies auch bei dieser Sauerstoffkonzentration gebildet werden (Abb. 4.6). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kann als Hinweis für eine aktive Atmungskette gesehen werden. Das bei 1 % Sauerstoff verlangsamte Zellwachstum (Abb. 4.1) löst einen Zellzyklusarrest aus, der als Schutzmechanismus vor Zellschäden gewertet wird (Gardner LB et al., 2001).

Der Nachweis einer aktiven mitochondrialen Zellatmung durch SiHa und WiDr bei 21 % Sauerstoff (Abb. 4.5) mit der Clark-Elektrode bestätigen Beobachtungen von Pederson (Pedersen PL, 1978) und widerlegen Warburgs Annahme über eine gestörte mitochondriale Atmung bei Tumorzellen. Auch die in dieser Arbeit gemessene oxidative Verstoffwechslung von Laktat bei 21 % Sauerstoff (Abb. 10.8) spricht dafür, dass Tumorzellen bei ausreichender Oxygenierung neben Glukose auch andere Energieträger oxidativ metabolisieren können. Die Nutzung von Laktat als Energieträger durch Tumorzellen bei ausreichender

Oxygenierung ist bekannt (Sonveaux P et al., 2008). Doch scheinen Tumorzellen Glukose als leicht aufschließbare Energiequelle anderen Energieträgern vorzuziehen. Erhalten SiHa und WiDr bei 21 % Sauerstoff sowohl Glukose als auch Laktat, so verbrauchen beide Tumorzelllinien zuerst Glukose und erst, nachdem diese Energiequelle erschöpft ist, Laktat (Abb. 10.9). Bei Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % wurde keine Verstoffwechslung von Laktat durch SiHa und WiDr beobachtet (Abb. 10.9 und Abb. 10.10). Der glykolytische Index von SiHa und WiDr bei 5 % Sauerstoff lässt allerdings vermuten, dass noch ein geringer oxidativer Stoffwechsel vorhanden ist. Diese Beobachtung bestätigt Untersuchungen, die eine Versorgung solider Tumoren mit 5 % Sauerstoff als biologisch relevant ansehen (Vaupel P, 1992; Höckel M, Vaupel P, 2001). Bei einer Versorgung mit 1 % Sauerstoff, was allgemein als Hypoxie bezeichnet wird, waren beide Tumorzelllinien vollständig auf Glukose zur Energiegewinnung angewiesen. Diese Beobachtungen unterstreichen die zentrale Bedeutung von Glukose als Hauptenergieträger für maligne Zellen.

Die an den Warburg-Effekt gekoppelte starke glykolytische Aktivität von Tumorzellen führt zur Bildung großer Mengen an Laktat als Ursache für ein azidotisches Milieu (Cairns R et al., 2006; Kim JW et al., 2007). Die durch das chaotische Blutgefäßsystem im Tumor ausgelöste Unterversorgung mit Sauerstoff verstärkt zudem die Azidose (Abb. 1.4). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bei 1 % Sauerstoff *in vitro* haben eindeutig eine starke Ansäuerung des Zellkulturüberstandes auf Werte unter pH 6,6 gezeigt; diese Abnahme war stärker als bei 21 % und 5 % Sauerstoff (Abb. 4.3). Ähnlich niedrige pH-Werte wurden im Rahmen von Untersuchungen an menschlichen Tumoren *in vivo* gemessen (van den Berg AP et al., 1982; Vaupel P, 1992). Die für die durchgeführten Untersuchungen gewählte Sauerstoffkonzentration von 1 % scheint somit repräsentativ für das hypoxische Milieu innerhalb solider Tumoren zu sein.

Die durch Hypoxie ausgelösten extremen Bedingungen stellen auch für Tumorzellen eine Herausforderung dar. So führt der durch die starke Laktatbildung

abgesenkte intra- und extrazelluläre pH-Wert zum Zelltod (Matsuyama S et al., 2000; Jeong D et al., 2001). Die beiden in dieser Arbeit untersuchten Karzinomzelllinie SiHa und WiDr scheinen ein gutes Beispiel dafür zu sein, dass der Grad der Anpassung an hypoxische und azidotische Bedingungen sehr unterschiedlich sein kann. Für WiDr konnte eindeutig gezeigt werden, dass der Anteil vitaler Zellen bei 1 % Sauerstoff nach 72 Stunden in Kultur stark abnahm (Abb. 4.2). Da WiDr zu diesem Zeitpunkt noch mit Glukose versorgt war (Abb. 4.4), ist als Grund für ein Absterben der Zellen ein Glukosemangel sicherlich auszuschließen. Im Gegensatz zu WiDr scheint SiHa sehr viel besser mit hypoxischen Bedingungen (1 % Sauerstoff) und der Azidose zurechtzukommen. Inzwischen sind verschiedene molekulare Mechanismen identifiziert worden, die dazu beitragen, sich dem azidotischen Milieu anzupassen (Ryder C et al., 2012; Wu H et al., 2012). Darüber hinaus fördert das azidotische Milieu im Tumor die Invasivität einzelner Tumorzellen und trägt somit zur Metastasierung von Tumoren bei (Schlappack OK et al., 1991; Martinez-Zaguilan R et al., 1996).

6.2 Biologische Effekte durch Hemmung des Laktatexports

Die durch die Inhibition der Monocarboxylat-Transporter (MCT) ausgelösten Effekte eines gehemmten Laktatexports wurden in der vorliegenden Arbeit bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen mit dem etablierten MCT-Inhibitor α -Cyano-4-hydroxymizimsäure (CHC) untersucht. Dazu wurde eine CHC-Konzentration von 8 mmol/L eingesetzt. Die Expression von MCT1 und MCT4, auf die CHC wirkt, wurde sowohl für SiHa als auch für WiDr im Western Blot erfolgreich nachgewiesen (Abb. 4.7, Abb. 10.15).

Bei der Zervixkarzinomzelllinie SiHa wurde der Laktatexport durch die MCT-Inhibitor CHC erfolgreich gehemmt (Abb. 4.10). In diesem Zusammenhang waren zytostatische bzw. zytotoxische Effekte zu beobachten gewesen (Abb. 4.8), vermutlich als Konsequenz einer eingeschränkten aeroben Glykolyse. In Hypoxie (1 % Sauerstoff), hier sind die Tumorzellen auf eine uneingeschränkte Energiegewinnung durch die Glykolyse wie auf einen uneingeschränkten Laktatexport angewiesen, führte die Hemmung von MCT1 und MCT4 durch

CHC vermutlich zum Zusammenbruch des Energiestoffwechsels mit anschließender Induktion von Apoptose (Abb. 4.8). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bestätigt publizierte Daten, wonach CHC den Laktatexport hemmt (Morris ME, Felmler MA, 2008). Die Beobachtung, dass CHC auch in Hypoxie wirksam ist, könnte von besonderer Bedeutung sein, da unter hypoxischen Bedingungen die Effektivität von Chemotherapeutika und Strahlentherapie vermindert ist (Sakata K et al., 1991; Höckel M, Vaupel P, 2001; Rohwer N et al., 2010).

Es ist bekannt, dass erhöhte intrazelluläre Laktatkonzentrationen oxidativen Stress induziert (Vegran F et al., 2011). Oxidativer Stress geht von Sauerstoffspezies mit einem ungepaarten Elektron aus, die ständig im Rahmen des aeroben Stoffwechsels eukaryotischer Zellen gebildet werden. Reaktive Sauerstoffspezies werden nicht nur bei ausreichender Oxygenierung, sondern auch in Hypoxie gebildet (Poyton RO et al., 2009). Aufgrund des ungepaarten Elektrons reagieren reaktive Sauerstoffspezies mit Proteinen, Lipiden und DNA der Zelle und verursachen so Zellschäden. Übersteigt die Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies eine gewisse Schwelle kommt es zum Absterben der Zelle (Kannan K, Jain SK, 2000; Fleury C et al., 2002). Bei beiden Zelllinien führte die CHC-vermittelte Hemmung von MCT zu einer massiven Bildung reaktiver Sauerstoffspezies auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff (Abb. 4.11). Die zellschädigende Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies wäre eine mögliche Erklärung für die massive Abnahme vitaler Zellen bei WiDr während der Inkubation mit CHC. Dieser Aspekt ist aber noch in weiterführenden Untersuchungen zu klären. Nach neueren Daten zu einem weiteren Monocarboxylat-Transporter, dem MCT2, der auch von Tumorzellen exprimiert wird, führt dessen Hemmung zu einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die mit einer Hemmung des Zellwachstums einhergeht. MCT2 ist in Tumorzellen unter anderem in der Mitochondrienmembran lokalisiert und ist hier für den Transport von Pyruvat in die Mitochondrien zuständig (Halestrap AP, 1975). Erste Daten deuten darauf hin, dass die Inhibition von MCT2 zu einer mitochondrialen Dysfunktion mit Induktion von oxidativem Stress führt (Lee I et al., 2012). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete MCT-Inhibitor CHC hemmt ebenfalls MCT2 (Morris ME,

Felmlee MA, 2008), so dass die starke Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei SiHa und WiDr durch eine CHC-vermittelte Hemmung von MCT2 in der Mitochondrienmembran erklärt werden kann. Ein immunhistochemischer Nachweis von MCT2 in SiHa und WiDr wurde bisher nicht durchgeführt.

Das Potential der MCT-Inhibition ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend klären. Die Ergebnisse für die Zelllinie SiHa zeigen, dass eine erfolgreiche MCT-Inhibition das Absterben von Tumorzellen in Hypoxie förderte, während bei 21 % und 5 % Sauerstoff das Zellwachstum vermindert war. Für WiDr wurde die Hemmung des Laktatexports nicht gezeigt. Dies wirft die Frage auf, welche spezifischen Eigenschaften Tumorzellen für eine erfolgreiche Hemmung des Laktatexports aufweisen müssen. Da durch die Expression von MCT4 eine Hemmung von MCT1 umgangen wird (Le Floch R et al., 2011), Tumoren aber ebenfalls MCT4 exprimieren (Pinheiro C et al., 2008; Pinheiro C et al., 2010), wäre eine vollständige Blockade der Monocarboxylat-Transporter MCT1, MCT2 und MCT4 für eine erfolgreiche Hemmung des Laktatexports notwendig. Bei der Hemmung von MCT2 sollte beachtet werden, dass dieser Transporter, der den mitochondrialen Transport von Pyruvat vermittelt, möglicherweise das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen erhöht, da insbesondere benigne Zellen auf eine oxidative Energiegewinnung angewiesen sind. Davon unberührt bleibt der Aspekt der MCT-Hemmung zur Induktion von oxidativem Stress weiterhin attraktiv.

6.3 Biologische Effekte durch Hemmung der Laktatbildung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Laktatdehydrogenase in Tumorzellen mit dem Pyruvatanalogon Natriumoxamat gehemmt. In Übereinstimmung mit dem Konzept zu dieser Arbeit (Kapitel 1.4) führte diese Hemmung zu einer verminderten Bildung von Laktat durch die beiden Tumorzelllinien SiHa und WiDr; gleichzeitig verringerte sich der Verbrauch an Glukose (Abb. 4.14). Da weniger Laktat in den Zellen gebildet wurde, war auch der Export von Laktat geringer und als Folge davon wurde das Zellkulturmedium weniger stark angesäuert (Abb. 4.13). Bei 21 % Sauerstoff bewirkte die Hemmung der Laktatdehydro-

genese eine Verlangsamung des Zellwachstums (Abb. 4.12). Ähnliche Beobachtungen wurden im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen an hepatozellulären Karzinomzelllinien bei 21 % Sauerstoff gemacht (Fiume L et al., 2010; Sheng SL et al., 2012). Die in dieser Arbeit untersuchten Sauerstoffbedingungen von 5 % und 1 % zeigen, dass die Wirksamkeit der LDH-Inhibition mit abnehmender Sauerstoffkonzentration zunimmt. Während das Zellwachstum bei 5 % Sauerstoff verlangsamt war, kam es bei 1 % Sauerstoff zum Absterben der Zellen bei beiden Zelllinien. Da Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen darauf angewiesen sind, die Reduktionsäquivalente aus der Glykolyse mit Hilfe der Laktatdehydrogenase zu reoxidieren, kommt es bei Inhibition der Laktatdehydrogenase vermutlich zum Zusammenbruch des zellulären Energiehaushalts und damit zum Absterben der Tumorzellen.

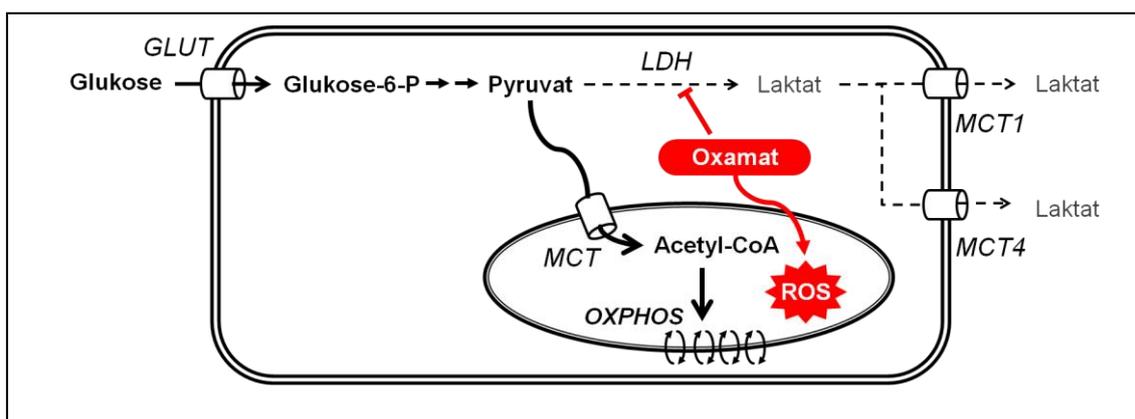


Abbildung 6.2: Auswirkungen der Natriumoxamat-induzierten Hemmung von LDH. Natriumoxamat (Oxamat) vermindert die intrazelluläre Bildung von Laktat durch Hemmung der Laktatdehydrogenase (LDH). Dies führt vermutlich zu einem verstärkten Transport von Pyruvat aus dem Zytosol in die Mitochondrien mit einer Steigerung der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS). Bei einer verminderten Versorgung mit Sauerstoff kommt es zu einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Ein Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff möglich ist. Eigener Entwurf basierend auf Ergebnissen dieser Arbeit und der von Le Floch et al., 2009.

Die Zellatmung (OXPHOS) geht mit einer ständigen Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einher (Brand KA, Hermfisse U, 1997). Tumorzellen, die keine aktive LDH-A exprimieren, weisen erhöhte Respirationsraten auf (Fantin VR et al., 2006), die durch ein Umschalten der Energiegewinnung von aerober Glykolyse auf oxidative Phosphorylierung erklärt wird. Die Folge ist eine vermehrte Bil-

derung reaktiver Sauerstoffspezies (Fantin VR et al., 2006). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch die Natriumoxamat-vermittelte LDH-Inhibition wurde in der vorliegenden Arbeit belegt. Beide Zelllinien, SiHa und WiDr, bilden bei diesen Bedingungen signifikant erhöhte Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies. Untersuchungen mit einem weiteren LDH-Inhibitor bestätigen diese Ergebnisse (Le A et al., 2010). Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies auch bei verringerten Sauerstoffkonzentrationen möglich ist, wie sie in soliden Tumoren vorherrschen.

Weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die Kombination aus Natriumoxamat-vermittelter LDH-Inhibition und 5-FU die Wirkung von 5-FU bei chemoresistenten Tumorzellen in Hypoxie verstärken kann. Die gegenüber 5-FU resistente Zervixkarzinomzelllinie SiHa zeigte bei Inkubation mit Natriumoxamat und 5-FU einen zytotoxischen Effekt nach 72 Stunden bei 1 % Sauerstoff, wohingegen die einzelnen Substanzen lediglich zytostatische Effekte auslösten. Über eine verbesserte Wirksamkeit des Chemotherapeutikums Taxol in Kombination mit Natriumoxamat wurde bereits bei Brustkrebszelllinien berichtet (Zhou M et al., 2010). Diese Erkenntnis ist relevant, da Tumorphoxie die Wirksamkeit einer Vielzahl konventioneller Chemotherapeutika verringert (Teicher BA et al., 1990; Strese S et al., 2013). Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde 5-FU gewählt, da 5-FU im Rahmen des FOLFOX4-Schemas¹⁵⁾ fester Bestandteil der Behandlung kolorektaler Karzinome ist (de Gramont A et al., 2000; Andre T et al., 2009; Pox CP, Schmiegel W, 2013). Gleichzeitig verringert Hypoxie die zytotoxische Wirksamkeit von 5-FU (Sakata K et al., 1991; Rohwer N et al., 2010). Da mit abnehmender Sauerstoffkonzentration die Inhibition der LDH an Wirksamkeit zunimmt, stellt die Kombination aus LDH-Inhibition und Chemotherapie vermutlich eine attraktive Strategie dar, um die durch Hypoxie verursachte Chemoresistenz zu überwinden.

¹⁵⁾ Das FOLFOX4-Schema besteht aus 5-Fluorouracil, Folinsäure und Oxaliplatin und wird adjuvant oder palliativ bei fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen eingesetzt.

Um mögliche Nebenwirkungen durch die Inhibition der Laktatdehydrogenase abschätzen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt, welches klinische Bild durch den Verlust der Laktatdehydrogenase hervorgerufen wird. Danach zeigen Menschen mit einem Verlust an LDH-A lediglich bei körperlicher Anstrengung Muskelsteifigkeit und Myoglobinurie, ansonsten sind sie im Alltag vollkommen symptomfrei (Kanno T et al., 1988). Mutationen in LDH-B lösen kein Krankheitsbild aus und sind ausschließlich von labormedizinischem Interesse (Sudo K et al., 1994). Eine Hemmung der Laktatdehydrogenase in Tumoren könnte folglich mit geringen Nebenwirkungen verbunden sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass die Strategie der Hemmung der Laktatdehydrogenase und der MCT über grundlegendes Potential zur Entwicklung neuartiger Behandlungskonzepte in der Krebstherapie verfügt.

7 Ausblick

Die Daten dieser Arbeit zu den beiden Karzinomzelllinien SiHa und WiDr deuten darauf hin, dass die Hemmung des Laktatexports durch Inhibition der Monocarboxylat-Transporter in Hypoxie zum Zelltod führt. Da im Gegensatz zu gesunden Geweben solide Tumoren mit Sauerstoff minderversorgt sind (Hypoxie), erscheint die gezielte Hemmung des Laktatexportes als ein selektiv auf den Tumor gerichtetes Vorgehen. Da diese Strategie nur bei der Tumorzelllinie SiHa erfolgreich war, sollte zur Bestätigung des Konzepts die Expression aller MCT-Isoformen und ihr Einfluss auf den Stoffwechsel bei einer Vielzahl von Tumorzellen in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Da die Expression der Monocarboxylat-Transporter durch HIF reguliert wird, sollten die Untersuchungen auch in Hypoxie durchgeführt werden. Weiterhin sollte der Beitrag der reaktiven Sauerstoffspezies, deren Bildung durch die Hemmung von MCT ausgelöst wird, am Wirkprinzip der MCT-Hemmung geklärt werden. Untersuchungen mit z. B. Antioxidantien wie Glutathion könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Die Hemmung der Laktatdehydrogenase stellt ein vielversprechendes Target dar. Zur Bestätigung der gezielten Wirkung auf Tumorzellen sollte die Funktion der Laktatdehydrogenase spezifisch mit Knockdown-Technologie gehemmt werden. Der verwendete LDH-Inhibitor Natriumoxamat ist ein Substratanalagon und hemmt sowohl LDH-A als auch LDH-B. Zukünftige Untersuchungen sollten sich auf die für Tumoren relevante Isoform LDH-A fokussieren. Die Hemmung der Laktatdehydrogenase verhinderte effektiv die Ansäuerung des Zellkulturüberstands. Da ein niedriger pH-Wert unter anderem mit einer höheren Invasivität assoziiert sein kann (Schlappack OK et al., 1991; Martinez-Zaguilan R et al., 1996), wäre es interessant zu untersuchen, ob sich mit der Hemmung der LDH auch die Invasivität von Tumorzellen vermindert lässt.

8 Zusammenfassung

In der Onkologie bleibt das grundlegende Ziel, neue Strukturen zu identifizieren und ihre Eignung für therapeutische Ansätze zu prüfen. Seit einigen Jahren wird der Stoffwechsel von Tumoren als zur Entwicklung neuer Therapiestrategien untersucht, nachdem dieser bereits Anfang des 20. Jahrhunderts im Fokus des wissenschaftlichen Interesses stand. So berichtete der Nobelpreisträger Otto Warburg bereits im Jahr 1923 über eine starke Bildung von Milchsäure an Gewebeschnitten solider Tumoren in Gegenwart von Sauerstoff. Für diese Eigenschaft von Tumoren, die bei normalen Körperzellen nicht beobachtet wird, hat sich die Bezeichnung „Warburg-Effekt“ durchgesetzt, der als Anpassung an die in soliden Tumoren vorherrschenden Sauerstoffbedingungen interpretiert wird.

Der Warburg-Effekt führt dazu, dass Tumorzellen einen so genannten glykolytische Stoffwechsel aufweisen, der durch einen hohen Glukoseumsatz in der Glykolyse und eine massive Bildung von Laktat charakterisiert ist. Wird die Tumorzelle daran gehindert, die für die Glykolyse notwendigen Reduktionsäquivalente mit Hilfe der Laktatdehydrogenase zu reoxidieren, verringert sich der Umsatz von Glukose über die Glykolyse und die Tumorzelle gerät in ein Energiedefizit. Wird die Tumorzelle daran gehindert, Laktat aus dem Zellinneren über die Transporter MCT1 und MCT4 nach außen zu schleusen, so kommt es zu einer intrazellulären Übersäuerung. Beide Strategien führen zum Zelltod. Als Hemmstoff für die Zielstruktur Laktatdehydrogenase wurde Natriumoxamat (NaOx) und als Hemmstoff für die Zielstruktur MCT1 bzw. MCT4 wurde α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (CHC) gewählt. Ihre Wirkung auf die Zellvitalität und den Zellstoffwechsel wurde an der Zervixkarzinomzelllinie SiHa und der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie WiDr untersucht, die beide sowohl die Laktatdehydrogenase LDH-A als auch die Monocarboxylat-Transporter MCT1 und MCT4 exprimieren. Die Untersuchungen zum Tumorstoffwechsel wurden bei Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % durchgeführt.

Bei SiHa war die Hemmung des Laktatexports durch den MCT-Inhibitor CHC erfolgreich und bewirkte eine starke Inhibition des Zellwachstums auch in Hypoxie (1 % Sauerstoff). Die Inkubation mit CHC führte bereits nach 48 Stunden zu zelltoxischen Effekten; nach 120 Stunden lag der Anteil vitaler Zellen nur noch bei 50 %. Die CHC-vermittelte Hemmung der MCT verringerte bei SiHa den Verbrauch an Glukose um ca. 50 % und die Produktion von Laktat um ca. 40 % nach 24 Stunden. Auch bei WiDr wurden durch CHC ausgelöste zelltoxische Effekte bereits nach 24 Stunden beobachtet.

Die Hemmung der Laktatdehydrogenase verminderte in beiden Tumorzelllinien eindeutig die Laktatbildung und gleichzeitig den Glukoseverbrauch um mehr als 50 % innerhalb von 24 Stunden. Dabei nahm die Wirksamkeit der LDH-Inhibition mit abnehmender Sauerstoffkonzentration zu. Während das Zellwachstum bei 5 % Sauerstoff verzögert war, nahm bei 1 % Sauerstoff der Anteil vitaler Zellen um ca. 50 % ab.

Die Daten zur Kombination aus Natriumoxamat und 5-FU belegen, dass die Inhibition der Laktatdehydrogenase die Wirksamkeit von 5-FU erhöht und dass diese Kombination nicht nur bei 21 % Sauerstoff wirksam ist, sondern auch bei der für Tumoren physiologisch relevanteren Sauerstoffkonzentration von 1 %.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen als „proof of concept“, dass die Hemmung der Laktatdehydrogenase und der MCT zur Inhibition des glykolytischen Stoffwechsels von Tumorzellen führt. Weitere Untersuchungen sind zweifelsohne notwendig, um die molekularen Mechanismen im Detail zu verstehen, doch scheinen beide Strategien über das prinzipielle Potential zur Entwicklung einer neuartigen Form der Krebstherapie zu verfügen. Dabei wird sicherlich von Bedeutung sein, dass beide Strategien insbesondere in Hypoxie, in der die Wirksamkeit von Chemotherapeutika und Strahlentherapie begrenzt ist, ebenfalls Effekte aufweisen.

9 Literaturverzeichnis

- Alonso, A., Martin, P., Albarran, C., Aquilera, B., Garcia, O., Guzman, A., et al. (1997). Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis. *Electrophoresis* **18 (5)**: 682-685.
- Andre, T., Boni, C., Navarro, M., Taberero, J., Hickish, T., Topham, C., et al. (2009). Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* **27 (19)**: 3109-3116.
- Balinsky, D., Platz, C. E., Lewis, J. W. (1983). Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues. *Cancer Res* **43 (12 Pt 1)**: 5895-5901.
- Bertout, J. A., Patel, S. A., Simon, M. C. (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* **8 (12)**: 967-975.
- Brand, K. A., Hermfisse, U. (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *Faseb j* **11 (5)**: 388-395.
- Brandon, M., Baldi, P., Wallace, D. C. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* **25 (34)**: 4647-4662.
- Cairns, R., Papandreou, I., Denko, N. (2006). Overcoming physiologic barriers to cancer treatment by molecularly targeting the tumor microenvironment. *Mol Cancer Res* **4 (2)**: 61-70.
- Carew, J. S., Huang, P. (2002). Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* **1**: 9.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., et al. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394 (6692)**: 485-490.
- Chen, H. H., Chiu, N. T., Su, W. C., Guo, H. R., Lee, B. F. (2012). Prognostic value of whole-body total lesion glycolysis at pretreatment FDG PET/CT in non-small cell lung cancer. *Radiology* **264 (2)**: 559-566.

- Chiche, J., Brahim-Horn, M. C., Pouyssegur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* **14 (4)**: 771-794.
- Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., et al. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **452 (7184)**: 230-233.
- Costelloe, C. M., Macapinlac, H. A., Madewell, J. E., Fitzgerald, N. E., Mawlawi, O. R., Rohren, E. M., et al. (2009). 18F-FDG PET/CT as an indicator of progression-free and overall survival in osteosarcoma. *J Nucl Med* **50 (3)**: 340-347.
- Coutard, H. (1932). Roentgen therapy of epitheliomas of the tonsillar region, hypopharynx, and larynx from 1920 to 1926. *AJR Am J Roentgenol* **(28)**: 313-331.
- Crivellaro, C., Signorelli, M., Guerra, L., De Ponti, E., Buda, A., Dolci, C., et al. (2012). 18F-FDG PET/CT can predict nodal metastases but not recurrence in early stage uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* **127 (1)**: 131-135.
- Dameshek, W., Weisfuse, L., Stein, T. (1949). Nitrogen mustard therapy in Hodgkin's disease; analysis of 50 consecutive cases. *Blood* **4 (4)**: 338-379.
- de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., et al. (2000). Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* **18 (16)**: 2938-2947.
- DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., et al. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104 (49)**: 19345-19350.
- DESTATIS (2012). Gesundheit - Todesursachen in Deutschland **12 (4)**: 1-56.
- DeVita, V. T., Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* **68 (21)**: 8643-8653.

- DeVita, V. T., Rosenberg, S. A. (2012). Two hundred years of cancer research. *N Engl J Med* **366 (23)**: 2207-2214.
- DeVita, V. T., Serpick, A. A., Carbone, P. P. (1970). Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease. *Ann Intern Med* **73 (6)**: 881-895.
- Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., et al. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **355 (23)**: 2408-2417.
- Eckert, A. W., Lautner, M. H., Schutze, A., Taubert, H., Schubert, J., Bilkenroth, U. (2011). Coexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha and glucose transporter-1 is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Histopathology* **58 (7)**: 1136-1147.
- Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., et al. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* **64 (11)**: 3892-3899.
- Endrich, B., Hammersen, F., Meßmer, K. (1988). Die mikrovasculäre Perfusion maligner Tumoren —eine therapeutische Größe zur Steigerung des Hyperthermieeffektes? *Langenbecks Archiv für Chirurgie* **373 (1)**: 12-29.
- Fan, Y., Dickman, K. G., Zong, W. X. (2010). Akt and c-Myc differentially activate cellular metabolic programs and prime cells to bioenergetic inhibition. *J Biol Chem* **285 (10)**: 7324-7333.
- Fantin, V. R., St-Pierre, J., Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* **9 (6)**: 425-434.
- Farber, S., Diamond, L. K. (1948). Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med* **238 (23)**: 787-793.
- Fearon, E. R., Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61 (5)**: 759-767.
- Fenske, W., Volker, H. U., Adam, P., Hahner, S., Johanssen, S., Wortmann, S., et al. (2009). Glucose transporter GLUT1 expression is an stage-

- independent predictor of clinical outcome in adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer* **16 (3)**: 919-928.
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* **127 (12)**: 2893-2917.
- Fiume, L., Manerba, M., Vettraino, M., Di Stefano, G. (2010). Impairment of aerobic glycolysis by inhibitors of lactic dehydrogenase hinders the growth of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Pharmacology* **86 (3)**: 157-162.
- Fletcher, W. M. (1907). Lactic acid in amphibian muscle. *J Physiol* **35 (4)**: 247-309.
- Fleury, C., Mignotte, B., Vayssiere, J. L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* **84 (2-3)**: 131-141.
- Frei, E., Karon, M., Levin, R. H., Freireich, E. J., Taylor, R. J., Hananian, J., et al. (1965). The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood* **26 (5)**: 642-656.
- Gardner, L. B., Li, Q., Park, M. S., Flanagan, W. M., Semenza, G. L., Dang, C. V. (2001). Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem* **276 (11)**: 7919-7926.
- Gatenby, R. A., Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4 (11)**: 891-899.
- Gillies, R. J., Didier, N., Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* **159 (1)**: 109-113.
- Gillies, R. J., Gatenby, R. A. (2007). Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? *J Bioenerg Biomembr* **39 (3)**: 251-257.
- Goeckenjan, G., Sitter, H., Thomas, M., et al. (2010). Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms: Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. *Pneumologie* **64**: 23-156.

- Goldberg, E. B., Colowick, S. P. (1965). The role of glycolysis in the growth of tumor cells. Lactic dehydrogenase as the site of action of oxamate on the growth of cultured cells. *J Biol Chem* **240**: 2786-2790.
- Goldman, R. D., Kaplan, N. O., Hall, T. C. (1964). Lactic dehydrogenase in human neoplastic tissues *Cancer Res* **24**: 389-399.
- Gu, Y. Z., Moran, S. M., Hogenesch, J. B., Wartman, L., Bradfield, C. A. (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* **7 (3)**: 205-213.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400 (6743)**: 464-468.
- Halestrap, A. P. (1975). The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J* **148 (1)**: 85-96.
- Halsted, W. S. (1894). I. The Results of Operations for the Cure of Cancer of the Breast Performed at the Johns Hopkins Hospital from June, 1889, to January, 1894. *Ann Surg* **20 (5)**: 497-555.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100 (1)**: 57-70.
- Hill, A. V., Long, C. N. H., Lupton, H. (1924). Muscular Exercise, Lactic Acid, and the Supply and Utilisation of Oxygen. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B* **96 (679)**: 438-475.
- Höckel, M., Vaupel, P. (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* **93 (4)**: 266-276.
- Huang, L. E., Arany, Z., Livingston, D. M., Bunn, H. F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* **271 (50)**: 32253-32259.
- Huang, L. E., Gu, J., Schau, M., Bunn, H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95 (14)**: 7987-7992.

- Huber, W., Koella, J. C. (1993). A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites. *Acta Trop* **55 (4)**: 257-261.
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., et al. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* **12 (2)**: 149-162.
- Izumi, H., Takahashi, M., Uramoto, H., Nakayama, Y., Oyama, T., Wang, K. Y., et al. (2011). Monocarboxylate transporters 1 and 4 are involved in the invasion activity of human lung cancer cells. *Cancer Sci* **102 (5)**: 1007-1013.
- Izumi, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., et al. (2003). Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* **29 (6)**: 541-549.
- Jang, S. M., Han, H., Jang, K. S., Jun, Y. J., Jang, S. H., Min, K. W., et al. (2012). The Glycolytic Phenotype is Correlated with Aggressiveness and Poor Prognosis in Invasive Ductal Carcinomas. *J Breast Cancer* **15 (2)**: 172-180.
- Jeong, D., Kim, T. S., Lee, J. W., Kim, K. T., Kim, H. J., Kim, I. H., et al. (2001). Blocking of acidosis-mediated apoptosis by a reduction of lactate dehydrogenase activity through antisense mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun* **289 (5)**: 1141-1149.
- Kallinowski, F., Runkel, S., Fortmeyer, H. P., Forster, H., Vaupel, P. (1987). L-glutamine: a major substrate for tumor cells in vivo? *J Cancer Res Clin Oncol* **113 (3)**: 209-215.
- Kallinowski, F., Zander, R., Hoekel, M., Vaupel, P. (1990). Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized-pO₂-histography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **19 (4)**: 953-961.
- Kannan, K., Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* **7 (3)**: 153-163.
- Kanno, T., Sudo, K., Maekawa, M., Nishimura, Y., Ukita, M., Fukutake, K. (1988). Lactate dehydrogenase M-subunit deficiency: a new type of hereditary exertional myopathy. *Clin Chim Acta* **173 (1)**: 89-98.

- Kim, J. W., Gao, P., Dang, C. V. (2007). Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev* **26 (2)**: 291-298.
- Ko, Y. H., Verhoeven, H. A., Lee, M. J., Corbin, D. J., Vogl, T. J., Pedersen, P. L. (2012). A translational study "case report" on the small molecule "energy blocker" 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: from bench side to bedside. *J Bioenerg Biomembr* **44 (1)**: 163-70.
- Kolstad, P. (1968). Intercapillary distance, oxygen tension and local recurrence in cervix cancer. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **106**: 145-157.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Bougioukas, G., Didilis, V., Gatter, K. C., et al. (2003). Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* **89 (5)**: 877-885.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K. C., Trarbach, T., Folprecht, G., et al. (2011). Prognostic and predictive role of lactate dehydrogenase 5 expression in colorectal cancer patients treated with PTK787/ZK 222584 (vatalanib) antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* **17 (14)**: 4892-4900.
- Krebs, H. A. (1972). The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem* **8**: 1-34.
- Kroemer, G., Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* **13 (6)**: 472-482.
- Kumar, A., Kant, S., Singh, S. M. (2013). Targeting monocarboxylate transporter by alpha-cyano-4-hydroxycinnamate modulates apoptosis and cisplatin resistance of Colo205 cells: implication of altered cell survival regulation. *Apoptosis* **18 (12)**: 1574-1585.
- Kunkel, M., Reichert, T. E., Benz, P., Lehr, H. A., Jeong, J. H., Wieand, S., et al. (2003). Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* **97 (4)**: 1015-1024.
- Le, A., Cooper, C. R., Gouw, A. M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L. M., et al. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress

- and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107 (5)**: 2037-2042.
- Le, A., Lane, A. N., Hamaker, M., Bose, S., Gouw, A., Barbi, J., et al. (2012). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab* **15 (1)**: 110-21.
- Le Floch, R., Chiche, J., Marchiq, I., Naiken, T., Ilc, K., Murray, C. M., et al. (2011). CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 (40)**: 16663-16668.
- Lee, I., Lee, S. J., Kang, W. K., Park, C. (2012). Inhibition of monocarboxylate transporter 2 induces senescence-associated mitochondrial dysfunction and suppresses progression of colorectal malignancies in vivo. *Mol Cancer Ther* **11 (11)**: 2342-2351.
- Li, X., Lu, W., Hu, Y., Wen, S., Qian, C., Wu, W., et al. (2013). Effective inhibition of nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo by targeting glycolysis with oxamate. *Int J Oncol* **43 (5)**: 1710-1718.
- Lim, R., Eaton, A., Lee, N. Y., Setton, J., Ohri, N., Rao, S., et al. (2012). 18F-FDG PET/CT metabolic tumor volume and total lesion glycolysis predict outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Nucl Med* **53 (10)**: 1506-1513.
- Löffler, G., Heinrich, P. C., Petrides, P. E. *Biochemie und Pathobiochemie*. 2007: 358-368, 386-392, 478-487, 490-514, Springer London, Limited.
- Maloney, D. G., Grillo-Lopez, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., et al. (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* **90 (6)**: 2188-2195.
- Markert, C. L., Shaklee, J. B., Whitt, G. S. (1975). Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* **189 (4197)**: 102-114.
- Martinez-Zaguilan, R., Seftor, E. A., Seftor, R. E., Chu, Y. W., Gillies, R. J., Hendrix, M. J. (1996). Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* **14 (2)**: 176-186.

- Matoba, S., Kang, J. G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., et al. (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* **312 (5780)**: 1650-1653.
- Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q. L., Tsien, R. Y., Reed, J. C. (2000). Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* **2 (6)**: 318-325.
- Mattiazzi, M., Vijayvergiya, C., Gajewski, C. D., DeVivo, D. C., Lenaz, G., Wiedmann, M., et al. (2004). The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum Mol Genet* **13 (8)**: 869-879.
- Mochiki, E., Kuwano, H., Katoh, H., Asao, T., Oriuchi, N., Endo, K. (2004). Evaluation of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography for gastric cancer. *World J Surg* **28 (3)**: 247-253.
- Morris, M. E., Felmler, M. A. (2008). Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid. *Aaps j* **10 (2)**: 311-321.
- Novoa, W. B., Winer, A. D., Glaid, A. J., Schwert, G. W. (1959). Lactic dehydrogenase-V Inhibition by oxamate and by oxalate. *J Biol Chem* **234 (5)**: 1143-1148.
- Pasteur, L. (1861). Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygene libre et determinant des fermentations. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **52**: 344-347.
- Pedersen, P. L. (1978). Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res* **22**: 190-274.
- Pfeiffer, T., Schuster, S., Bonhoeffer, S. (2001). Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* **292 (5516)**: 504-507.
- Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Scapulatempo, C., Ferreira, L., Martins, S., Pellerin, L., et al. (2008). Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch* **452 (2)**: 139-146.

- Pinheiro, C., Reis, R. M., Ricardo, S., Longatto-Filho, A., Schmitt, F., Baltazar, F. (2010). Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44. *J Biomed Biotechnol* **2010**: 1-7.
- Polyak, K., Li, Y., Zhu, H., Lengauer, C., Willson, J. K., Markowitz, S. D., et al. (1998). Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* **20 (3)**: 291-293.
- Porporato, P. E., Dadhich, R. K., Dhup, S., Copetti, T., Sonveaux, P. (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology* **2**: 1-18.
- Pox, C. P., Schmiegell, W. (2013). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **138 (49)**: 2545-2545.
- Poyton, R. O., Ball, K. A., Castello, P. R. (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol Metab* **20 (7)**: 332-340.
- Pugh, C. W., O'Rourke, J. F., Nagao, M., Gleadle, J. M., Ratcliffe, P. J. (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* **272 (17)**: 11205-11214.
- Quennet, V., Yaromina, A., Zips, D., Rosner, A., Walenta, S., Baumann, M., et al. (2006). Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother Oncol* **81 (2)**: 130-135.
- Racker, E. (1974). History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol Cell Biochem* **5 (1-2)**: 17-23.
- Rajendran, J. G., Mankoff, D. A., O'Sullivan, F., Peterson, L. M., Schwartz, D. L., Conrad, E. U., et al. (2004). Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res* **10 (7)**: 2245-2252.
- Ramanathan, A., Wang, C., Schreiber, S. L. (2005). Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102 (17)**: 5992-5997.

- Rancea, M., Engert, A., Tresckow, B. v., Halbsguth, T., Behringer, K., Skoetz, N. (2013). Hodgkin-Lymphom beim erwachsenen Patienten: Diagnostik, Therapie und Nachsorge. *Deutsches Ärzteblatt International* **110 (11)**: 177-183.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. *Biochemie*. 2006: 74-84, 103-122, 164-182, 184-187, 234-239. Stuttgart, Thieme.
- Reitzer, L. J., Wice, B. M., Kennell, D. (1979). Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* **254 (8)**: 2669-2676.
- Rohwer, N., Dame, C., Haugstetter, A., Wiedenmann, B., Detjen, K., Schmitt, C. A., et al. (2010). Hypoxia-inducible factor 1alpha determines gastric cancer chemosensitivity via modulation of p53 and NF-kappaB. *PLoS One* **5 (8)**: e12038.
- Ryan, H. E., Lo, J., Johnson, R. S. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo j* **17 (11)**: 3005-3015.
- Ryder, C., McColl, K., Zhong, F., Distelhorst, C. W. (2012). Acidosis promotes Bcl-2 family-mediated evasion of apoptosis: involvement of acid-sensing G protein-coupled receptor Gpr65 signaling to Mek/Erk. *J Biol Chem* **287 (33)**: 27863-27875.
- Sakamoto, T., Niiya, D., Seiki, M. (2011). Targeting the Warburg effect that arises in tumor cells expressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* **286 (16)**: 14691-14704.
- Sakashita, M., Aoyama, N., Minami, R., Maekawa, S., Kuroda, K., Shirasaka, D., et al. (2001). Glut1 expression in T1 and T2 stage colorectal carcinomas: its relationship to clinicopathological features. *Eur J Cancer* **37 (2)**: 204-209.
- Sakata, K., Kwok, T. T., Murphy, B. J., Laderoute, K. R., Gordon, G. R., Sutherland, R. M. (1991). Hypoxia-induced drug resistance: comparison to P-glycoprotein-associated drug resistance. *Br J Cancer* **64 (5)**: 809-814.

- Sattler, U. G., Meyer, S. S., Quennet, V., Hoerner, C., Knoerzer, H., Fabian, C., et al. (2010). Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother Oncol* **94** (1): 102-109.
- Schlappack, O. K., Zimmermann, A., Hill, R. P. (1991). Glucose starvation and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumour cells. *Br J Cancer* **64** (4): 663-670.
- Semaan, A., Munkarah, A. R., Arabi, H., Bandyopadhyay, S., Seward, S., Kumar, S., et al. (2011). Expression of GLUT-1 in epithelial ovarian carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, angiogenesis, survival and ability to predict optimal cytoreduction. *Gynecol Oncol* **121** (1): 181-186.
- Semenza, G. L., Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12** (12): 5447-5454.
- Šerák, L., Jelínek, R., Hauser, V. (1987). Electrochemical method for the assessment of oxygen consumption in biological objects with an uneven distribution of respiration centres. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **226** (1-2): 193-198.
- Sheng, S. L., Liu, J. J., Dai, Y. H., Sun, X. G., Xiong, X. P., Huang, G. (2012). Knockdown of lactate dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Febs j* **279** (20): 3898-3910.
- Solaini, G., Sgarbi, G., Baracca, A. (2011). Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1807** (6): 534-542.
- Sonveaux, P., Vegran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., et al. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* **118** (12): 3930-3942.
- Strese, S., Fryknas, M., Larsson, R., Gullbo, J. (2013). Effects of hypoxia on human cancer cell line chemosensitivity. *BMC Cancer* **13** (331).

- Sudo, K., Maekawa, M., Kanno, T., Li, S. S., Akizuki, S., Magara, T. (1994). Premature termination mutations in two patients with deficiency of lactate dehydrogenase H(B) subunit. *Clin Chem* **40 (8)**: 1567-1570.
- Sung, J. Y., Kim, G. Y., Lim, S. J., Park, Y. K., Kim, Y. W. (2010). Expression of the GLUT1 glucose transporter and p53 in carcinomas of the pancreatobiliary tract. *Pathol Res Pract* **206 (1)**: 24-29.
- Talks, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., et al. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* **157 (2)**: 411-421.
- Teicher, B. A., Holden, S. A., al-Achi, A., Herman, T. S. (1990). Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSaII murine fibrosarcoma. *Cancer Res* **50 (11)**: 3339-3344.
- Thornburg, J. M., Nelson, K. K., Clem, B. F., Lane, A. N., Arumugam, S., Simmons, A., et al. (2008). Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res* **10 (5)**: 84ff.
- Tian, H., McKnight, S. L., Russell, D. W. (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* **11 (1)**: 72-82.
- Ullah, M. S., Davies, A. J., Halestrap, A. P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem* **281 (14)**: 9030-9037.
- van den Berg, A. P., Wike-Hooley, J. L., van den Berg-Blok, A. E., van der Zee, J., Reinhold, H. S. (1982). Tumour pH in human mammary carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* **18 (5)**: 457-462.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324 (5930)**: 1029-1033.
- Vaupel, P. (1992). Physiological properties of malignant tumours. *NMR Biomed* **5 (5)**: 220-225.

- Vaupel, P., Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* **26 (2)**: 225-239.
- Vaupel, P., Schlenger, K., Knoop, C., Hockel, M. (1991). Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* **51 (12)**: 3316-3322.
- Vegran, F., Boidot, R., Michiels, C., Sonveaux, P., Feron, O. (2011). Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res* **71 (7)**: 2550-2560.
- Waddell, T. G., Repovic, P., Meléndez-Hevia, E., Heinrich, R., Montero, F. (1999). Optimization of glycolysis: New discussions. *Biochemical Education* **27 (1)**: 12-13.
- Walenta, S., Salameh, A., Lyng, H., Evensen, J. F., Mitze, M., Rofstad, E. K., et al. (1997). Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol* **150 (2)**: 409-415.
- Walenta, S., Wetterling, M., Lehrke, M., Schwickert, G., Sundfor, K., Rofstad, E. K., et al. (2000). High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* **60 (4)**: 916-921.
- Warburg, O. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* **12 (50)**: 1131-1137.
- Warburg, O., Minami, S. (1923). Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. *Klin Wochenschr* **2 (17)**: 776-777.
- Weinberg, F., Chandel, N. S. (2009). Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann N Y Acad Sci* **1177**: 66-73.
- Westerterp, M., Sloof, G. W., Hoekstra, O. S., Ten Kate, F. J., Meijer, G. A., Reitsma, J. B., et al. (2008). 18FDG uptake in oesophageal adenocarcinoma: linking biology and outcome. *J Cancer Res Clin Oncol* **134 (2)**: 227-236.

- Wu, C.-C., Luk, H.-N., Lin, Y.-T. T., Yuan, C.-Y. (2010). A Clark-type oxygen chip for in situ estimation of the respiratory activity of adhering cells. *Talanta* **81 (1–2)**: 228-234.
- Wu, H., Ding, Z., Hu, D., Sun, F., Dai, C., Xie, J., et al. (2012). Central role of lactic acidosis in cancer cell resistance to glucose deprivation-induced cell death. *J Pathol* **227 (2)**: 189-199.
- Yeh, J. J., Lunetta, K. L., van Orsouw, N. J., Moore, F. D., Jr., Mutter, G. L., Vijg, J., et al. (2000). Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. *Oncogene* **19 (16)**: 2060-2066.
- Zhai, X., Yang, Y., Wan, J., Zhu, R., Wu, Y. (2013). Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Rep* **30 (6)**: 2983-2991.
- Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., et al. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* **59 (22)**: 5830-5835.
- Zhou, M., Zhao, Y., Ding, Y., Liu, H., Liu, Z., Fodstad, O., et al. (2010). Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Mol Cancer* **9**: 33.

10 Appendix

10.1 Standardkurven

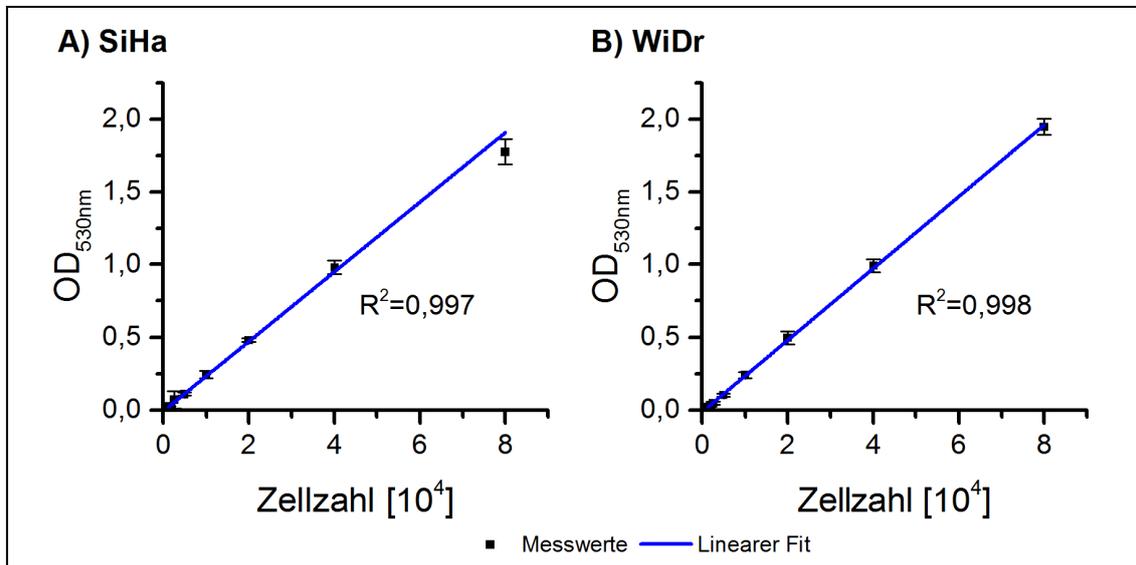


Abbildung 10.1: Standardkurven zum Kristallviolett-Assay. Von beiden Zelllinien wurden Verdünnungsreihen mit 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 x 10^4 Zellen in einer 96-Well-Platte erstellt. Nach 1 Stunde und mikroskopischer Kontrolle der Adhärenz wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die Optische Dichte (OD) bestimmt (s. auch Material und Methoden).

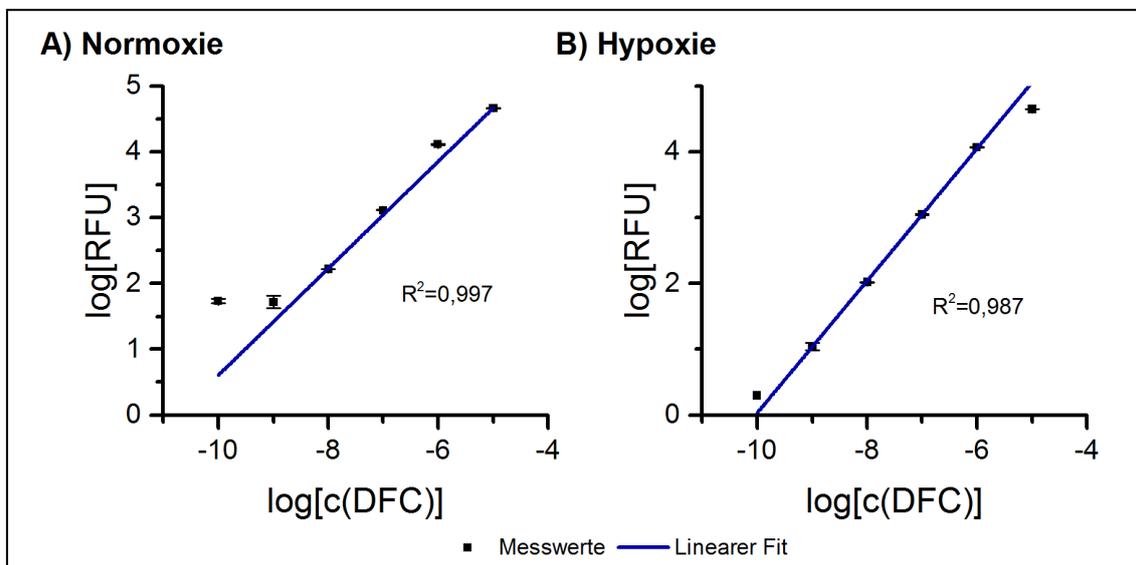


Abbildung 10.2: Standardkurve mit dem Fluoreszenzmarker DCF. Jeweils 1×10^4 Zellen wurden mit 10^{-10} bis 10^{-5} mol/L mit DCFH-DA für eine Stunde inkubiert (s. Material und Methoden). Alle Proben wurden analog zu den Versuchen unter Normoxie (21 % Sauerstoff) und Hypoxie (1 % Sauerstoff) gelagert und im Anschluss ausgewertet.

10.2 Messungen zur Respirationsrate

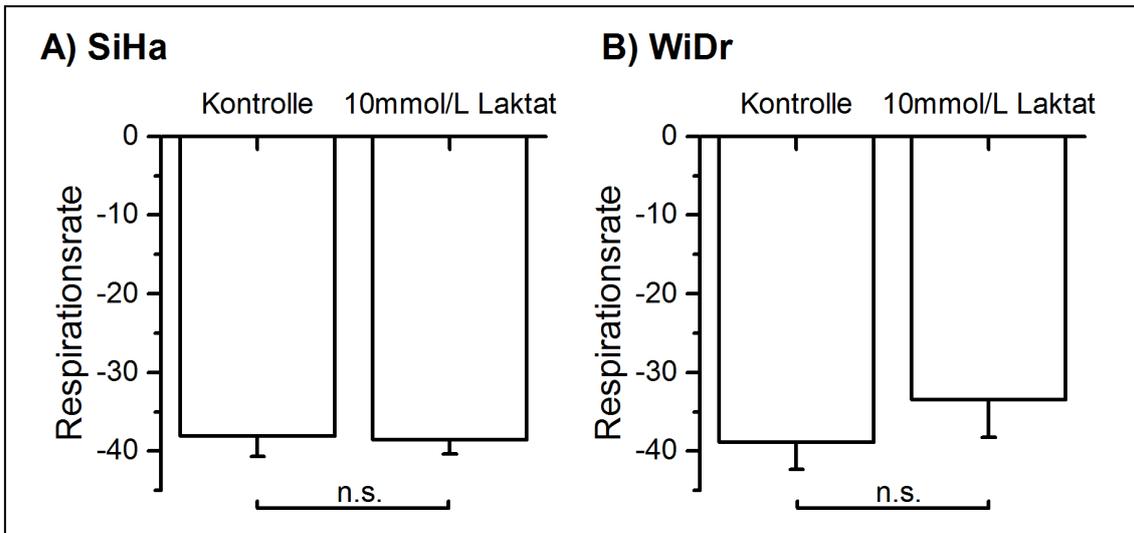


Abbildung 10.3: Einfluss von exogenem Laktat auf die Respirationsrate von SiHa und WiDr. Dargestellt ist die Änderung der Sauerstoffkonzentration in nmol O₂ pro Minute in Medium ohne Glukose mit 10 mmol/L exogenem Laktat. Alle Messungen stammen aus 2 unabhängigen Versuchen mit insgesamt 6 – 7 Einzelmessungen mit jeweils 1 x 10⁷ Zellen. Die Zugabe von 10 mmol/L Laktat in glukosefreies Medium führte zu keiner Erhöhung der Respirationsrate. Mann-Whitney-U-Test. * p < 0,05, n.s. = nicht signifikant.

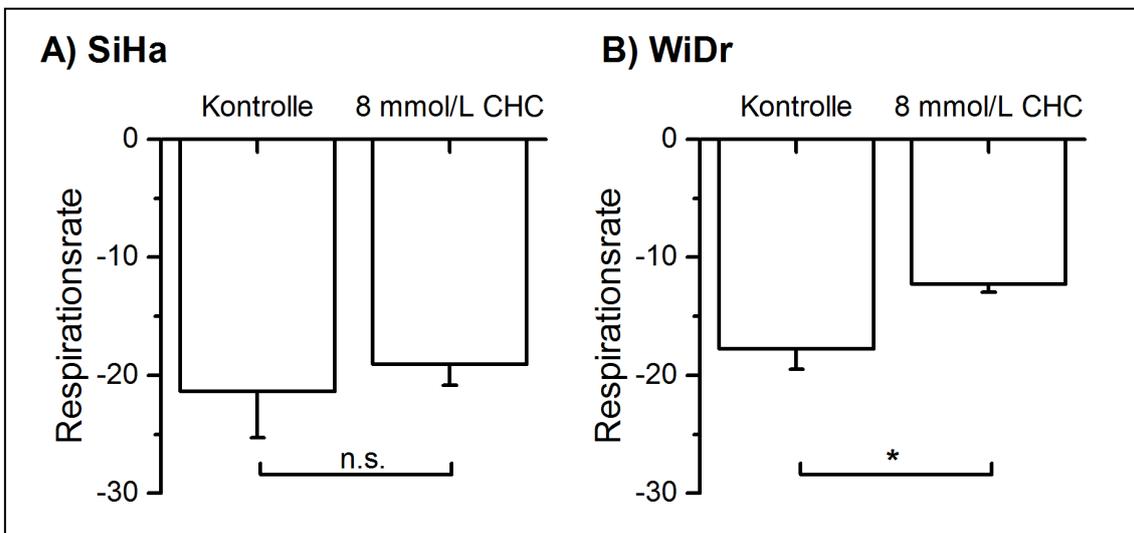


Abbildung 10.4: Einfluss der MCT-Inhibition auf die Zellatmung (Respiration) von SiHa und WiDr. Dargestellt ist die Änderung der Sauerstoffkonzentration in nmol O₂ pro Minute in DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose und 8 mmol/L CHC. Kontrollen waren DMEM-Medium ohne Inhibitor. Alle Messungen stammen aus 2 unabhängigen Versuchsserien mit insgesamt 3 - 4 Einzelmessungen für jeweils 5 x 10⁶ Zellen. MCT-Inhibition führt zu einer Verminderung der Respiration von WiDr. * p < 0,05, n.s. = nicht signifikant.

10.3 Messungen zur Induktion von Apoptose (Caspase-Aktivierung)

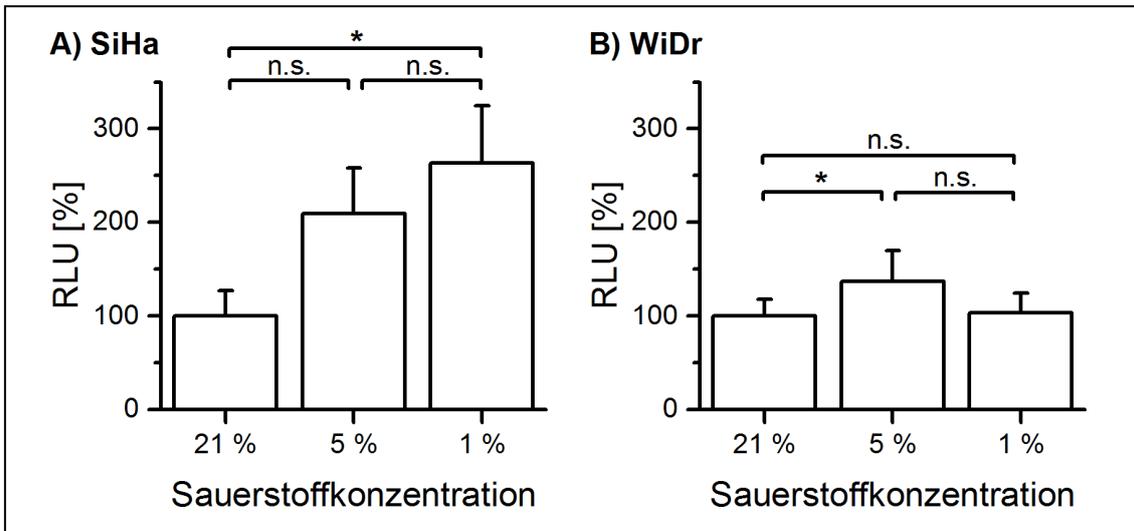


Abbildung 10.5: Nachweis der Caspase-Aktivität bei SiHa und WiDr. Die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 wurde nach 24 stündiger Inkubation bei 21 %, 5 % sowie 1 % Sauerstoff mit dem fluoreszenzbasierten Caspase-Glo[®]-3/7-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=2$ unabhängigen Versuchsserien mit jeweils 3 Parallelwerten für jeweils 10^4 Zellen dargestellt. Alle Werte sind auf die Caspase-Aktivität bei 21 % Sauerstoff bezogen. Die Zellzahl wurde parallel mit einem Kristallviolett-Assays bestimmt (Abb. 10.1). RLU: relative fluorescence unit. Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration induzierte bei SiHa, nicht bei WiDr, die Aktivierung der Caspasen 3/7. Kruskal-Wallis-Test (Dunn's Multiple Comparison post-hoc Test). * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

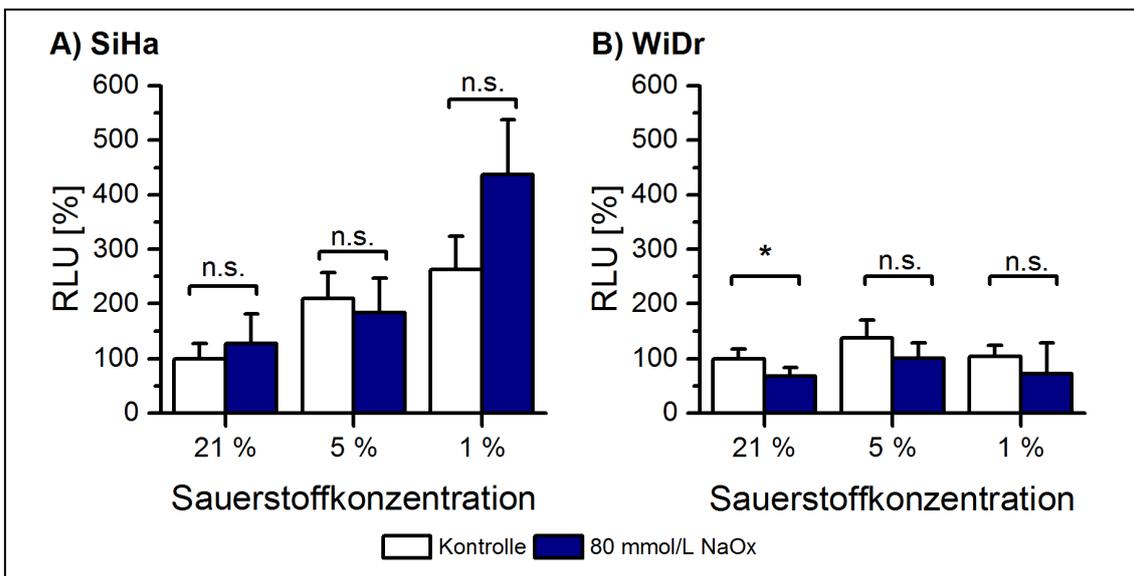


Abbildung 10.6: Die Hemmung der LDH löst keine Aktivierung von Caspasen aus. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=2$ unabhängigen Versuchsserien mit 3 Parallelwerten für jeweils 10^4 Zellen. Alle Werte wurden auf die Caspase-Aktivität bei 21 % Sauerstoff bezogen. Für weitere Informationen siehe Abb. 10.5. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

10.4 Messungen zum Glukoseverbrauch und zur Laktatbildung

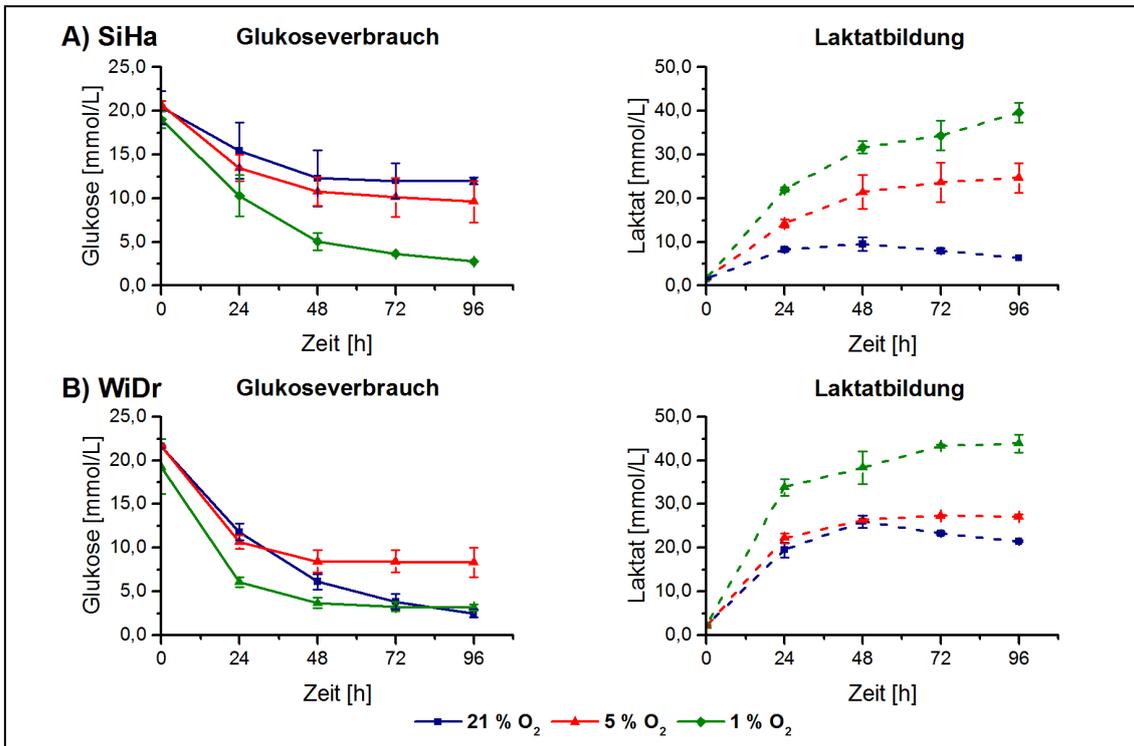


Abbildung 10.7: Glukoseverbrauch und Laktatbildung von SiHa (A) und WiDr (B). Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet. Die Änderungen in der Konzentration von Glukose und Laktat in den Zellkulturüberständen sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=2 unabhängigen Versuchsserien. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

In Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt steigt der Verbrauch an Glukose und die Bildung von Laktat. Nach diesen Ergebnissen weist WiDr einen tendenziell stärkeren Verbrauch an Glukose bei 21 % Sauerstoff auf. Siehe auch Abb. 4.4 und Tab. 4.1.

10.5 Messungen zur Verwertung von Laktat durch SiHa und WiDr

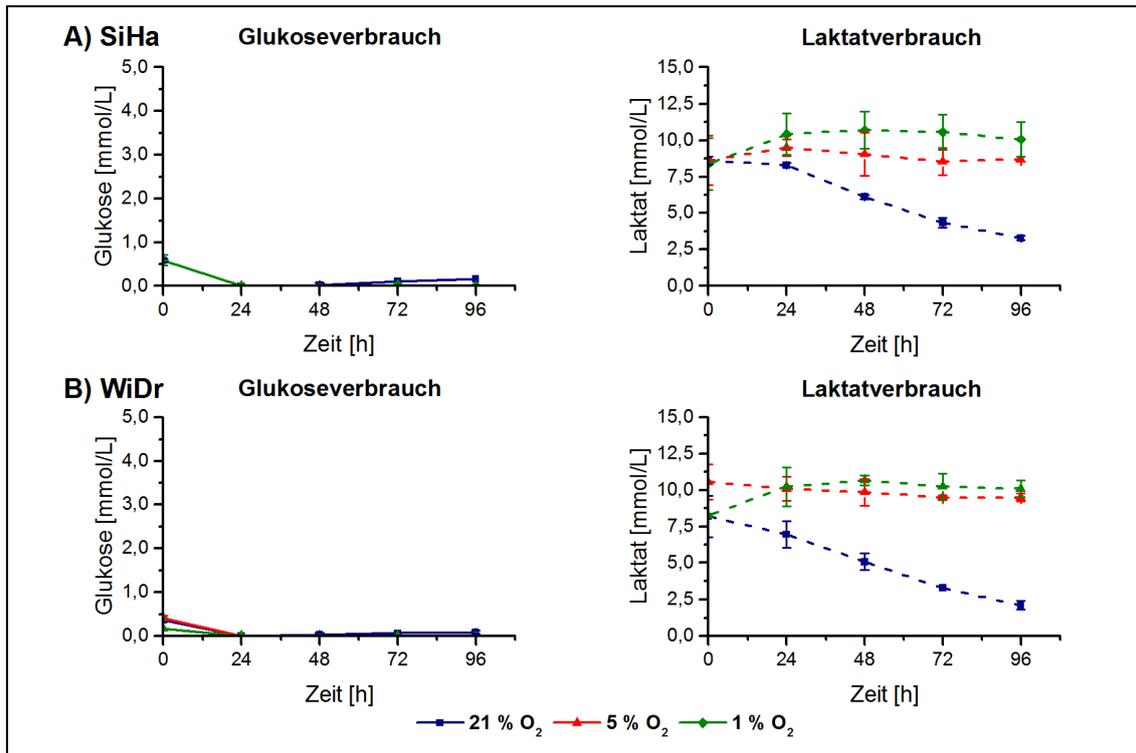


Abbildung 10.8: SiHa (A) und WiDr (B) verwenden exogenes Laktat. Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von Glukose-freiem DMEM-Medium mit 10 mmol/L exogenem Laktat gestartet. Die Änderungen in der Konzentration von Glukose und Laktat in den Zellkulturüberständen sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=2 unabhängigen Versuchsserien. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

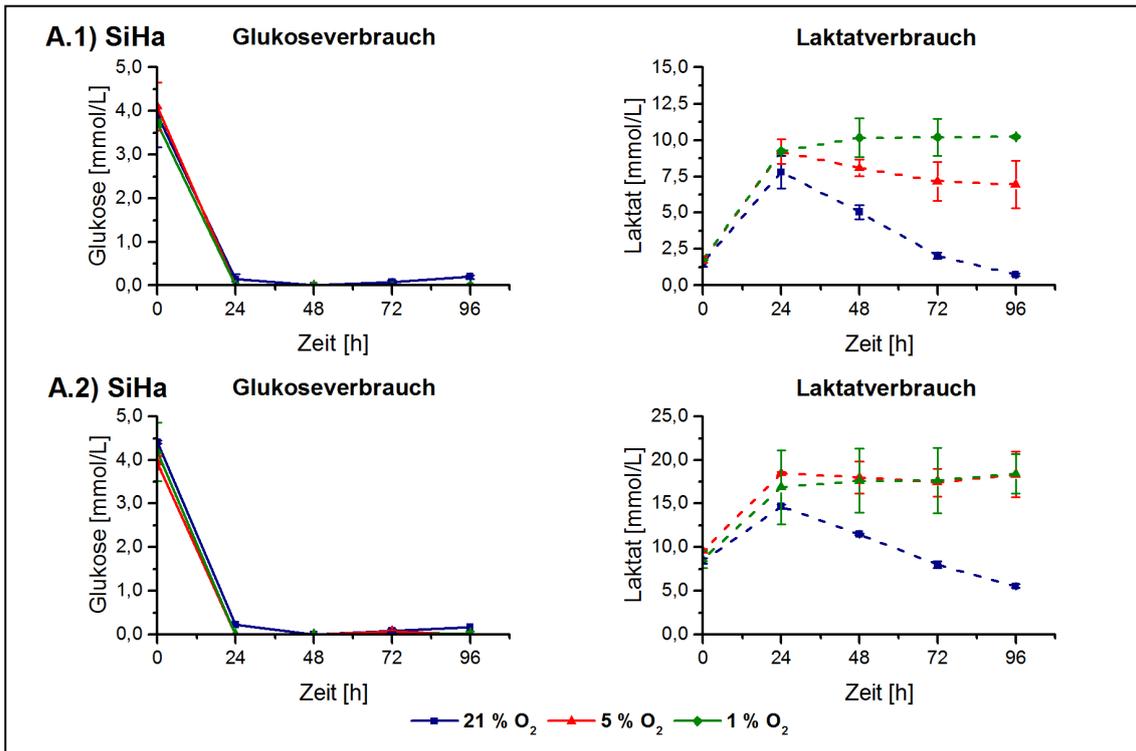


Abbildung 10.9: Laktatverbrauch von SiHa bei begrenzter Glukoseversorgung (5 mmol/L). Versuchsbedingungen: ohne (A.1) und mit (A.2) 10 mmol/L exogenem Laktat. Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 5 mmol/L Glukose gestartet. Die Änderungen in der Konzentration von Glukose und Laktat in den Zellkulturüberständen sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=2$ unabhängigen Versuchsserien. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

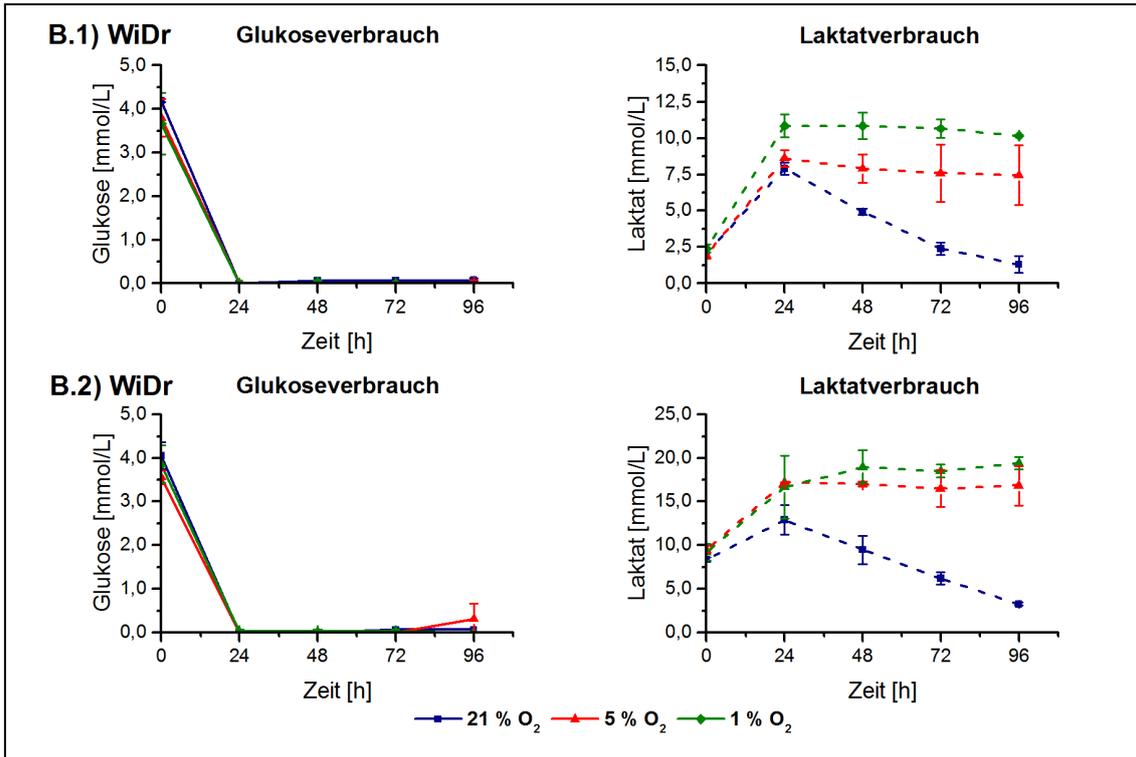


Abbildung 10.10: Laktatverbrauch von WiDr bei begrenzter Glukoseversorgung (5 mmol/L). Versuchsbedingungen: ohne (A.1) und mit (A.2) 10 mmol/L exogenem Laktat. Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 5 mmol/L Glukose gestartet. Die Änderungen in der Konzentration von Glukose und Laktat in den Zellkulturüberständen sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=2$ unabhängigen Versuchsserien. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

10.6 Messungen zur Verwertung von Laktat durch SiHa und WiDr bei MCT-Hemmung

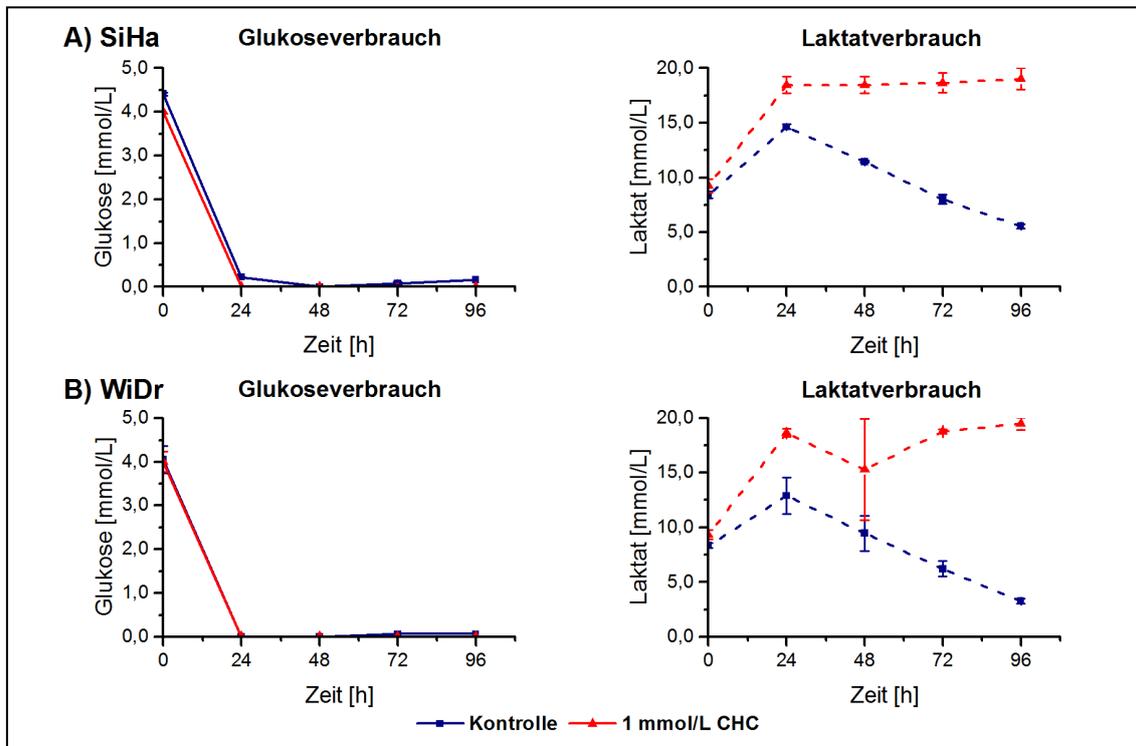


Abbildung 10.11: Die CHC-vermittelte Hemmung von MCT verhindert den Verbrauch von exogenem Laktat. Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde Zugabe von DMEM-Medium mit 10 mmol/L exogenem Laktat gestartet. Die Monocarboxylat-Transporter (MCT) wurden mit **1 mmol/L CHC** gehemmt. Die Änderungen in der Konzentration von Glukose und Laktat in den Zellkulturüberständen sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=2 unabhängigen Versuchsserien. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

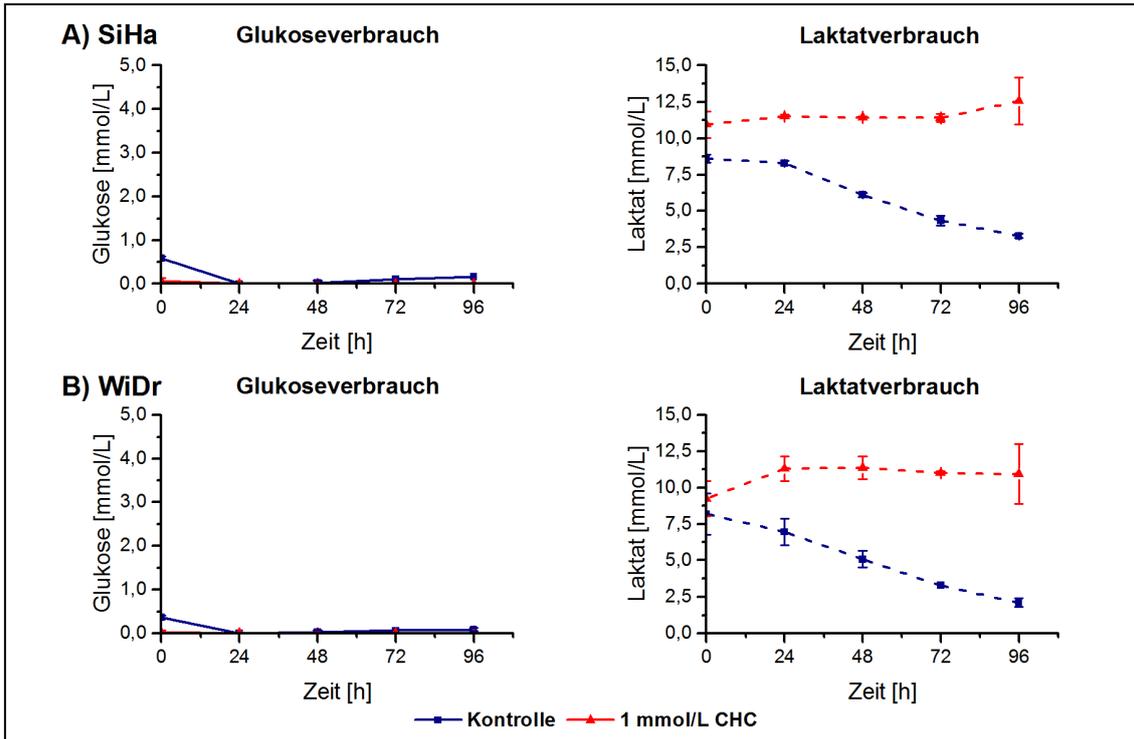


Abbildung 10.12: Die CHC-vermittelte Hemmung von MCT verhindert den Verbrauch von exogenem Laktat durch SiHa (A) und WiDr (B). Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 5 mmol/L Glukose und 10 mmol/L exogenem Laktat gestartet. Die Hemmung der Monocarboxylat-Transporter (MCT) erfolgte mit 1 mmol/L CHC. Die Änderungen in der Konzentration von Glukose und Laktat in den Zellkulturüberständen sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von n=2 unabhängigen Versuchsserien. Auf eine statistische Auswertung wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs verzichtet.

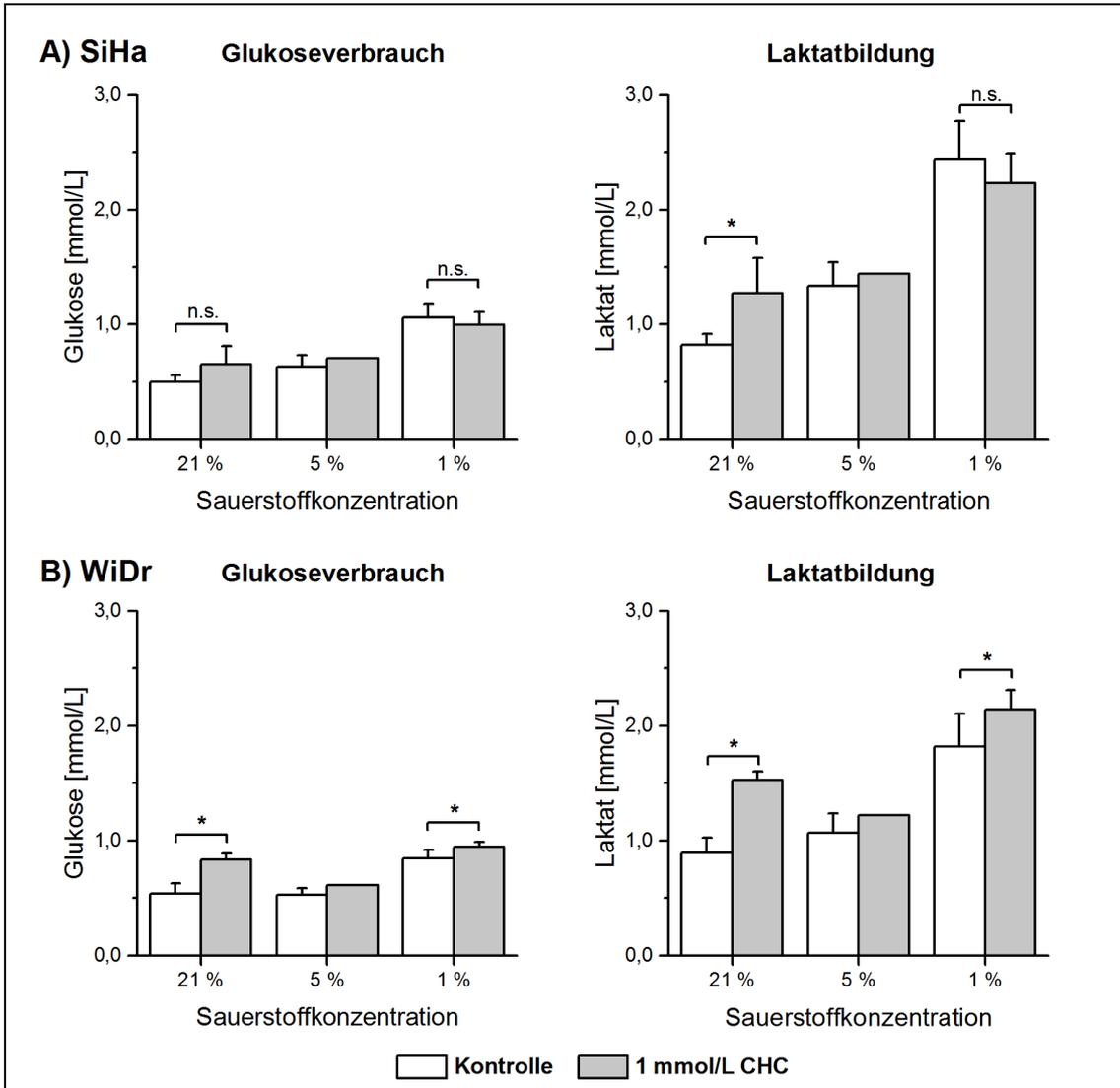


Abbildung 10.13: Die CHC-vermittelte Hemmung von MCT führt zu Änderungen bei der Konzentration von Glukose und Laktat in Zellkulturüberständen von SiHa (A) und WiDr (B). Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet. Je nach Versuchsgruppe wurde das Medium mit 1 mmol/L CHC versetzt. Die Konzentrationsänderungen von Glukose und Laktat in den Zellkulturüberständen sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=4$ unabhängigen Versuchsserien. Die Werte für 5 % Sauerstoff basieren auf einer Einzelmessung. Die Werte sind auf 1×10^6 Zellen umgerechnet, die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

10.7 Messungen zur Verwertung von Laktat durch SiHa und WiDr bei LDH-Hemmung

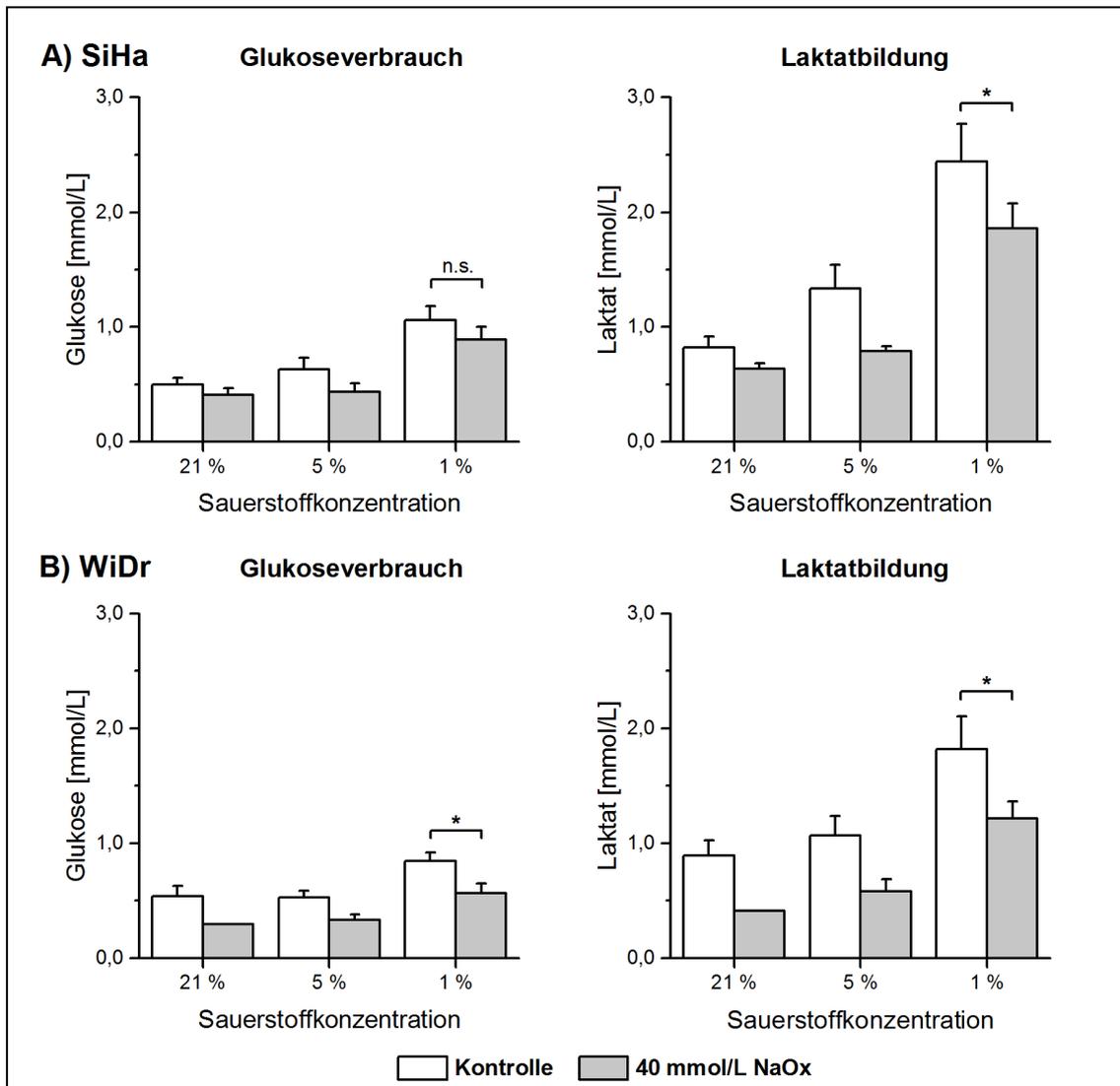


Abbildung 10.14: Die Natriumoxamat-vermittelte Hemmung von LDH führt zu Konzentrationsänderungen bei Glukose und Laktat in Zellkulturüberständen von SiHa (A) und WiDr (B). Bei Versuchsbeginn waren alle Kulturen zu ca. 80 % konfluent. Der Versuch wurde durch Zugabe von DMEM-Medium mit 25 mmol/L Glukose gestartet. Je nach Versuchsgruppe wurde das Medium mit **40 mmol/L** Natriumoxamat (NaOx) versetzt. Die Konzentrationsänderungen in Zellkulturüberständen sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung von Glukose und Laktat innerhalb von 24 Stunden für 1×10^6 Zellen von $n=3$ unabhängigen Einzelbestimmungen für 1 % Sauerstoff. Die Werte bei 21 % und 5 % Sauerstoff basieren auf $n=1-2$ unabhängigen Versuchsserien, so dass aufgrund des geringen Probenumfangs auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde. Mann-Whitney-U-Test. * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

10.8 Nachweis der Expression von MCT und LDH

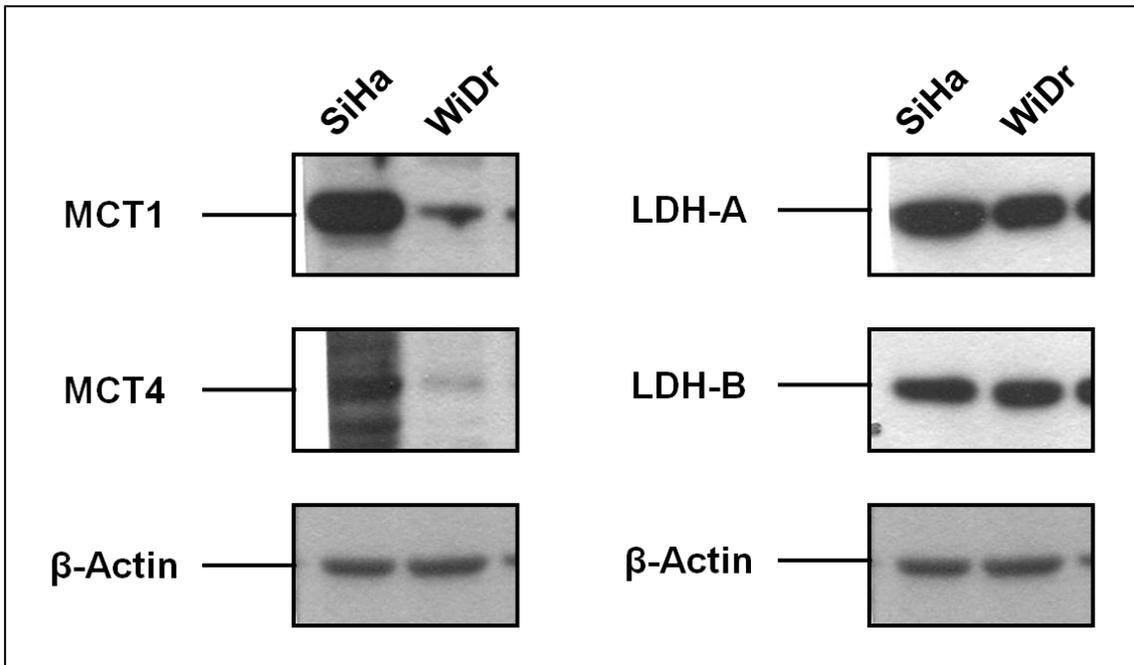


Abbildung 10.15: Nachweis der Expression von MCT und LDH bei SiHa und WiDr durch Western Blot-Analysen. Beide Targetstrukturen und ihre Isoformen wurden in beiden Tumorzelllinien erfolgreich nachgewiesen. Siehe auch Abb. 4.7.

10.9 Konzept zur Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch die CHC-vermittelte Inhibition von Monocarboxylat-Transporter (MCT)

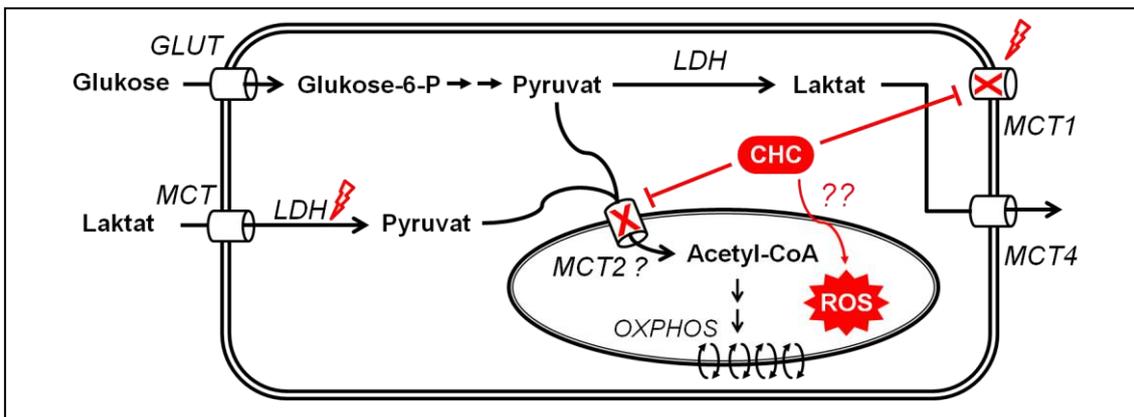


Abbildung 10.16: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Hemmung des Monocarboxylat-Transporters 2 (MCT2). Untersuchungen von Lee et al. deuten darauf hin, dass die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch die Hemmung von MCT2 verursacht wird, der in der mitochondrialen Membran lokalisiert ist und die Aufnahme von Pyruvat vermittelt. Der genaue Mechanismus zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ist noch nicht vollständig verstanden. Eigener Entwurf basierend auf Ergebnissen dieser Arbeit und Lee I et al., 2012.

Aktuelle Daten (Lee I et al., 2012) lassen den Schluss zu, dass durch CHC auch MCT2 gehemmt wird und dass dies als Ursache für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu werten ist (s. auch Kapitel 6.2).

10.10 Ergänzung zu Abb. 6.1

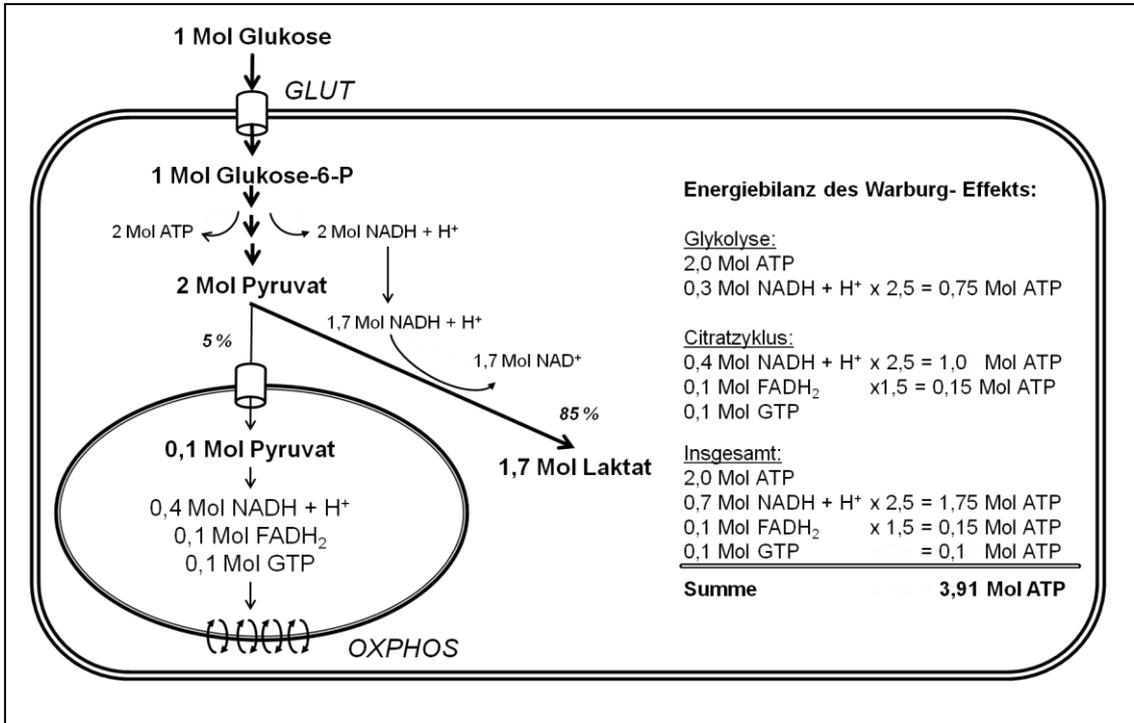


Abbildung 10.17: Die Energiebilanz des Warburg-Effekts. Vander Heiden et al. postulieren, dass Tumorzellen im Rahmen der Glykolyse gebildetes Pyruvat zu 85 % zu Laktat spalten. Dies bedeutet, dass aus einem Mol Glukose ca. 1,7 Mol Laktat gebildet werden. Im Rahmen der Milchsäuregärung werden 1,7 Mol NADH + H⁺ zu NAD⁺ oxidiert. Nur circa 5 % des gebildeten Pyruvat, also ca. 0,1 Mol Pyruvat pro Mol Glukose, werden dem oxidativen Stoffwechsel in den Mitochondrien zugeführt. Im Citratzyklus entstehen somit 0,4 Mol NADH + H⁺, 0,1 Mol FADH₂ und 0,1 Mol GTP. Zusätzlich entstehen im Rahmen der Glykolyse 2 Mol ATP sowie abzüglich der NAD⁺-Regeneration während der Laktatgärung 0,3 Mol NADH + H⁺. Die gebildeten Reduktionsäquivalente NADH + H⁺ sowie FADH₂ können dann wie in Kapitel 1.2.3 ausführlich erläutert zur Energiegewinnung im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung zur ATP-Gewinnung genutzt wird. Insgesamt entstehen im Rahmen des Warburg-Effekts pro Mol Glukose ca. 3,91 Mol ATP und damit fast doppelt so viel ATP wie bei der anaeroben Glykolyse. Eigene stöchiometrische Berechnungen auf der Basis der Publikation von Vander Heiden et al., 2009.

Eigene Publikationen

Publikation:

Otto C, Klingelhöffer C, **Biggemann L**, Melkus G, Mörchel P, Jürgens C, Gahn S, Kämmerer U. Untersuchungen zur Verstoffwechslung von Ketonkörpern und Laktat durch Tumorzellen des Gastrointestinaltrakts. *Aktuelle Ernährungsmed* 2014; 39: 51-59.

Vorträge:

Biggemann L, Jürgens C, Gahn S, Mühling B, Klingelhöffer C, Germer CT, Kämmerer U, Otto C. Studies on the anticancer potential of target structures in the lactate metabolism of tumour cells. *16. Chirurgische Forschungstage, Regensburg 2012*

Posterpräsentationen:

Biggemann L, Jürgens C, Gahn S, Mühling B, Klingelhöffer C, Germer CT, Kämmerer U, Otto C. The Warburg effect: Tumour cell-produced lactate becomes an important substrate under glucose starvation. *15. Chirurgische Forschungstage, Dresden 2011*

Biggemann L, Jürgens C, Gahn S, Mühling B, Klingelhöffer C, Germer CT, Kämmerer U, Otto C. Untersuchungen zum antikanzerogenen Potential von Targetstrukturen im Laktatstoffwechsel von Tumorzellen. *89. Bayerischer Chirurgenkongress, Regensburg 2012*

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. C.-T. Germer, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Experimentellen Chirurgie danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Otto für die freundliche Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung während der gesamten Bearbeitungszeit dieser Arbeit. In zahlreichen konstruktiven Diskussionen konnte ich wertvolle Erkenntnisse über die Herangehensweise und Lösung wissenschaftlicher Problemstellungen gewinnen. Seine hervorragende Anleitung und ausgezeichnete Unterstützung haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Den Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie danke ich insbesondere für die tatkräftige Unterstützung während meiner Laborzeit. Für zahlreiche Hilfestellungen und die angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner praktischen Versuche danke ich insbesondere Frau S. Gahn, Frau M. Koospal, Frau B. Mühling und Frau M. Schneider.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. rer. hum. biol. U. Kämmerer, Leiterin des Forschungsbereichs der Frauenklinik des Universitätsklinikum Würzburg, für die Nutzung des Hypoxie-Arbeitsplatzes sowie Frau M. Kapp für die zahlreichen Tipps und praktischen Ratschläge während der Hypoxie-Versuche.

Frau Dr. med. S. Sommer möchte ich für die Anleitung und Hilfe bei meinen Versuchen mit der Clark-Elektrode im Labor der Klinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie danken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich nicht nur während meiner Promotion, sondern während meines gesamten Studiums stets uneingeschränkt unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Lorenz Johannes Biggemann
Geburtsdatum/-ort	12.02.1988 in Neuss

Ausbildung

seit 09/2014	Assistenzarzt am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Universitätsmedizin Göttingen
05/2014	Approbation als Arzt
10/2007-05/2014	Studium der Humanmedizin Julius-Maximilians-Universität Würzburg Abschluss: Staatsexamen

Praktisches Jahr

09/2013 – 01/2014	Radiologie, Universitätsklinikum Würzburg
06/2013 – 09/2013	Innere Medizin, Missionsärztliche Klinik Würzburg
02/2013 – 06/2013	Chirurgie, Missionsärztliche Klinik Würzburg

Promotion

02/2011-12/2014	Promotion in der experimentellen Chirurgie der Chirurgischen Klinik I bei Herrn Prof. Dr. rer.-nat. C. Otto: <i>„Untersuchungen zum antikanzerogenen Potenzial von Targetstrukturen im Stoffwechsel von Tumorzellen“</i>
-----------------	---

Schulbildung

1998 – 2007	Heinrich-Heine-Gymnasium, Mettmann
-------------	------------------------------------