

Identifizierung und Testung spezifischer Inhibitoren des Energiestoffwechsels von Tumorzellen



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nadja Pfetzer

aus

Sinsheim

Würzburg 2011

Eingereicht am: _____

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Dandekar

1. Gutachterin: Prof. Dr. Kämmerer

2. Gutachter: Prof. Dr. Benz

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Erklärung gemäß § 4, Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 15. März 1999:

Hiermit erkläre ich, Nadja Pfetzer, geboren am 03.05.1979 in Sinsheim, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat, und ich bisher keine akademischen Grade, außer dem Titel Diplom-Molekularmedizinerin, erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 27. Juni 2011

Nadja Pfetzer

Für meine Eltern

Der Langsamste, der sein Ziel nicht aus den Augen verliert,
geht noch immer geschwinder als jener,
der ohne Ziel umherirrt.

Gotthold Ephraim Lessing

Abkürzungen	1
1. Einleitung	5
1.1 Tumorentstehung und Problematik der bisherigen Therapie	5
1.2 Stoffwechsel in Tumorzellen.....	6
1.2.1 Besonderheiten des Tumorstoffwechsels - der Warburg-Effekt	7
1.2.2 Glykolyse und oxidative Phosphorylierung in Tumorzellen	11
1.2.3 Ursachen/Mechanismen der aeroben Glykolyse in Tumorzellen	12
1.2.4 Bedeutung von Glutamin für Tumorzellen.....	21
1.2.5 Milchsäure.....	22
1.2.6 Schutz vor reaktiven Sauerstoffradikalen	24
1.2.7 Der besondere Tumorstoffwechsel als Therapieoption	24
1.3 Ziele dieser Arbeit.....	25
1.4 Verwendete Substanzen	26
1.4.1 Glykolyseinhibitoren	26
1.4.2 Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen	32
1.4.3 Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen	39
1.4.4 Kombination verschiedener Substanzen	45
1.5 Vergleich verschiedener Vitalitätstests	47
1.6 Berechnung von Hemmkonzentrationen (<i>Inhibitory Concentration, IC</i>).....	53
1.7 Quantifizierung der Milchsäureproduktion von malignen und benignen Zellen im Zellkulturüberstand nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen	56
1.8 Charakterisierung der verwendeten malignen und benignen Zellen.....	57
1.8.1 Quantifizierung der Glucoseaufnahme.....	57
1.8.2 Immunhistochemische Charakterisierung	57
1.8.3 Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die Expression von Transkriptionsfaktoren, Stoffwechseltransporter und Enzymen.....	61
2 Material	64
2.1 Chemikalien.....	64
2.2 Größenstandards.....	67
2.3 Antikörper	68
2.4 Primer für PCR	70
2.5 Laborgeräte	71

2.6	Verbrauchsmaterialien.....	72
2.7	Software	74
2.8	Kits	74
2.9	Medien, Puffer, Lösungen	75
2.9.1	Medien für Zellkultur.....	75
2.9.2	Puffer und Lösungen.....	77
2.10	Zelllinien	80
2.11	Primäre Zellen	82
2.12	Verwendete Substanzen	83
3	Methoden	84
3.1	Zellkultur.....	84
3.1.1	Kultivierung und Passagieren adhärenter Zellen.....	84
3.1.2	Kultivierung von Zellen unter Hypoxie.....	85
3.1.3	Zellfärbung und Zellzählung.....	85
3.1.4	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen	85
3.1.5	Isolation von Leukozyten.....	86
3.1.6	Isolierung von Fibroblasten aus Deziduagewebe.....	86
3.1.7	Isolierung von HUVEC	88
3.2	Vitalitätstests	89
3.2.1	Aussaat der Zellen für Vitalitätstests	89
3.2.2	Aussaat der Zellen für Proliferationsstudien.....	89
3.2.3	CellTiter-Glo® Lumineszenz Vitalitätstest.....	91
3.2.4	Kristallvioletttest	92
3.2.5	WST-8 Proliferationstest	93
3.2.6	Vitalitätstest basierend auf Resazurin	95
3.2.7	Echt-Zeit-Zellanalyse mit dem xCELLigence-System (RTCA = real-time cell analyzer)	96
3.2.8	Auswertung der Vitalitätstests	99
3.3	Weitere Tests	101
3.3.1	UV-Test zur Quantifizierung von L-Milchsäure in Zellkulturüberständen.	101
3.3.2	Proliferationsstudien mit dem xCELLigence-System.....	102
3.3.3	Durchflusszytometrie zur Quantifizierung der Glucoseaufnahme in Zellen.....	103

3.4	Statistische Verfahren	104
3.5	Western Blot	105
3.5.1	Herstellung von Zelllysaten für SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese...	105
3.5.2	Herstellung von Zytoplasma- und Kernextrakten für SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese	106
3.5.3	Proteinbestimmung nach Bradford	106
3.5.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	107
3.5.5	Blottingverfahren	109
3.5.6	Immunfärbung	110
3.5.7	„Strippen“ von Westernblotmembranen	110
3.6	RT-PCR	110
3.6.1	Primer und Primerdesign	110
3.6.2	Extraktion von mRNA	111
3.6.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	112
3.6.4	c-DNA Synthese mittels RT-PCR	112
3.6.5	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	113
3.6.6	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	115
3.6.7	Bestimmung der Expressionsstärke	115
3.7	Immunhistochemie	116
3.7.1	Probenvorbereitung	117
3.7.2	Paraffinschnitte	117
3.7.3	Immunhistochemische Färbung	117
4	Ergebnisse	119
4.1	Vorversuche zur Bestimmung der Vorinkubationszeit und Aussaatdichte	119
4.2	Definition und Überprüfung möglicher Probleme mit den ausgewählten Vitalitätstests	123
4.2.1	Problem der Hintergrundmessung bei farbigen Substanzen im WST-8- Test	123
4.2.2	Problem der Hintergrundmessung bei farbigen Substanzen im Resazurin-Test	124
4.2.3	Vergleichbarkeit verschiedener Vitalitätstests	127
4.2.4	Bestimmung der relativen Zellzahl mit dem Kristallvioletttest	131

4.3	Ermittlung des Dosisbereiches der Testsubstanzen.....	132
4.4	ATP-Gehalt in malignen und benignen Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen	136
4.4.1	Glykolyseinhibitoren	136
4.4.2	Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen	138
4.4.3	Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen	140
4.4.4	Vergleich der beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231	142
4.5	Berechnung von Hemmkonzentrationen (<i>Inhibitory Concentration, IC</i>).....	145
4.5.1	Berechnung von Hemmkonzentrationen mit verschiedenen Methoden .	145
4.5.2	Berechnung verschiedener Hemmkonzentrationen der getesteten Substanzen für alle Zelllinien.....	147
4.6	Quantifizierung der Milchsäureproduktion von malignen und benignen Zellen im Zellkulturüberstand nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen	149
4.6	Quantifizierung der Milchsäureproduktion von malignen und benignen Zellen im Zellkulturüberstand nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen	149
4.6.1	Glykolyseinhibitoren	150
4.6.2	Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen	152
4.6.3	Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen	154
4.7	Einfluss der Kombination von Substanzen auf ATP-Gehalt und Milchsäureproduktion maligner und benigner Zellen	156
4.7.1	Kombinationen mit NaDCA	158
4.7.2	Kombinationen mit Rotenon.....	162
4.8	Charakterisierung der verwendeten malignen und benignen Zellen.....	167
4.8	Charakterisierung der verwendeten malignen und benignen Zellen.....	167
4.8.1	Quantifizierung der Glucoseaufnahme.....	167
4.8.2	Immunhistochemische Charakterisierung	168
4.8.3	Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren HIF, Glucosetransporter und Glyoxalasen	178
4.8.4	Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die Protein-Expression von Laktatdehydrogenase-A und Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 bis 4 .	184

5	Diskussion	189
5.1	Vergleich verschiedener Vitalitätstests	190
5.1.1	Fehlerbetrachtung	191
5.1.2	Problem der Normierung bei Vitalitätstests	191
5.1.3	Beurteilung des CellTiter-Glo [®] Lumineszenz Vitalitätstests	193
5.1.4	Beurteilung des Kristallvioletttests.....	193
5.1.5	Beurteilung des WST-8 Proliferationstests.....	194
5.1.6	Beurteilung des Vitalitätstests basierend auf Resazurin	194
5.1.7	Beurteilung der Echtzeit-Zellanalyse mit dem xCELLigence-System.....	195
5.2	Berechnung von Hemmkonzentrationen	196
5.3	Beurteilung der getesteten Substanzen als mögliche Tumorinhibitoren	197
5.3.1	Glykolyseinhibitoren	197
5.3.2	Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen	200
5.3.3	Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen	207
5.3.4	Kombination von Substanzen.....	212
5.4	Charakterisierung der verwendeten malignen und benignen Zellen.....	214
5.4.1	Quantifizierung der Glucoseaufnahme.....	214
5.4.2	Immunhistochemische Charakterisierung	215
5.4.3	Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren HIF, Glucosetransporter und Glyoxalasen	217
5.4.4	Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die Protein-Expression von Laktatdehydrogenase-A und Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 bis 4.....	221
5.5	Problem von <i>in vitro</i> -Modellen	223
6	Ausblick	225
7	Zusammenfassung	226
8	Summary	229
9	Literaturverzeichnis	231
	Danksagung	253

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest	destilliertes Wasser
Aqua bidest	bidestilliertes Wasser
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AMPK	Adenosin-monophosphat-aktivierte Proteinkinase
bp	Basenpaare
3-BrPA	3-Bromopyruvat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CI	<i>Cell Index</i> (Zellindex)
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
2-DG	2-Deoxy-D-Glucose
2,4-DNP	2,4-Dinitrophenol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DON	6-Diazo-5-oxo-L-norleuzin
DTT	Dithiothreitol

Ø	Durchmesser
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat-Natriumsalz
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometer)
FADH	reduzierte Form von Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FDG-PET	¹⁸ F-Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Erdbeschleunigung
GA3PDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glucosetransporter
<i>h</i>	Planck-Konstante
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HK	Hexokinase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i> (humane venöse Endothelzelle)
IC	<i>Inhibitory Concentration</i> (Hemmkonzentration)
IL	Interleukin
kd	<i>kilodalton</i> (atomare Masseneinheit)
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LKB	Leberspezifische Kinase B
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i> (magnetische Zellseparation)
MCT	Monocarboxylattransporter
MG	Molekulargewicht
µ	mikro-
µM	mikromolar
ml	Milliliter

mM	millimolar
mm ³	Kubikmillimeter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
N ₂	Stickstoff
NaDCA	Natriumdichloracetat
NaF	Natriumfluorid
min.	Minute(n)
mm	Millimeter
na	nicht analysierbar
nb	nicht bestimmbar
nm	Nanometer
NAD ⁺	oxidierte Form von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduzierte Form von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
2-NBDG	2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D- Glucose
v	<i>ny</i> , Frequenz
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PP	Polypropylen
PPi	Pyrophosphat
PPW	Pentosephosphatweg
%	Prozent

RLU	<i>Relative Light Unit</i> (relative Lichteinheit)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTCA	<i>Real-Time Cell Analyzer</i> (Echtzeit-Zell-Analysator)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> -Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunde(n)
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannte
SPECT-MR	<i>Single-Photon-Emission-Computed-Tomography-Magnetic-Resonance</i> (Einzel-Photonenemissions-Computertomographie-Magnetresonanz)
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Stabw.	Standardabweichung
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
Taq	<i>termus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TK	Transketolase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	<i>unit</i> (internationale Einheit)
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
v/v	Volumen-Volumen-Verhältnis
w/v	<i>weight to volume</i> (Gewichts-Volumen-Verhältnis)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Tumorentstehung und Problematik der bisherigen Therapie

Im Jahr 2009 waren Krebserkrankungen in Deutschland mit 26 % aller Todesfälle die zweithäufigste Todesursache (Gesundheit, Todesursachen in Deutschland, Fachserie 12, Reihe 4, statistisches Bundesamt Wiesbaden 2010). Die Zahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland für das Jahr 2010 wird laut Robert-Koch-Institut auf insgesamt 450.000 (Männer 246.000, Frauen 204.000) geschätzt. 2006 war die häufigste Krebserkrankung der Männer der Prostatakrebs (26%), die der Frauen der Brustkrebs (29 %) (Krebs in Deutschland 2005/2006, Häufigkeiten und Trends, 7. Ausgabe 2010, Robert Koch-Institut, Berlin 2010).

Die Risikofaktoren für Krebserkrankungen sind vielfältig. Auffällig ist, dass nur 5 - 10 % durch Gendefekte verursacht werden, also erblich bedingt sind. Diese genetischen Faktoren sind zwar eine bedeutsame Ursache von Krebserkrankungen, spielen aber nicht die herausragende Rolle. Die Hauptrisikofaktoren betreffen die Lebensweise der Menschen, wie Ernährungsgewohnheiten, Rauchen, Bewegungsmangel, Fettleibigkeit und der übermäßige Konsum von Alkohol und Drogen aber auch Infektionen. Sie sind in 90 - 95 % der Fälle die direkte Ursache für Krebserkrankungen (Anand et al. 2008).

Zur derzeitigen Standardtherapie solider Tumoren gehören lokale Behandlungsformen wie die Resektion des Tumors und die Radiotherapie, aber auch die systemische Behandlung mit Chemotherapeutika. Radio- und Chemotherapie sind mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen behaftet. Übelkeit, Erbrechen, Hautreaktionen, Fatigue-Syndrom und Infektanfälligkeit sind hierbei die häufigsten. Ein weiterer Nachteil ist die enge therapeutische Breite dieser Therapien, d. h. der Spielraum zwischen gewünschter toxischer Wirkung auf das Tumorgewebe und dem Auftreten von Nebenwirkungen durch Schädigung des gesunden Gewebes, da beide nicht selektiv nur Tumorzellen schädigen. Auch das Auftreten von Resistenzen maligner Zellen gegenüber Chemotherapeutika stellt ein großes Problem dar (McDermott et al. 2011, Higgins 2007). Eines der Hauptziele der pharmakologischen Forschung im Bereich Onkologie ist daher die Entwicklung von Arzneistoffen für eine gezielte Krebstherapie, eine sog. *targeted therapy*. Darunter versteht man Medikamente, die gezielt in gestörte Regulationsvorgänge bösartiger Zellen eingreifen. Dazu zählen z. B. rezeptorbasierte Therapien wie der schon bei

Brustkrebs eingesetzte anti-HER2/neu-Antikörper Trastuzumab (Herceptin), die Hemmung der Gefäßneubildung (Angiogenese) in Krebsgeschwulsten z. B. durch den anti-VEGF-Antikörper Bevacicumab (Avastin) die Anregung zum programmierten Zelltod, Bekämpfung von Krebsstammzellen und eine gezielte Hemmung von Stoffwechselwegen in Tumorzellen. Für die Entwicklung solcher zielgerichteter Therapien müssen die biologischen Unterschiede zwischen normalen Zellen und Krebszellen genau charakterisiert werden, um eine tumorselektive Wirkung zu gewährleisten. Gerade der Stoffwechsel von Tumorzellen gerät hierbei in neuester Zeit immer mehr in den Fokus der Forschung wenn es um die Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze geht (Tennant et al. 2010).

1.2 Stoffwechsel in Tumorzellen

In den letzten 20 Jahren ist das Interesse am Zuckerstoffwechsel von Tumorzellen rapide angestiegen. Wissenschaftler und Pharmaindustrie sehen den Stoffwechsel als neuen Ansatz für eine Krebstherapie, nachdem andere Angriffspunkte wie Zellteilung, Angiogenese und Oberflächenrezeptoren bisher keinen durchschlagenden Erfolg gebracht haben (Der Spiegel 20/2010).

In den letzten Jahren sind viele Übersichtsartikel in hochrangigen Fachzeitschriften erschienen, die sich mit dem Stoffwechsel als mögliche Therapieoption beschäftigen (z. B. Tennant et al. 2010, Moreno-Sánchez et al. 2007, Sattler et al. 2010). Der Schwerpunkt liegt auf der Hemmung der wichtigsten Stoffwechselwege in Tumorzellen, nämlich von Glykolyse, Pentosephosphatweg und Glutaminolyse. Auch Signalwege, die an der Regulation der genannten Stoffwechselwege beteiligt sind werden als Zielstrukturen für neue Krebsmedikamente intensiv erforscht. Zu diesen Signalwegen gehören z. B. der PI3K/Akt/mTOR-, der LKB1/AMPK- und der Ras/Raf/MEK-ERK-Signalweg. Zahlreiche Substanzen wurden *in vitro* auf verschiedenen Tumorzelllinien getestet, einige auch *in vivo* in Xenotransplantat-Tumormodellen. Ein paar wenige werden sogar in klinischen Studien der Phase I und II am Menschen getestet. Bis zur Zulassung als Medikament wird es aber noch Jahre dauern.

Für manche Substanzen, die Schlüsselmoleküle wichtiger Stoffwechselwege hemmen, lieferten Zellkulturexperimente vielversprechende Ergebnisse (z. B. Scatena et al. 2010). Allerdings wurde die Wirkung dieser Substanzen nur selten auf benignen Zellen untersucht. Für eine zielgerichtete Tumorthherapie ist eine

tumorselektive Wirkung der Testsubstanz jedoch unerlässlich, um Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten. Die Wirkung der Substanzen wird zunächst *in vitro* auf malignen und benignen Zellen untersucht, um geeignete Kandidaten mit tumorselektiver Wirkung zu identifizieren und selektionieren. Daran schließen sich *in vivo*-Experimente im Tiermodell und schließlich die klinische Testung im Patienten an.

1.2.1 Besonderheiten des Tumorstoffwechsels - der Warburg-Effekt

Der deutsche Biochemiker und Arzt, Otto Heinrich Warburg, beschrieb 1923 erstmals, dass Tumorgewebe auch in Anwesenheit von reichlich Sauerstoff einen ausgeprägten glykolytischen Stoffwechsel und verminderte Nutzung des Zitratzyklus aufweisen. Warburg nannte diesen Tumormetabolismus „aerobe Glykolyse“. Diese ist durch eine gesteigerte Aufnahme von Glucose und Abgabe von Milchsäure ins umgebende Gewebe gekennzeichnet (Warburg und Minami 1923). Eine gesteigerte aerobe Glykolyse wurde seither in vielen humanen und tierischen Tumorzelllinien beschrieben (Pedersen 1978, Mazurek et al. 1997, Griguer et al. 2005, Gatenby und Gillies 2004, Marin-Hernandez et al. 2006, Moreno-Sánchez et al. 2007). Die Energiegewinnung in Tumorzellen erfolgt jedoch nicht ausschließlich über die aerobe Glykolyse. Abhängig von Zelltyp und Wachstumsbedingungen gewinnen Krebszellen unter aeroben Bedingungen bis zu 60 % ihres ATP (Adenosintriphosphat) über diesen Stoffwechselweg (Nakashima et al. 1984). Weitere Wege der Energiegewinnung sind wie in allen eukaryoten Zellen die oxidative Phosphorylierung, die Glutaminolyse und die Oxidation von Fettsäuren.

Weisen Tumorgewebe einen stark glykolytischen Phänotyp auf, zeichnen sie sich durch eine stark gesteigerte Glukoseaufnahme aus (Warburg et al. 1927). Diese Eigenschaft nutzt man für die sog. PET (Positron-Emissions-Tomographie), ein diagnostisches Verfahren zur bildlichen Darstellung von Tumoren und Metastasen. Hierbei wird den Patienten das Glukoseanalogon 18-Fluorodeoxyglucose appliziert, welches wie Glukose in die Tumorzellen aufgenommen wird, dort aber nicht weiter abgebaut werden kann und akkumuliert. Die hierdurch entstehende radioaktive Aufladung des Gewebes kann mit den geeigneten Detektoren bildgebend dargestellt werden (Abb. 1).

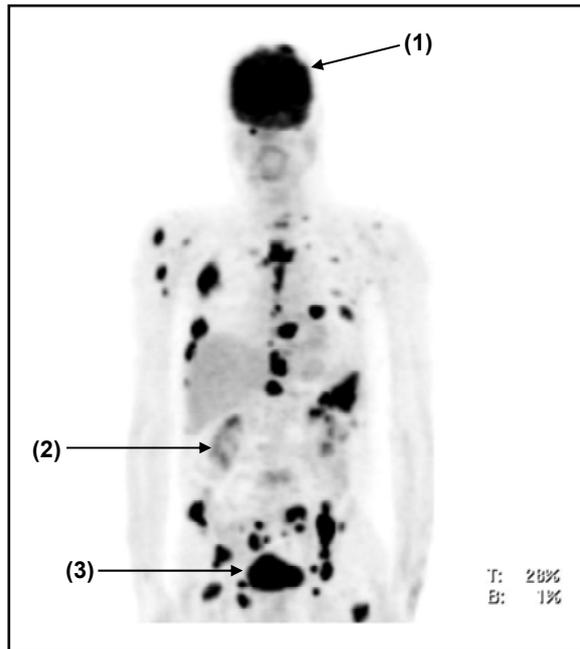


Abb. 1: FDG-PET-Aufnahme eines Patienten mit multiplem Myelom mit zahlreichen Knochenherden.

Gehirn (1), Nieren (2) und Blase (3) nehmen FDG physiologisch auf. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Kreißl Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Würzburg).

PET-Untersuchungen an tausenden Tumorpatienten haben eindeutig gezeigt, dass die meisten Primärtumore und Metastasen eine gesteigerte Zuckeraufnahme haben (Gatenby und Gillies 2004). Auch die dabei in großen Mengen entstehende Milchsäure kann mittlerweile mit der Methode SPECT-MR (*Single Photon Emission Computed Tomography-Magnetic Resonance*, Einzel Photon Computer-Tomographie-Magnet Resonanz) in der direkten Umgebung von Tumoren nachgewiesen werden (Day et al. 2007, Albers et al. 2008) wie Abbildung 2 zeigt.

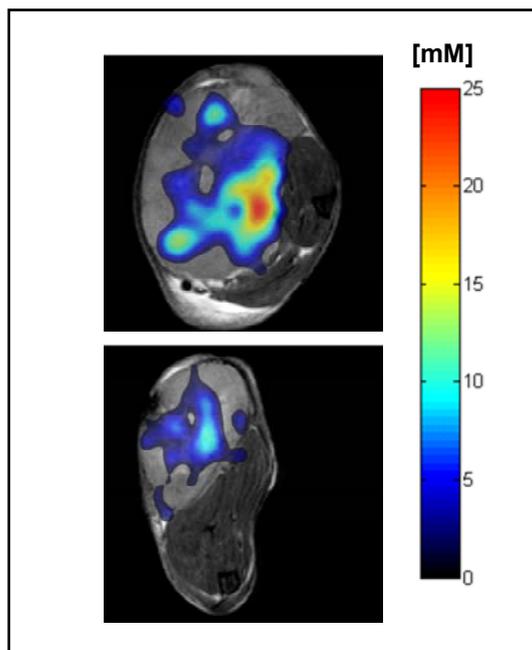


Abb. 2: SPECT-MR-Aufnahme von zwei xenotransplantierten Tumoren auf Mäusen.

Dargestellt ist die *in vivo* gemessene Laktatkonzentration. (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. P. Jakob, Experimentelle Physik 5, Universität Würzburg).

Für Überleben und Wachstum benötigen Zellen Energie in Form von ATP und NADH (protonierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) als Reduktionsäquivalent, welches sie aus dem Abbau von Glucose gewinnen. In der Glykolyse (Abb. 3), nach ihren Entdeckern auch als Emden-Meyerhof-Weg benannt, wird Glucose zunächst zu Pyruvat abgebaut. In Anwesenheit von Sauerstoff wird Pyruvat dann in den Mitochondrien über den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex zu Acetyl-CoA verstoffwechselt, welches im Zitratzyklus schließlich zu CO_2 abgebaut wird. Insgesamt beträgt die Energieausbeute je Mol Glucose hierbei 38 Mol ATP. Fehlt Sauerstoff, so wird Pyruvat im Zytosol durch das Enzym Laktatdehydrogenase in Laktat umgesetzt. Der Energiegewinn beträgt hierbei lediglich 2 Mol ATP je Mol Glucose.

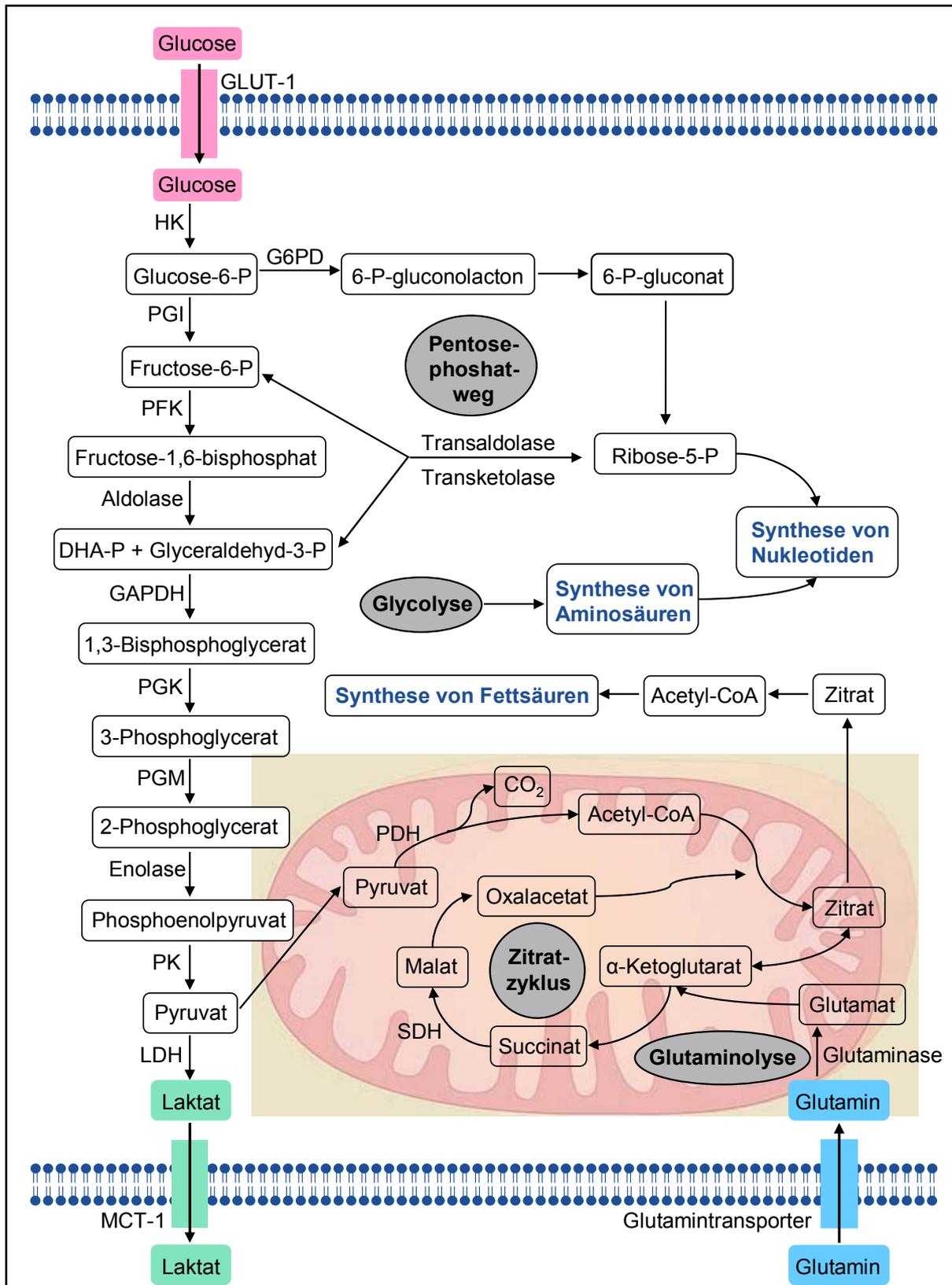


Abb. 3: Stoffwechselwege in Tumorzellen.

Das Schema zeigt den gegenwärtigen Wissensstand der Stoffwechselwege in Tumorzellen. Dargestellt sind Glykolyse, Pentosphosphatweg, Glutaminolyse, Zitratzyklus und ihre Verbindung untereinander. (Verändert nach Vander Heiden et al. 2009).

Welche Vorteile Krebszellen von diesem energetisch ineffektivem Stoffwechselweg haben und welche Mechanismen diesem zu Grunde liegen wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht und die Literaturlage zum Zuckerstoffwechsel und dem „Warburg-Effekt“ nimmt in den letzten 10 Jahren dramatisch zu (Abb. 4).

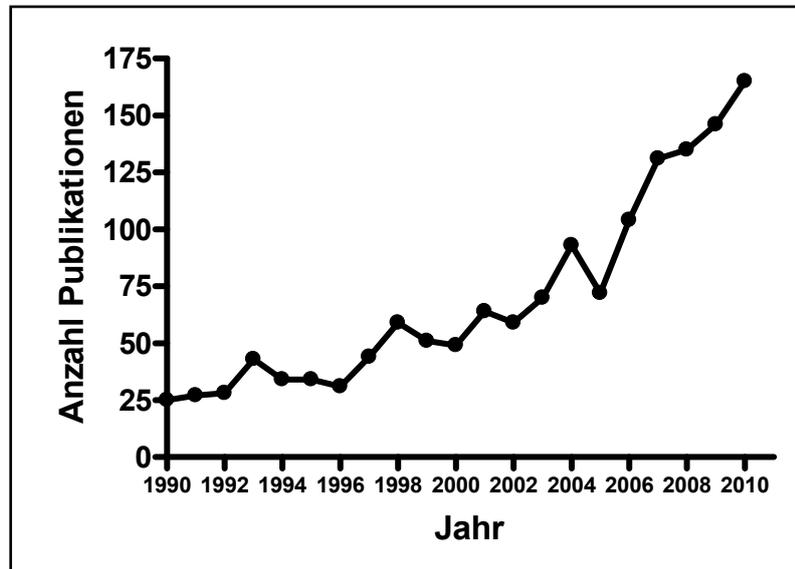


Abb. 4: Wachsendes wissenschaftliches Interesse am Zuckerstoffwechsel in Tumorzellen. Ergebnisse der Suche in der Datenbank PubMed nach den Begriffen „glucose metabolism“ und „cancer“ seit 1990.

1.2.2 Glykolyse und oxidative Phosphorylierung in Tumorzellen

In einem Übersichtsartikel beschreibt Levine, dass die meisten Tumorzellen keine Defekte im mitochondrialen Stoffwechsel aufweisen. Eine Ausnahme sind seltene Mutationen der beiden mitochondrialen Enzyme Succinatdehydrogenase und Fumarathydratase, die in Zusammenhang mit verschiedenen sporadischen oder familiären Tumorerkrankungen stehen (Leiomyomatose mit papillärem Nierenzellkarzinom, Leiomyosarcom, Phäochromozytom oder Paragangliom (Gottlieb und Tomlinson 2005). In fast allen Krebszellen sind entsprechend beide Stoffwechselwege aktiv, Glykolyse und oxidative Phosphorylierung. Dadurch wird eine maximale Ausbeute an Substraten für die Synthese von Zellmembranen, Nucleinsäuren und Proteinen gewährleistet und erlaubt eine schnelle Zellproliferation. Diese Syntheseprozesse benötigen große Mengen Energie in Form von ATP, welche durch den Abbau von Glucose und Glutamin erreicht wird (Levine und Puzio-Kuter 2010) und Kohlenstoff-Grundbausteine, welche aus der Glykolyse entnommen werden (siehe Abbildung 3).

Andere Arbeiten hingegen zeigen, dass Mitochondrien von Tumorzellen sehr wohl in ihrer Funktion beeinträchtigt sein können. In mehreren Tumoren (Lunge, Darm, Brust) wurde nachgewiesen, dass die katalytische Untereinheit der ATP-Synthase, die β -F₁-ATPase, herunterreguliert ist (Cuezva et al. 2002; Isidoro et al. 2005) und mit einer gesteigerten Glucoseaufnahme korreliert (López-Ríos et al. 2007). Shin et al. fanden in chemoresistenten Tumorzellen, dass die ATP-Synthase herunterreguliert ist im Vergleich zu den entsprechenden chemosensitiven Zellen (Shin et al. 2005). Der ATPase Inhibitory Factor 1 (IF 1), welcher die β -F₁-ATPase hemmt, ist in vielen Tumorgeweben und Tumorzelllinien überexprimiert und trägt zur Ausbildung des Warburg-Phänotyps in Tumorzellen bei (Sánchez-Cenizo et al. 2010). Feichtinger et al. konnten nachweisen, dass beim Neuroblastom alle Komponenten der Atmungskette in Mitochondrien herunterreguliert sind aber die Mitochondrienzahl nicht beeinträchtigt ist (Feichtinger et al. 2010).

Für HeLa-Zellen wurde gezeigt, dass sie ihre Energiegewinnung an das Substratangebot anpassen können, d. h. sowohl Glykolyse als auch oxidative Phosphorylierung betreiben können, indem sie ihre Mitochondrien an die jeweiligen Gegebenheiten anpassen (Rossignol et al. 2004). Wird in Prostatatumorzellen die Glykolyse durch 2-Deoxyglucose (2-DG) gehemmt, verstoffwechseln die Zellen vermehrt Glutamin, wofür es funktioneller Mitochondrien bedarf (Matheson et al. 2007). Tumorzellen, welche die Proteinkinase Akt exprimieren sind auf Glucose als Energiesubstrat angewiesen. Bei Glucosemangel sind diese Zellen nicht in der Lage ihre Energie über die Oxidation von Fettsäuren in den Mitochondrien zu gewinnen und sterben (Buzzai et al. 2005).

1.2.3 Ursachen/Mechanismen der aeroben Glykolyse in Tumorzellen

Die Mechanismen, wie Tumorzellen die Glykolyserate steigern sind vielfältig. Dazu zählen intrinsische Faktoren wie veränderte Expressionsmuster von Genen, Aktivierung von Onkogenen, Mutationen und/oder Defekte in Mitochondrien, sowie die Expression von Isoenzymen wichtiger Schlüsselenzyme des Stoffwechsels. Auch extrinsische Faktoren wie das Mikromilieu des Tumors, geringer pH, Sauerstoffmangel (Hypoxie) und Nährstoffmangel spielen eine wichtige Rolle. Im Folgenden wird eine Auswahl dieser Mechanismen erläutert.

Veränderte Expression und Aktivität von Enzymen und Transportern

Die Überexpression von Enzymen der Glykolyse ist für viele Tumorentitäten beschrieben (Altenberg und Greulich 2004).

Ein wichtiges Enzym der Glykolyse ist die Hexokinase, welche gewebespezifisch in verschiedenen Isoformen (I - IV) exprimiert wird. Die meisten Tumorzellen exprimieren Hexokinase II (Pelicano et al. 2006). Die Aktivität von Hexokinase II ist in Tumorzellen deutlich gesteigert im Vergleich zu normalen Zellen (Marín-Hernández et al. 2010, Zancan et al. 2010). Hexokinase II ist an den spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC, *voltage dependent anion channel*) der äußeren Mitochondrienmembran gebunden und erhält so einen direkten Zugang zu dem in den Mitochondrien produzierten ATP, welches für die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat notwendig ist (Pedersen 2007).

Der letzte Schritt der Glykolyse führt zur Bildung von Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat und wird durch das Enzym Pyruvatkinase katalysiert. Von diesem normalerweise tetrameren Enzym existieren vier Isoformen, wobei in proliferierenden Zellen wie embryonale Zellen, Stammzellen und auch Tumorzellen ausschließlich die Isoform M2-PK vorkommt (Yeluri 2009). In Krebszellen liegt M2-PK überwiegend als dimere und damit nahezu inaktive Form vor. Dadurch wird der letzte Schritt der Glykolyse verlangsamt und es fallen vermehrt Metabolite an, die für die Synthese von Nukleinsäuren, Phospholipiden und Aminosäuren benötigt werden (Mazurek et al. 2002, Levine und Puzio-Kuter 2010).

Zur Deckung des hohen Glucosebedarfs weisen Tumorzellen eine gesteigerte Expression von Glucosetransportern auf (Medina und Owen 2002). Die Familie der Glucosetransporter wird in drei Klassen eingeteilt (Joost und Thorens 2001). Die Glucosetransporter 1 - 4 gehören zur Klasse I und transportieren Glucose, GLUT-5 zählt zu den Klasse II-Glucosetransportern und transportiert Fructose. Die Glucosetransporter 1 - 3 sind nicht insulinreguliert. GLUT-4 ist ein insulinregulierter Glucosetransporter (Wood und Trayhurn 2003) und wird durch Insulinstimulation an die Plasmamembran transloziert (Slot et al. 1991). Die Promotoren der Glucosetransportergene *GLUT-1* und *GLUT-3* besitzen sog. *hypoxia-response elements* (HRE), an welche HIF-1 bindet und die Transkription steigert (Semenza 2003). In vielen humanen Tumoren ist der Glucosetransporter 1 (GLUT-1) überexprimiert, was mit einer verstärkten Metastasierung und schlechter Prognose einhergeht (Alo et al. 2001; Godoy et al. 2006). GLUT-1 erlaubt den Tumorzellen

eine insulinunabhängige Zuckeraufnahme auch bei niedrigem Blutglukosespiegel und stellt so die Glukoseversorgung der Tumorzellen sicher. Auch für GLUT-2 und GLUT-3 wurde in Tumorzellen bzw. Tumorgeweben eine erhöhte Expression nachgewiesen (Godoy et al. 2006; Rodriguez-Enriquez et al. 2009). Eine erhöhte Expression für den Glucosetransporter 4 wurde u. a. in Magenkarzinomen (Noguchi et al. 1999) und Brusttumoren (Binder et al. 1997) nachgewiesen. Der Fructosetransporter 5 zeigte sowohl in Tumorzelllinien als auch in Tumorgewebe eine starke Expression (Zamora-Leon et al. 1996; Godoy et al. 2006), was darauf hindeutet, dass neben Glucose auch Fructose ein wichtiges Energiesubstrat für Tumorzellen darstellt.

In Tabelle 1 sind die Km-Werte der Glucosetransporter aufgeführt. Ein niedriger Km-Wert bedeutet eine hohe Affinität des Substrats zum Transporter.

Glucosetransporter	Km-Wert	Substrat
GLUT-1	3 mM	Glucose
GLUT-2	17 mM	Glucose
GLUT-3	1,4 mM	Glucose
GLUT-4	5 mM	Glucose
GLUT-5	6 mM	Fructose

Tab. 1: Km-Werte und Substrate von Glucosetransportern (Thorens et al. 2004).

Mitochondriale Defekte

Warburg nahm an, dass Krebszellen einen Defekt in der Atmungskette haben und daher auch bei normoxischen Sauerstoffbedingungen auf die Glykolyse zur Energiegewinnung angewiesen sind (Warburg 1956). Tatsächlich weist die mitochondriale DNA in Tumorzellen verschiedener Ursprungsgewebe häufig Mutationen auf (Carew und Huang 2002, Copeland et al. 2002, Nomoto et al. 2002). Da viele Komponenten der Atmungskette auf der mitochondrialen DNA kodiert sind, könnte dies zu Fehlfunktionen in der oxidativen Phosphorylierung führen und folglich zu einer reduzierten ATP-Produktion. Störungen in der Atmungskette führen zu einem Elektronenleck, wodurch vermehrt reaktive Sauerstoffspezies, sog. ROS (engl. *Reactive Oxygen Species*) anfallen. Es ist bekannt, dass Tumorzellen mehr

ROS produzieren als normale Zellen (Laurent et al. 2005). ROS entstehen auch durch chronisch entzündliche Prozesse im Mikromilieu von Tumoren. Diese reaktiven Sauerstoffspezies können redox-sensitive Komponenten der Atmungskette hemmen (Chen et al. 2007). Die mitochondriale DNA besitzt keine Histone und Mitochondrien verfügen nur begrenzt über Mechanismen zur Reparatur geschädigter DNA. Sie sind daher anfälliger für freie Radikale. Dadurch entsteht ein Teufelskreis: Tumorzellen produzieren sehr viele ROS. ROS schädigen die Mitochondrien. Immer mehr Schäden häufen sich in der mitochondrialen Atmungskette an, das Elektronenleck verstärkt sich. Zudem wird eine verringerte Anzahl an Mitochondrien in Tumorzellen als mögliche Ursache für die gesteigerte Glykolyse diskutiert (Pedersen 1978). In einer aktuellen Arbeit wurde eine verringerte mitochondriale Masse in Ganglioneuromen festgestellt (Feichtinger et al. 2011). Shapovalov et al. postulieren, dass „unreife“ nicht-funktionelle Mitochondrien für den geringen Sauerstoffverbrauch in Tumorzellen verantwortlich sind. Im Vergleich zu benignen Osteosarkomzellen fanden sie in einer sehr aggressiven Osteosarkomzelllinie eine vermehrte Anzahl an Mitochondrien, die morphologisch vergrößert waren und einen erhöhten Gehalt an mitochondrialer DNA aufwiesen. Auch der Proteingehalt der Komplexe der Atmungskette war erhöht, die enzymatische Aktivität jedoch vermindert (Shapovalov et al. 2011).

Mikromilieu des Tumors

In schnell wachsenden Tumoren entstehen Areale, die nur unzureichend mit Sauerstoff versorgt sind, da die Bildung neuer Gefäße dem Bedarf hinterherhinkt (Vaupel 2004, Helmlinger 1997, Vaupel und Mayer 2007). In diesen hypoxischen Bereichen können Tumorzellen die oxidative Phosphorylierung zur ATP-Produktion nur sehr eingeschränkt nutzen. Gatenby und Gillies vermuten, dass es dadurch zu einem Selektionsdruck auf Tumorzellen kommt. Dieser fördert die Vermehrung von Tumorzellen, welche an diese feindlichen Bedingungen angepasst sind, also eine konstitutiv gesteigerte Glykolyse haben und säureresistent sind (Gatenby und Gillies 2004).

Abbildung 5 zeigt ein Schema der Diffusionsstrecken von Sauerstoff, Glucose und Glutamin an einer Arterie eines xenotransplantierten humanen Brusttumors.

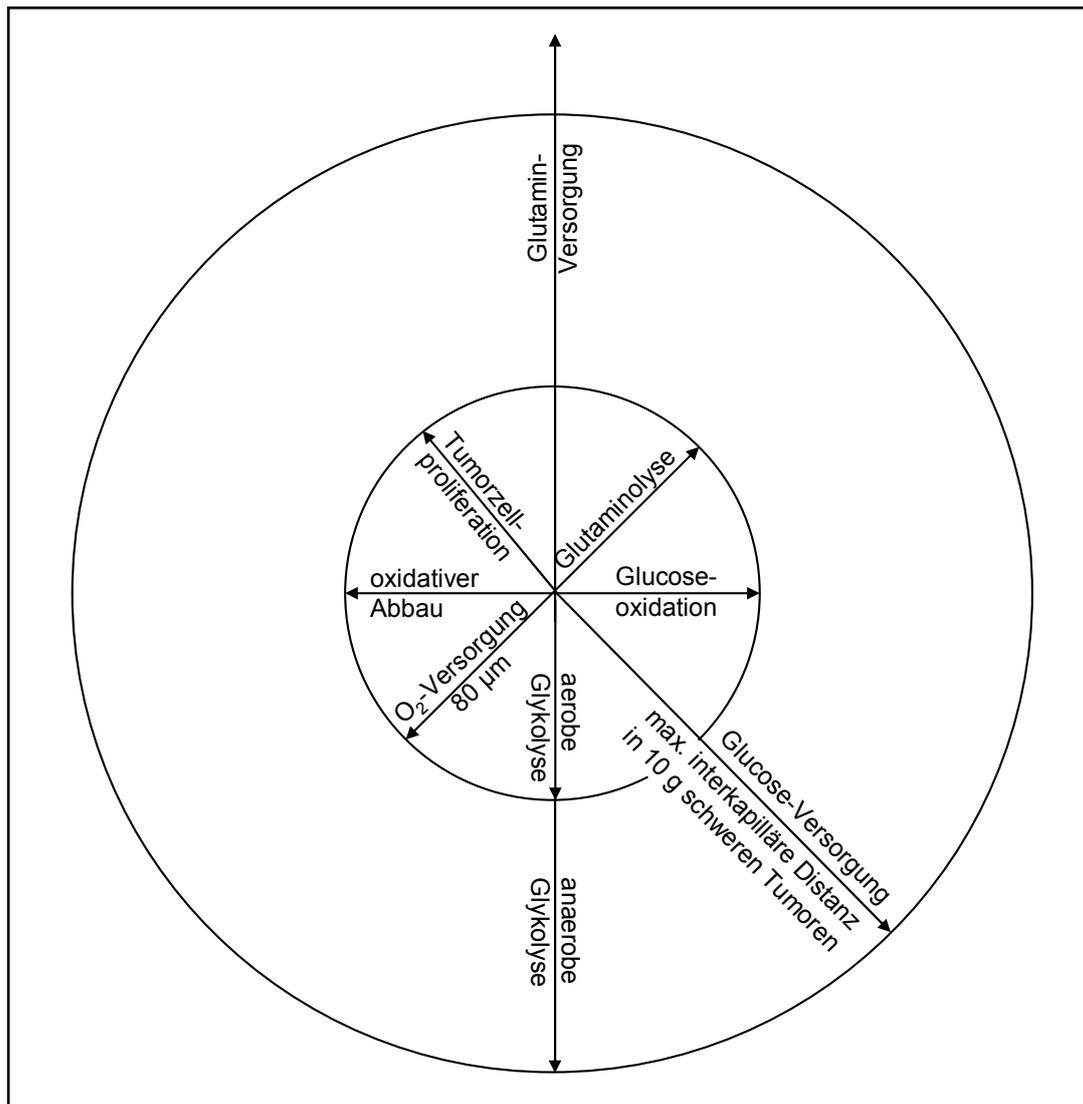


Abb. 5: Schematische Darstellung des Versorgungsmodells am arteriellen Ende einer versorgenden Kapillare in einem xenotransplantierten humanen Brusttumor.

Die Versorgungsstrecken von Sauerstoff, Glucose und Glutamin wurden anhand von *in vivo*-Daten berechnet. Radius der Sauerstoffversorgung: 80 µm. Radius der Glucoseversorgung: 200 µm. Radius der Glutaminversorgung: 240 µm. (Übernommen aus Kallinowski et al. 1987).

Als Reaktion auf die hypoxischen Umgebungsbedingungen exprimieren und stabilisieren Tumore Transkriptionsfaktoren der HIF (Hypoxie-induzierbarer Faktor)-Gruppe. HIF sind heterodimere Transkriptionsfaktoren und gehören zur Familie der basic-Helix-Loop-Helix-Proteine. Bisher sind drei HIF-Transkriptionsfaktoren beschrieben, HIF-1 α (Semenza und Wang 1992), HIF-2 α (Tian et al. 1997) und HIF-3 α (Gu et al. 1998). Am besten charakterisiert ist HIF-1 α . Ein Zusammenhang von HIF-1 α und HIF-2 α mit der Tumorentstehung wird diskutiert (Harris 2002; Semenza 2003).

Die heterodimeren Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer sauerstoffsensitiven α -Untereinheit (HIF-1 α bzw. HIF-2 α), welche einen aktiven Komplex mit HIF-1 β

eingeht. HIF-1 α - und HIF-2 α -mRNA ist konstitutiv exprimiert (Huang et al. 1996; Wiesener et al. 1998). Die Proteinstabilität von HIF wird durch posttranslationale Modifikation der α -Untereinheit bestimmt. Unter normalen Sauerstoffbedingungen (21 % O₂) wird die α -Untereinheit für den proteasomalen Abbau markiert (Pugh et al. 1997). Das Protein HIF-1 β hingegen wird konstitutiv exprimiert (Huang et al. 1996). Die Stabilisierung von HIF-1 α kann auch über sauerstoffunabhängige Mechanismen erreicht werden. Dazu zählen z. B. verschiedene Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor) (Zhong et al. 2000), PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor- β) (Basu et al. 2011), IGF1 und IGF2 (insulin-like growth factors) und Insulin (Feldser et al. 1999; He et al. 2011). Auch Zytokine wie TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha) (Zhou et al. 2003 a), Interleukin-1 β (IL-1 β) (Thornton et al. 2000) und NO (Stickstoffmonoxid) (Zhou et al. 2003 b) sind an der sauerstoffunabhängigen Regulation von HIF-1 α beteiligt. Außerdem führen Mutationen bzw. der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (von Hippel-Lindau, PTEN) (Maxwell et al. 1999; Zundel et al. 2000) und die Aktivierung von Onkogenen (Her2neu, Ras) (Laughner et al. 2001; Chen et al. 2001) zur Stabilisierung von HIF-1 α .

Viele Primärtumore, aber vor allem Metastasen zeigen eine Überexpression von HIF-1 α (Zhong et al. 1999) und auch eine Koexpression von HIF-1 α und HIF-2 α (Talks et al. 2000). Die Überexpression von HIF-1 α und HIF-2 α steht im Zusammenhang mit einer erhöhten Metastasierungsrate und Mortalität (Semenza 2007).

HIF reguliert die Transkription von zahlreichen Genen die für Proteine kodieren, welche in viele verschiedene Aspekte der Tumorzellbiologie involviert sind: Immortalisierung, Zucker- und Energiestoffwechsel, Vaskularisierung, autokrine Wachstumssignale, Invasion und Metastasierung, Immunesecape und Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie (Semenza 2010). Konkret fördert HIF-1 die Glykolyse, indem er die Expression von Glucosetransportern (GLUT-1 und GLUT-3) sowie verschiedener Enzyme der Glykolyse (Hexokinase II, LDH-A) hochreguliert (Semenza 2000). Außerdem aktiviert HIF-1 die Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 (PDK1), die wiederum die Pyruvatdehydrogenase (PDH) inaktiviert. Dadurch gelangt weniger Acetyl-CoA in die Mitochondrien und letztlich wird weniger NADH und FADH₂ (protonierte Form von Flavin-Adenin-Dinukleotid) gebildet und steht für die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette nicht zur Verfügung (Weinberg und Chandel 2009).

Die Rolle von Onkogenen am Beispiel Akt

Eine wichtige Stellung im Tumorstoffwechsel nimmt das Onkogen „Akt“ ein, welches in vielen Tumoren überexprimiert ist (Sun et al. 2001). Akt ist Teil des Ras/PI3K/Akt/mTOR-Signalweges, welcher in der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielt. P-Akt, die phosphorylierte aktive Form dieser Serin-Threonin-Kinase reguliert Gentranskription, Proteinsynthese, Zuckerstoffwechsel und Zellüberleben (Kandel und Hay 1999). Akt stimuliert die aerobe Glykolyse in Tumorzellen, was durch FDG-PET-Untersuchungen in Mäusen gezeigt wurde (Elstrom 2004). Weiterhin steigert die Kinase die Expression der Glucosetransporter GLUT-1 und GLUT-3, was die Aufnahme von Glucose verstärkt (Kandel und Hay 1999). Zudem fördert Akt die Bindung von Hexokinase II an die Mitochondrienmembran, was nach Ansicht von Gottlob et al. die Apoptose verhindert (Gottlob et al. 2001). Krebszellen, die Akt überexprimieren sind auf Glucose als Energiequelle angewiesen und können andere Substrate, wie z. B. Fett nicht in der β -Oxidation verwerten (Buzzai et al. 2005). Akt führt zur Stabilisierung von HIF-1 unter normoxischen Bedingungen (Pathania et al. 2009). Akt fördert ebenso Zellproliferation und -migration, Angiogenese, hemmt proapoptische Proteine (Carnero 2010) und steigert die Lipidsynthese (Mason und Rathmell 2010).

Es ist zu betonen, dass nicht alle Tumorzellen sämtliche dieser hier aufgeführten Mechanismen aufweisen. Jede Krebszelllinie weist eine Kombination dieser Mechanismen in individueller Ausprägung auf, die dann in einer gesteigerten Glykolyse resultiert.

Vorteile des Warburg-Effektes für Tumorzellen

Auf den ersten Blick scheint die aerobe Glykolyse nachteilig für Überleben und Wachstum von Tumorzellen zu sein. Die Energieausbeute ist deutlich geringer im Vergleich zum oxidativen Abbau von Glucose in den Mitochondrien. Außerdem führt die starke Laktatproduktion zu einem sauren und damit toxischen Mikromilieu in der direkten Umgebung der Tumorzellen und löst Apoptose aus (Williams et al. 1999).

Bedeutung der Glykolyse in Tumorzellen

Unter der Annahme, dass bei Tumorzellen die Mitochondrien defekt sind, wäre die Glykolyse mit folgender Milchsäuregärung eine notwendige Anpassung, um die fehlende ATP-Gewinnung über die oxidative Phosphorylierung zu kompensieren (Cairns et al. 2011).

Obwohl die Glykolyse im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung deutlich ineffektiver ist, kann durch eine gesteigerte Glykolyserate letztendlich mehr ATP erzeugt werden (Pfeiffer et al. 2001), was ein Vorteil für schnell proliferierende Tumorzellen ist. Die Glykolyse liefert zudem Zwischenprodukte und Redoxäquivalente für andere wichtige Stoffwechselwege. Die Zwischenprodukte Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat werden in den Pentosephosphatweg (PPW) eingeschleust (Abb. 3). Wie weiter unten beschrieben, werden im PPW Ribose-5-phosphat für die Nukleinsäuresynthese und NADPH für die Lipidsynthese und die Regeneration von reduziertem Glutathion erzeugt (Weinberg und Chandel 2009). Das Zwischenprodukt Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) dient als Vorstufe für die Synthese von Lipiden. 3-Phosphoglycerat ist Ausgangssubstanz für die Synthese der Aminosäuren Serin, Cystein und Glycin (Moreno-Sánchez 2007). Pyruvat ist Ausgangssubstanz für viele verschiedene Produkte (Abb. 5). Durch die Pyruvatdehydrogenase wird Pyruvat zu Acetyl-CoA umgesetzt, welches entweder für die Synthese von Lipiden genutzt oder in den Zitratzyklus eingeschleust wird. Pyruvat dient außerdem als Vorstufe für die Synthese der Aminosäure Alanin. In manchen Tumorzellen wird Pyruvat möglicherweise in den Mitochondrien decarboxyliert wobei Acetoin entsteht, welches die Pyruvatdehydrogenase hemmt (Moreno-Sánchez 2007). Unter Sauerstoffmangelbedingungen wird Pyruvat zu Laktat (Milchsäure) abgebaut und NADH zu NAD^+ reoxidiert, was für die Aufrechterhaltung der Glykolyse notwendig ist. Laktat wiederum dient als Ausgangssubstanz für die Gluconeogenese und wird auch als Substrat für oxygenierte Tumorzellen diskutiert (s. u.). Pyruvat kann nicht-enzymatisch zu Acetat decarboxyliert werden, wodurch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) unschädlich gemacht wird (Salahudeen et al. 1991).

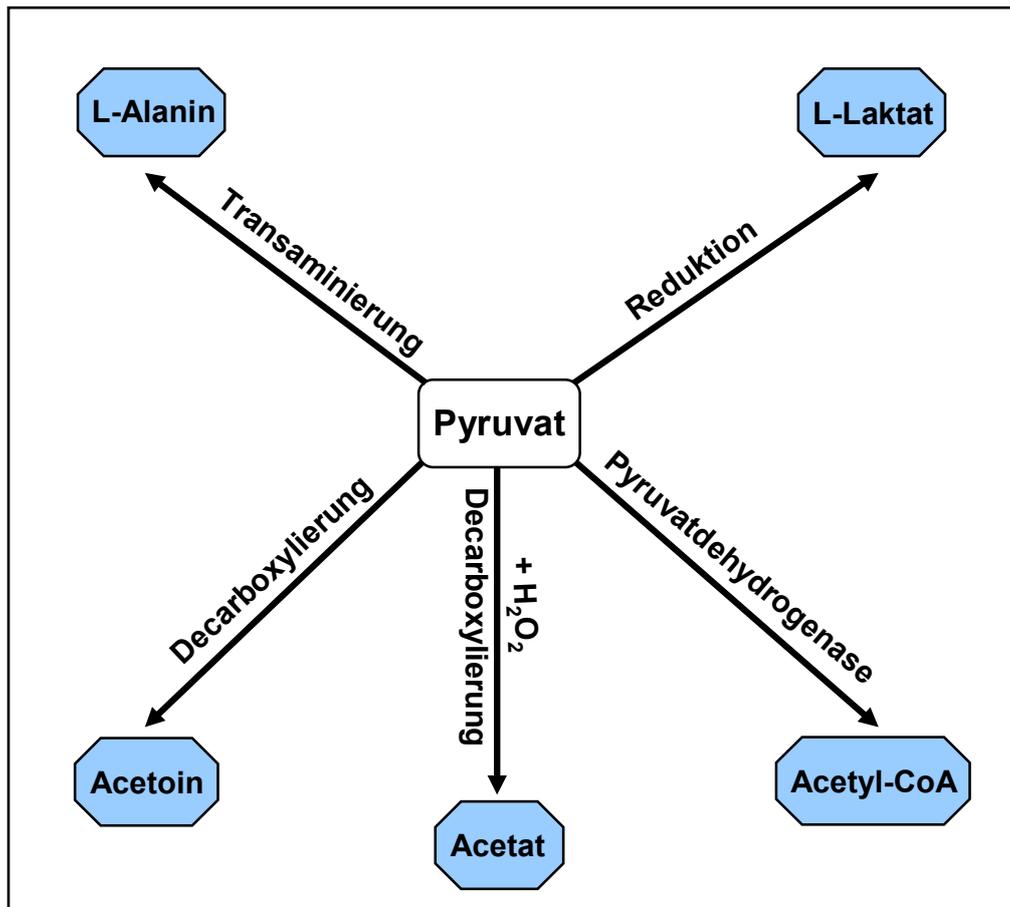


Abb. 6: Pyruvat und seine vielfältigen Reaktionen. Einzelheiten im Text.

Bedeutung des Pentosephosphatweges in Tumorzellen

Für eine schnelle Zellvermehrung müssen Bausteine für Zellmembranen, Nucleinsäuren und Proteine bereitgestellt werden. Diese liefert u. a. der Pentosephosphatweg, abgekürzt PPW. Glucose wird nicht nur über den Embden-Meyerhof-Weg (= Glykolyse) sondern auch über den PPW abgebaut. Der oxidative Teil des PPW liefert NADPH als Reduktionsäquivalent für die Biosynthese von Fettsäuren und Steroiden. Als Endprodukt des ersten Teils entsteht Ribulose-5-Phosphat. Dieses wird im zweiten, nicht-oxidativen Teil des PPW durch das Enzym Epimerase in Xylulose-5-Phosphat umgelagert. Ribulose-5-Phosphat kann auch durch eine Isomerase in Ribose-5-Phosphat umgebaut werden und dient dann als Grundbaustein für die Bildung von Nucleinsäuren (Weinberg und Chandel 2009). Xylulose-5-Phosphat wird durch die Enzyme Transketolase und Transaldolase zerlegt und umgebaut. Als Endprodukte entstehen Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, welche wieder der Glykolyse zugeführt werden können (Abb.3).

1.2.4 Bedeutung von Glutamin für Tumorzellen

Unter allen freien Aminosäuren ist Glutamin Hauptbestandteil im menschlichen Blutplasma. In der sog. Glutaminolyse wird Glutamin durch das Enzym Glutaminase zu Glutamat abgebaut. Glutamat wird zu α -Ketoglutarat umgesetzt und in den Zitratzyklus eingespeist. Diese Auffüllreaktion (= Anaplerose) liefert somit Metabolite für die Aufrechterhaltung des Zitratzyklus. Das so in den Zitratzyklus eingeschleuste Glutamin kann über Malat in Pyruvat decarboxyliert werden, wobei NADPH als Reduktionsäquivalent gebildet wird (Dang 2010). Der Stoffwechsel der Aminosäure Glutamin liefert Stickstoff für die Synthese von Purinen, Pyrimidinen und nichtessentiellen Aminosäuren. Glutamat kann aber auch direkt durch das Enzym Glutathion-Cystein-Ligase in GSH (reduziertes Glutathion) umgebaut werden (Cairns et al. 2011). Der Glutaminstoffwechsel (Abb. 7) ist für proliferierende Zellen also eine wichtige Ergänzung zur Glykolyse, sowohl für die Synthese von Makromolekülen als auch für die Aufrechterhaltung des Redoxstatus. In Glioblastomzellen wurde das Onkogen c-Myc als treibende Kraft für die Glutaminolyse identifiziert (Wise et al. 2008).

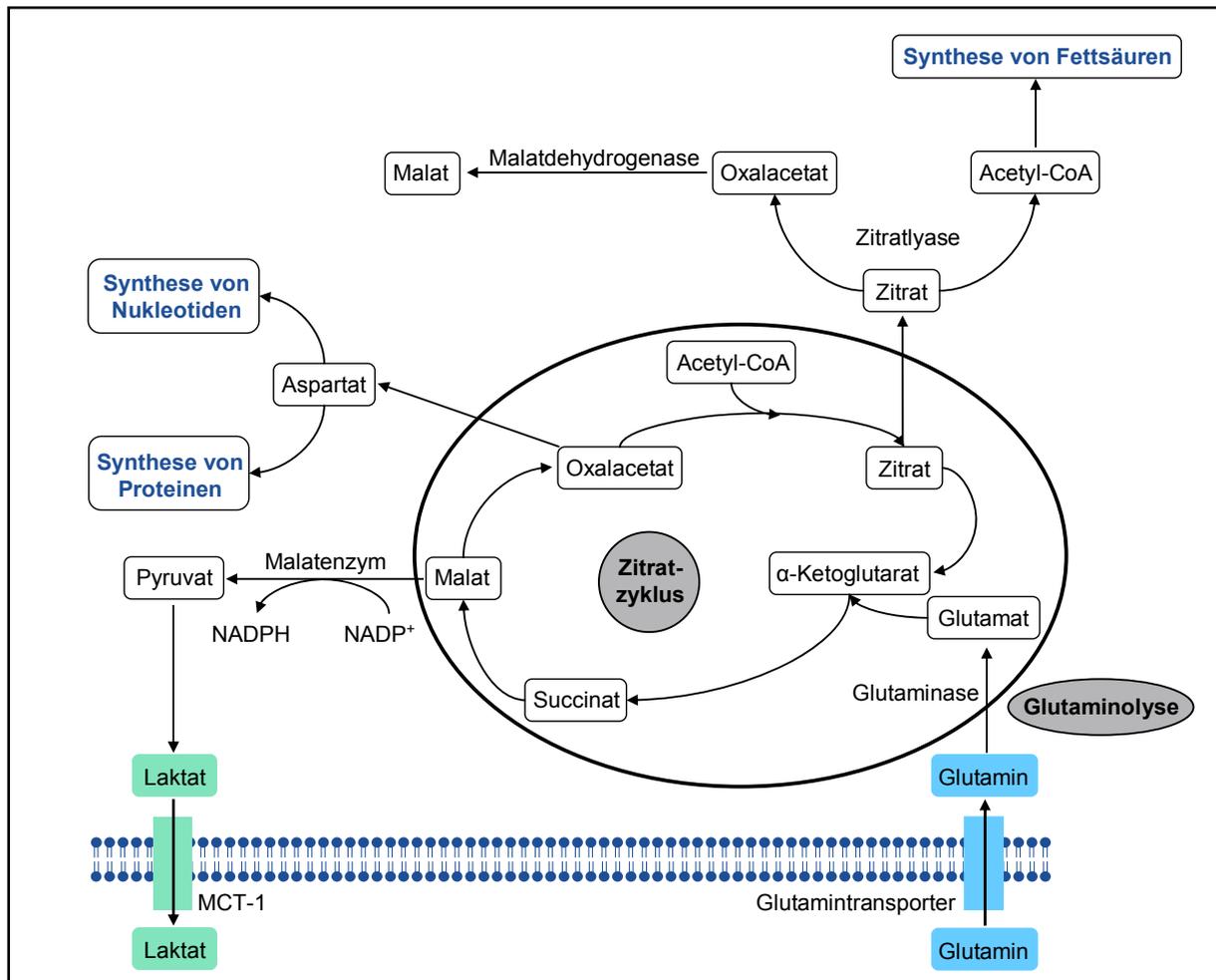


Abb. 7: Bedeutung von Glutamin für den Tumorstoffwechsel.

Das Schema basiert auf den Daten von Blouin et al. 2010 und DeBernardis et al. 2007. Einzelheiten siehe Text.

1.2.5 Milchsäure

Durch die gesteigerte Glykolyserate fallen großen Mengen an Milchsäure (Laktat) an. Die hohe Laktatproduktion gilt als prognostisch schlechter Parameter (Walenta et al. 2000) und korreliert mit erhöhter Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie (Ziebart et al. 2010). Ein Vorteil für Tumorzellen ist die Ansäuerung der Umgebung durch die anfallende Milchsäure. Diese führt zum Untergang der extrazellulären Matrix und der umgebenden Zellen und erleichtert damit Invasion und Metastasierung von Krebszellen (Gatenby und Gillies 2004, Gillies und Gatenby 2007). Die Degradation der extrazellulären Matrix durch die Säurewirkung ermöglicht ferner das Einsprossen neuer Gefäße als Antwort auf angiogentische Faktoren, welche die Tumorzellen sezernieren (Hunt et al. 2007). Weiterhin hemmt ein saures Mikromilieu verschiedene Immunzellen (Lardner 2001), z. B. auch zytotoxische T-Zellen (Fischer et al. 2007). In tumorassoziierten Fibroblasten bewirkt Laktat die

Synthese von Hyaluronsäure. Dieses Glycosaminglykan fördert die Zellmotilität und erleichtert damit die Metastasierung (Stern et al. 2002). Laktat besitzt antioxidative Eigenschaften und schützt vor freien Radikalen (Groussard et al. 2000), ein weiterer Vorteil für Tumorzellen.

Sonveaux et al. stellten ein symbiotisches Modell zum Laktatstoffwechsel in Tumorzellen vor. Dieses basiert auf der Annahme, dass in soliden Tumoren sowohl hypoxische als auch gut oxygenierte Areale existieren. Tumorzellen in hypoxischen Bereichen verwerten vor allem Glucose, welches in der Glykolyse abgebaut wird, wobei Laktat entsteht. Nach Warburgs Hypothese bevorzugen auch oxygenierte Tumorzellen Glucose als Substrat, welches sie ebenfalls in der Glykolyse abbauen. Das Modell von Sonveaux schlägt vor, dass Laktat von hypoxischen Tumorzellen über den Transporter MCT-4 sezerniert wird und entlang eines Konzentrationgradienten in Richtung Blutgefäß, also zu den oxygenierten Tumorebenen diffundiert. Diese aeroben Tumorzellen nehmen Laktat über den MCT-1-Transporter auf und bauen es durch das Enzym Laktatdehydrogenase B (LDH-B) in Pyruvat um. Pyruvat kann dann in den Mitochondrien oxidiert werden (Sonveaux et al. 2008). Eine Auswahl der Wirkungsweisen von Laktat ist in Abbildung 8 dargestellt.

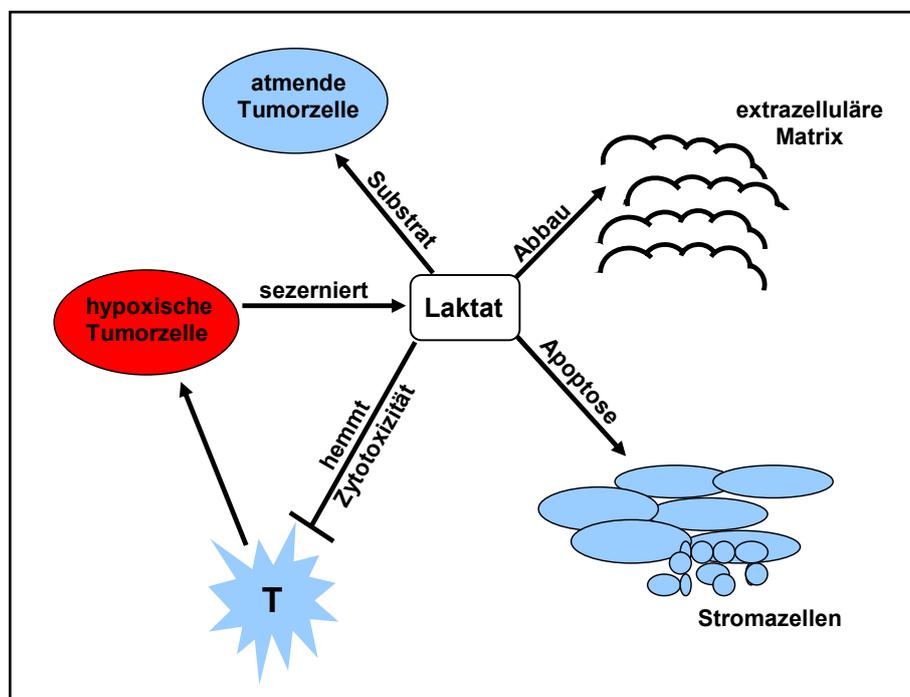


Abb. 8: Bedeutung von Laktat/Milchsäure.

Gezeigt ist eine Auswahl der Wirkungsweisen von Laktat in Bezug auf die Tumorgenese.

1.2.6 Schutz vor reaktiven Sauerstoffradikalen

Wie schon oben erwähnt, sind Tumorzellen im Vergleich zu normalen Zellen einem starken oxidativen Stress ausgesetzt (Burdon 1995, Szatrowski et al. 1991). Das im PPW gebildete NADPH schützt die Zelle indirekt vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), da es für die Bildung von reduziertem Glutathion benötigt wird. (Levine und Puzio-Kuter 2010). Glutathion (GSH) ist der wichtigste Radikalfänger in Zellen. Es kann Elektronen aufnehmen und wird dadurch zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert. Das Enzym Glutathionreduktase benötigt NADPH, um GSSG wieder zu GSH zu reduzieren und damit den Radikalfänger zu recyceln.

1.2.7 Der besondere Tumorstoffwechsel als Therapieoption

Wie oben beschrieben, unterscheidet sich der Stoffwechsel von Tumorzellen in vielerlei Hinsicht von dem ihres gesunden Ursprungsgewebes. Diesen veränderten Stoffwechsel als möglichen therapeutischen Ansatz zu nutzen, gewannen in den letzten Jahren an Bedeutung. Zum einen bietet sich die Manipulation der Signalwege an, die in Tumorzellen überaktiviert oder unterdrückt sind. Zum anderen stellen die involvierten Enzyme des Energiestoffwechsels ein direktes Ziel spezifischer Inhibitoren dar (Tennant et al. 2010). Eine attraktive Möglichkeit wäre hier, die Glykolyse an verschiedenen Stellen gezielt zu hemmen. Auch die Hemmung des Pentosephosphatweges und der Glutaminolyse stellen mögliche Ansätze einer zielgerichteten neuen Tumorthherapie dar. Ebenso kann der oxidative Abbau von Pyruvat in den Mitochondrien durch bestimmte Substanzen angeregt werden. Die Idee ist also durch die gezielte Störung des Tumorstoffwechsels Krebszellen selektiv abzutöten. Einzelne hierzu denkbare Substanzen wurden schwerpunktmäßig in der vorliegenden Arbeit untersucht und werden weiter hinten im Detail vorgestellt.

1.3 Ziele dieser Arbeit

1. Testung verschiedener Substanzen, welche in den charakteristischen Stoffwechsel bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen und Analyse ihrer Wirkung auf verschiedene Tumorzelllinien und mehrere benigne primäre Zellarten.
2. Vergleich verschiedener Testsysteme zur Bestimmung der Vitalität von Zellen.
3. Berechnung von Hemmkonzentrationen mit verschiedenen Methoden für die Beurteilung der Wirkung von potenziell zytotoxischen Substanzen.
4. Quantifizierung der Milchsäureproduktion von malignen und benignen Zellen im Zellkulturüberstand nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen.
5. Charakterisierung der verwendeten malignen und benignen Zellen. Untersuchung der Glucoseaufnahme.
Immunhistochemische Charakterisierung.
6. Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die Expression von Transkriptionsfaktoren, Stoffwechseltransportern und Enzymen.

Die einzelnen Ziele werden im Folgenden näher beschrieben.

Ziel 1:

Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten wurden in den letzten Jahren veröffentlicht, die sich mit dem besonderen Tumorstoffwechsel als therapeutischen Ansatz beschäftigen (zusammengefasst in Tennant et al. 2010, Sattler et al. 2010). Einige der getesteten Substanzen (2-DG, 3-BrPA, DCA) erwiesen sich *in vitro* für einige Tumorzelllinien als vielversprechend. Dennoch ist die Datenlage bezüglich der Wirkung dieser Stoffe auf normale Körperzellen lückenhaft bzw. nicht reproduzierbar. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Substanzen untersucht, die an verschiedenen Stellen des Stoffwechsels eingreifen und zwar auf unterschiedlichen Tumorzelllinien und mehreren benignen Zellen. Hierdurch sollte eine selektive Zytotoxizität bzw. Hemmung der Tumorzellproliferation herausgearbeitet werden. In der Literatur ist beschrieben, dass die Hemmung eines einzelnen Stoffwechselweges wahrscheinlich nicht ausreicht, um Tumorzellen abzutöten (Pelicano et al. 2006, Gatenby und Gillies 2007). Daher wurde auch die Wirkung von Kombinationen zweier Substanzen, die jeweils an verschiedenen Stoffwechselwegen angreifen, untersucht.

1.4 Verwendete Substanzen

Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren einzelner Stoffwechselschritte wurden hinsichtlich ihrer selektiven Hemmung von Tumorzellen untersucht. Die Substanzen können aufgrund ihrer Wirkungsweise in drei Gruppen eingeteilt werden.

- Zur ersten Gruppe gehören Inhibitoren, die in verschiedene Abschnitte der Glykolyse eingreifen, in dem sie Enzyme hemmen oder als kompetitiver Inhibitor wirken und so diesen energieliefernden Stoffwechselweg blockieren.
- Die zweite Gruppe beinhaltet Substanzen, die an den Mitochondrien angreifen. Hier hemmen sie verschiedene Enzymkomplexe oder wirken als Entkoppler des elektrochemischen Gradienten an der Mitochondrienmembran.
- Die dritte Gruppe umfasst Substanzen, die den Pentosphosphatweg und den Glutaminstoffwechsel hemmen und in verschiedene Signalwege des Stoffwechsels eingreifen.

Die Substanzen werden im Folgenden ausführlich vorgestellt.

1.4.1 Glykolyseinhibitoren

Es wurden folgende Inhibitoren getestet, die an verschiedenen Teilschritten der Glykolyse angreifen:

2-Deoxyglucose (2-DG)

Dieses Glucoseanalogon besitzt im Unterschied zu Glucose am C_2 -Atom ein Wasserstoffatom anstatt einer Hydroxylgruppe (Abb. 9).

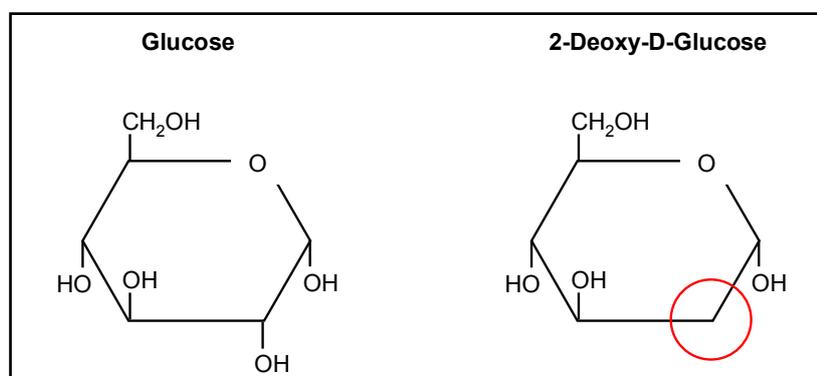


Abb. 9: Glucose und 2-Deoxy-D-Glucose.

Nach Aufnahme in die Zelle wird 2-DG durch das Enzym Hexokinase zu 2-DG-P phosphoryliert. Die weitere Isomerisierung zu Fructose-6-phosphat durch Glucose-6-

phosphat-Isomere ist jedoch blockiert (Wick et al. 1957). 2-DG-P akkumuliert folglich in der Zelle und führt zu einer kompetitiven Hemmung der Hexokinase. Hierdurch wird der Glukosemetabolismus bereits in einem sehr frühen Schritt gehemmt und die Produktion von ATP über die Glykolyse und die Produktion von NADPH über den PPW blockiert (Dwarakanath und Jain 2009). Die Zelle verarmt an Energie und Reduktionsäquivalenten. Die Effektivität von 2-DG hängt von der Konzentration der vorhandenen Glucose ab, da diese beiden Moleküle um die gleichen Transporter und Enzyme konkurrieren (Pelicano et al. 2006). Ein weiterer Wirkmechanismus von 2-DG, der zum Zelltod in einigen Tumorzellen führt, ist die Behinderung der N-Glykosylierung. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu Mannose wird 2-DG in die wachsende Dolicholphosphat-gebundene Mannosekette eingebaut. Diese veränderten Oligosaccharide werden nicht auf Proteine übertragen (Datema und Schwarz 1979). Dadurch häufen sich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zellen fehlgefaltete Proteine an, was zu sog. ER-Stress und schließlich zur Apoptose führt (Kang und Hwang 2005). Mit zunehmender Transformation werden Tumorzellen gegenüber 2-DG sensitiver (Ramanathan et al. 2005), was diese Substanz als hoffnungsvolles Therapeutikum für besonders maligne Erkrankungen erscheinen lässt.

In einer Studie aus dem Jahr 1958 wurde 2-DG intravenös verabreicht in Konzentrationen zwischen 50 und 200 mg/kg Körpergewicht (1 Patient mit Inselzellkarzinom, 1 Patient mit Bronchialkarzinom, 1 Patient mit Nierenzellkarzinom, 5 Patienten mit Leukämie). Die einmalige Infusion hatte keine Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf (Landau et al. 1958). Für einen therapeutischen Effekt sind wahrscheinlich höhere Konzentrationen notwendig, die über einen längeren Zeitraum verabreicht werden müssen. Aufgrund der zu erwartenden Toxizität eines solchen Regimes wurden weitere klinische Studien abgebrochen (Dwarakananth et al. 2009). Obwohl Jiang et al. eine geringere Tumorinzidenz durch die Behandlung mit 0,03 % (w/w) 2-DG in Mäusen nachweisen konnten (Jiang et al. 2008), sind Tennant et al. der Meinung, dass 2-DG als Monotherapie wenig wirksam ist (Tennant et al. 2010) und eher in Kombination mit anderen Therapien eingesetzt werden sollte. Die Kombination von 2-DG mit Chemotherapeutika führte in xenotransplantierten Mäusen zu einer Reduktion des Tumorwachstums (Maschek et al. 2004). Bei der oralen Gabe von 2-DG kombiniert mit Bestrahlung wurde keine Akuttoxizität beobachtet und von Patienten mit Glioblastom gut vertragen (Singh et al. 2005).

Im Jahr 2004 und 2006 begannen klinische Studien der Phase I und II, jedoch mit geringeren Konzentrationen von 2-DG als in der oben genannten Studie, bei verschiedenen soliden Tumoren (NCT00096707, NCT00633087). Die Ergebnisse dieser Studien sind noch nicht veröffentlicht.

3-Bromopyruvat

Das Pyruvatanalogon 3-Bromopyruvat (3-BrPA) zeichnet sich dadurch aus, dass es im Vergleich zu Pyruvat am C₁-Atom ein Br-Molekül besitzt (Abb. 10).

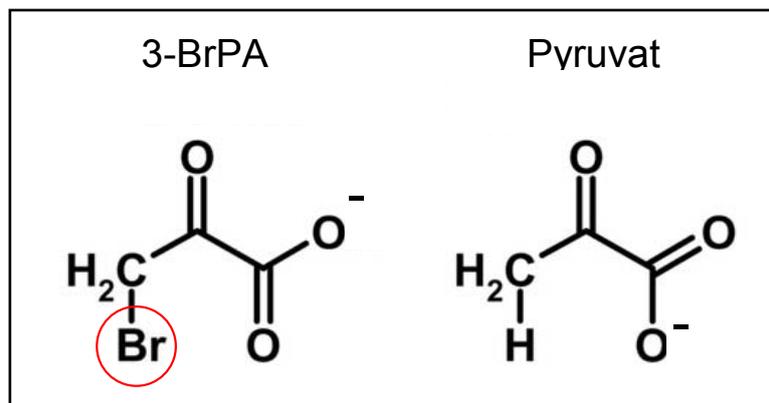


Abb. 10: 3-Bromopyruvat und Pyruvat.

3-BrPA hemmt das Enzym Hexokinase. Der genaue Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt, möglicherweise besteht die hemmende Wirkung von 3-BrPA darin, dass Sulfhydrylgruppen der Hexokinase alkyliert werden, die für die enzymatische Aktivität wichtig sind (Robey et al. 2007). Dieser Inhibitor greift damit ebenfalls sehr früh in der Glykolyse ein und bewirkt eine starke ATP-Depletion, vor allem in Tumorzellen mit mitochondrialen Defekten (Xu et al. 2005). Die alkylierende Eigenschaft vor allem gegenüber thiolhaltigen Cysteinresten in Proteinen (Kreatin, Insulin) und Enzymen (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Glutathion) lassen 3-BrPA an verschiedenen Aspekten der Zelle toxisch wirksam werden. Chen et al. konnten ferner zeigen, dass 3-BrPA die Dissoziation der mitochondriengebundenen Hexokinase bewirkt und dass dadurch Apoptose induziert wird (Chen et al. 2009). Die Substanz ist daher nicht nur ein selektiver Hexokinase-Inhibitor, wie in der Literatur oft postuliert (Ko et al. 2001, Robey et al. 2007), sondern greift in viele Mechanismen der Tumorzelle ein.

Für eine tumorselektive Wirkung von 3-BrPA spricht seine Ähnlichkeit zu Laktat (Abb. 11).

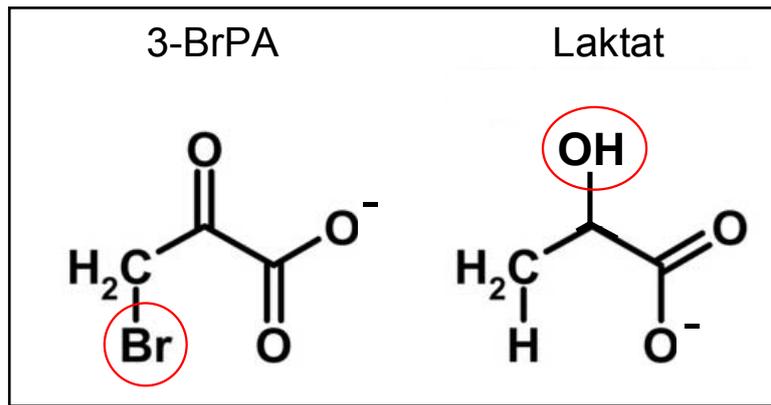


Abb. 11: 3-Bromopyruvat und Laktat.

Pederson nimmt an, dass 3-BrPA vor allem in Tumorzellen aufgenommen wird, da diese vermehrt Laktattransporter auf der Zelloberfläche exprimieren (Pinheiro et al. 2010, Froberg et al. 2001, Pinheiro et al. 2008). Ist 3-BrPA in die Zelle aufgenommen, wirkt es als alkylierende Substanz und hemmt sowohl die Glykolyse als auch die oxidative Phosphorylierung (Pedersen 2007). Entsprechend berichteten Ko et al. von einer vollständigen Tumorremission ohne Nebenwirkungen in Ratten nach intraperitonealer Applikation von 3-BrPA (Ko et al. 2004).

Die Kombination von 3-BrPA mit Rapamycin, einem Inhibitor des mTOR-Signalweges, ergab einen synergistischen Effekt auf Lymphom- und Leukämiezellen (Xu et al. 2005). Meng et al. zeigten, dass die antiproliferative Wirkung von 3-BrPA nicht auf eine spezifische Hemmung der Glykolyse zurückzuführen ist. Zudem konnte kein Unterschied in der Wirkung von 3-BrPA zwischen normoxischen und hypoxischen Zellen, von denen man annimmt, dass sie sensitiver gegenüber Glykolyseinhibitoren sind, festgestellt werden (Meng et al. 2008). 3-BrPA wurde bisher nicht in Humanstudien getestet, womöglich wegen der geringen Aussicht es als potenzielles, finanziell erfolgreiches Tumorthapeutikum einsetzen zu können und aufgrund von Bedenken, weil es sich um eine halogenierte Substanz mit zu unspezifischer Wirkung handelt.

Iodoacetat

Iodoacetat ist ein alkylierendes Agens und hemmt das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) irreversibel (Sabri und Ochs 1971). Iodoacetat bildet mit essentiellen Cysteinresten im aktiven Zentrum der GAPDH Thioether-Bindungen, so dass eine Reaktion mit dem physiologischen Substrat der GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat, nicht mehr möglich ist (Schmidt und Dringen 2009).

GAPDH kann an NAD^+ bzw. NADH und an DNA und RNA binden und ist daher neben seiner Rolle in der Glykolyse in viele zelluläre Prozesse involviert, wie z. B. Endozytose, Membranfusion, nukleärer Transport von tRNA, DNA-Replikation- und Reparatur (zur Übersicht siehe Pelicano et al. 2006). GAPDH ist in verschiedenen Pankreastumorzelllinien überexprimiert (Schek et al. 1988). Auch in Patientenproben von kolorektalem Karzinom (Yeh et al. 2008) und Prostatakarzinom (Rodinelli et al. 1997) war die Expression von GAPDH erhöht. Iodoacetat hemmte *in vitro* die Zellproliferation von murinen Neuroblastomzellen (Andrés et al. 1996) und Pankreaskarzinomzellen (Bhardwaj et al. 2010). In verschiedenen Übersichtsarbeiten wird Iodoacetat als Inhibitor der Glykolyse für den klinischen Einsatz diskutiert (Scatena et al. 2008, Pathania et al. 2009), befindet sich aber noch im vorklinischen Teststadium.

Natriumfluorid

Natriumfluorid (NaF) hemmt das Enzym Enolase (Warburg und Christian 1941). Die Enolase ist ein Metalloenzym und benötigt Mg^{2+} -Ionen als Cofaktor. Enolase katalysiert die reversible Dehydratation von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat. Der hemmende Effekt von Fluorid beruht darauf, dass in Anwesenheit von Phosphat ein inaktiver Magnesium-Fluorid-Phosphat-Komplex gebildet wird (Guminska und Sterkowicz 1976). Beim Menschen existieren drei Isoformen. Enolase 1 (α -Isoform) wird in fötalen Zellen und in nahezu allen adulten Geweben exprimiert. Enolase 2 (γ -Isoform) findet sich in Neuronen und Enolase 3 (β -Isoform) wird in der gestreiften Muskulatur exprimiert. Enolase ist ein multifunktionelles Enzym, das in der Glykolyse eine Rolle spielt, aber auch in der Kontrolle des Zellwachstums und Toleranz gegenüber Hypoxie involviert ist (Scatena et al 2008). Unter hypoxischen Bedingungen wird es verstärkt exprimiert (Semenza et al. 1996). Enolase findet sich an der Zellmembran, im Zytoplasma und im Zellkern. Auf mRNA- und/oder Proteinebene ist Enolase 1 in vielen Tumoren, u. a. Gehirn-, Brust- und Magentumoren, überexprimiert (zur Übersicht siehe Capello et al. 2011). Enolase 1, welche an der Zelloberfläche exprimiert wird, fördert zudem die Migration und Metastasierung von Tumorzellen. Diese membranständige Enolase 1 bindet Plasminogen. Plasminogenaktivatoren spalten Plasminogen zu aktivem Plasmin. Zu den Substraten der Serin-Protease Plasmin zählen u. a. Fibrin, Komponenten der extrazellulären Matrix und Matrixmetalloproteasen. Es kommt zum Abbau von

extrazellulärer Matrix, wodurch Migration und Metastasierung von Tumorzellen erleichtert wird (Liu und Shih 2007). Über den Einsatz von NaF *in vivo* wurden keine Daten gefunden.

Oxamat

Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Tetramer das aus den Untereinheiten A und B zusammengesetzt ist. Beim Menschen existieren fünf Isoformen der LDH (LDH-1-5), die sich durch verschiedene Kombinationen der beiden Untereinheiten unterscheiden. Tab. 2 zeigt die Zusammensetzung der einzelnen Isoenzyme.

Tab. 2: Isoenzyme der Laktatdehydrogenase.

Isoenzym	Untereinheiten			
LDH-1	B	B	B	B
LDH-2	B	B	B	A
LDH-3	B	B	A	A
LDH-4	A	A	A	B
LDH-5	A	A	A	A

Zusammensetzung der verschiedenen Isoenzyme der Laktatdehydrogenase aus den beiden Untereinheiten A und B. LDH-1 wird auch als LDH-B bezeichnet. LDH-5 wird auch als LDH-A bezeichnet.

LDH-5, auch bekannt als LDH-A, katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu L-Laktat. Gleichzeitig wird NADH zu NAD⁺ oxidiert, welches für die Aufrechterhaltung der Glykolyse notwendig ist. Expression und Aktivität der LDH-A sind in vielen Tumoren gesteigert (Balisky et al. 1983, Hilf et al. 1976). In Gewebeproben von Patienten mit Magenkarzinom war LDH-A überexprimiert und ging mit einer schlechten Prognose einher (Kolev et al. 2008). Oxamat ist strukturell ähnlich zu Pyruvat (Abb. 12) und hemmt LDH-A kompetitiv.

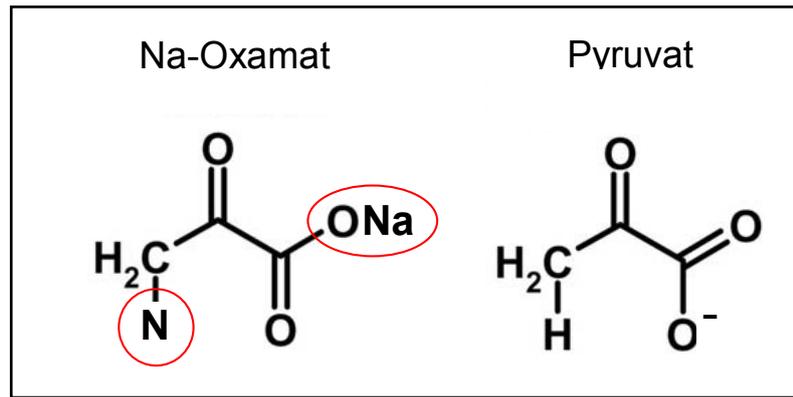


Abb. 12: Oxamat und Pyruvat.

Die Zelle verarmt an NAD^+ und Glycerinaldehyd-3-phosphat staut sich an. Dadurch fällt wiederum vermehrt Fructose-1,6-bisphosphat an welches die Phosphofruktokinase hemmt und so die Glykolyse blockiert (Goldberg und Colowick 1965). Ebenso hemmt Oxamat die Aspartat-aminotransferase (Thronburg et al. 2008). Die Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass Oxamat selektiv das Wachstum von MDA-MB 231-Zellen hemmte im Vergleich zu normalen humanen Brustepithelzellen und auch *in vivo* das Tumorwachstum verlangsamt. Die Blockade der LDH-A durch ein sog. *small molecule* hemmte das Tumorwachstum (B-Zell-Lymphom und Pankreastumor) im Mausmodell (Le et al. 2009). In chemoresistenten Brustkrebszellen führte die Hemmung der LDH-A durch Oxamat zu einem besseren Ansprechen gegenüber dem Chemotherapeutikum Taxol (Zhou et al. 2010).

Die Expression von LDH-A wird durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 α stimuliert (Semenza et al. 1996), welcher in vielen Tumoren überexprimiert ist.

1.4.2 Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen

Rotenon

Rotenon ist ein Pyranofurochromon-Derivat und kommt in Insektizide liefernden Pflanzen der Gattung *Derris* (Tubawurzel) und *Lonchocarpus* (Barbascowurzel) vor. Das lipophile Rotenon passiert ungehindert Zellmembranen und reichert sich in Zellorganellen, wie z. B. Mitochondrien an (Di Monte 2003). Dort hemmt es den Elektronentransport im Komplex I der Atmungskette, indem es an die PSST-Untereinheit der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase bindet (Schuler und Casida 2001). Komplex I ist der erste Enzymkomplex in der mitochondrialen Atmungskette. Hier werden Elektronen eingeschleust, NADH oxidiert und Ubichinon reduziert. Die

freiwerdende Redoxenergie wird genutzt, um vier Protonen aus der Matrix auf die cytosolische Seite zu transportieren. Durch die Reaktionen im Komplex I entstehen Sauerstoffradikale (Boveris und Chance 1973). Rotenon unterbricht die Redoxreaktion im Komplex I und es kommt zu einem verstärkten Elektronenleck. Die Elektronen diffundieren in den Intermembranraum und die mitochondriale Matrix und reduzieren molekularen Sauerstoff zu Superoxid-Radikalen (Pitkänen und Robinson 1996). Wenn die vermehrte Radikalbildung durch antioxidative Mechanismen nicht kompensiert werden kann, führt dies zur Apoptose in Tumorzellen (Wallace et al. 2010). So konnten schon Higuchi et al. zeigen, dass die Behandlung der Leukämiezelllinie ML-1a mit 10 μM Rotenon eine Apoptose auslöste (Higuchi et al. 1998). In humanen Leukämiezellen führte die Behandlung mit Rotenon ferner zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch der Zellen und die Bildung von Sauerstoffradikalen stieg (Pelicano et al. 2003). Laurent et al. konnten zeigen, dass 10 μM Rotenon in Tumorzellen zu einer gesteigerten Produktion von Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) führte, jedoch nicht in nichtransformierten Fibroblasten NIH 3T3 (Laurent et al. 2005). Die Behandlung der humanen B-Zell-Lymphom-Linie PW mit 100 nM Rotenon blockierte den Elektronentransport im Komplex I, hatte aber keine Auswirkungen auf die Zellvitalität. Erst Rotenon-Konzentrationen von 1 - 5 μM führten zu Zellzyklusarrest und Apoptose (Armstrong et al. 2001). Fogal et al. identifizierten das Protein p32 als wichtigen Regulator des Tumorstoffwechsels. Dieses Protein ist in vielen Tumoren überexprimiert. Interessanterweise ist die oxidative Phosphorylierung in diesen Zellen vorherrschend. Wird p32 in diesen Zellen durch *knock down* gehemmt, kippt der Stoffwechsel in Richtung Glykolyse und das Wachstum der Tumorzellen wird *in vitro* und teilweise auch *in vivo* gehemmt. Der gleiche Effekt wurde durch Rotenon *in vitro* und *in vivo* erzielt (Fogal et al. 2010). Warburgs Hypothese, dass Tumorzellen auf die Glykolyse angewiesen sind, weil die Mitochondrien angeblich defekt seien, scheint nicht haltbar, da mehrere Arbeiten zeigen konnten, dass Tumorzellen durchaus einen oxidativen Stoffwechsel betreiben (Rodriguez-Enriquez et al. 2006, Guppy et al. 2002, Sonveaux et al. 2008) und dass die Mitochondrien intakt sind (Levine und Puzio-Kuter 2010). Diese Zellen sind gegenüber Hemmstoffen der oxidativen Phosphorylierung wahrscheinlich sensibel und machen hier den Einsatz von Rotenon zu einer zukünftigen Option.

Oligomycin

Das Antibiotikum Oligomycin hemmt die F_1F_0 -ATPase in den Mitochondrien, indem es den membranständigen F_0 -Teil der ATP-Synthase blockiert. Oligomycin ist ein nicht-selektiver Inhibitor, da sowohl die ATP-Synthase als auch die in umgekehrter Richtung ablaufende ATP-Hydrolyse (für den Aufbau eines Protonengradienten bei niedrigem Membranpotential unter Hydrolyse von ATP) gehemmt wird (Grover et al. 2008). Durch diesen F_0 -Teil der ATP-Synthase fließen die Elektronen. Oligomycin verschließt diesen Protonenkanal (Novgorodov et al. 1989) und hemmt damit die Atmungskette und die damit gekoppelte ATP-Generierung. Als Ausweichreaktion müssen Zellen ihr ATP über eine vermehrte Glykolyse gewinnen und es konnte nachgewiesen werden, dass Oligomycin die Glykolyserate steigert (Hao et al. 2010).

2,4-Dinitrophenol

2,4-Dinitrophenol ist eine schwache lipophile Säure und wirkt als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung. 2,4-DNP transportiert Protonen aus dem Intermembranraum in die Matrix der Mitochondrien. Dadurch bricht der über der inneren Mitochondrienmembran aufgebaute elektrochemische Protonengradient zusammen und führt zur Entkopplung von Zellatmung und ATP-Synthase. Dabei wird sehr viel Energie in Form von Wärme freigesetzt (Skulachev 1998; Hanstein 1976). Bei einer Konzentration von 24 μM verdreifacht sich die Protonen(H^+)-Leitfähigkeit der Innenmembran von Mitochondrien (Schönfeld 2002). Der Wirkmechanismus von 2,4-DNP ist in Abb. 13 dargestellt.

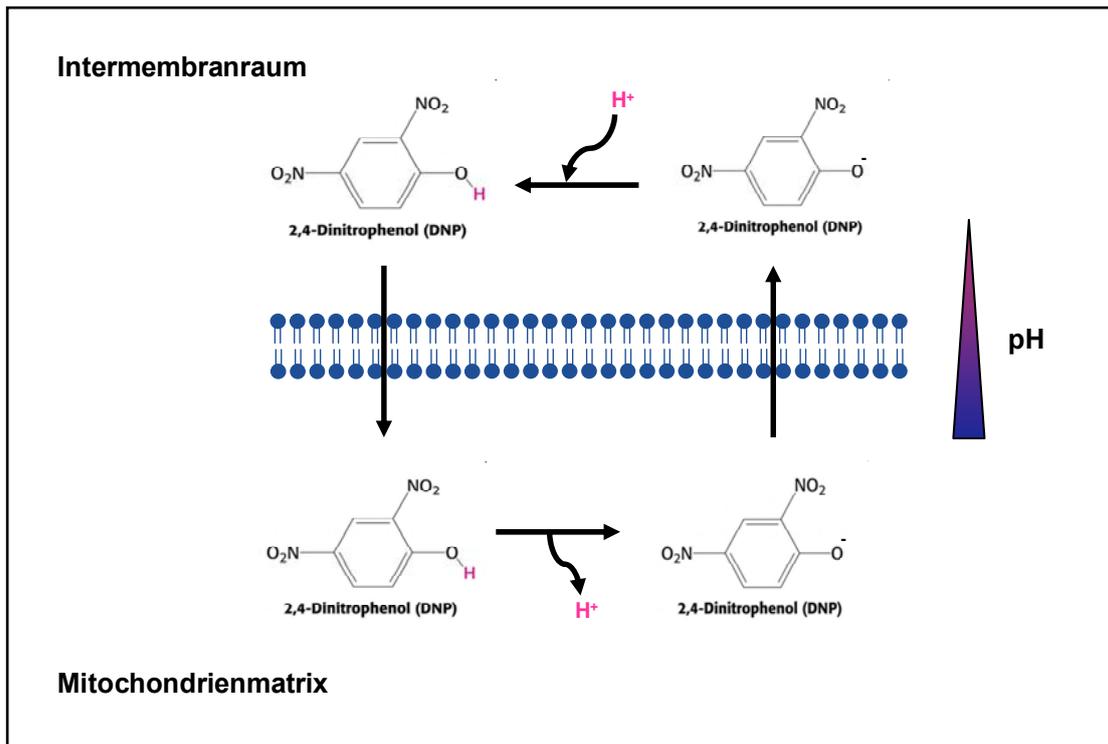


Abb. 13: Wirkmechanismus von 2,4-Dinitrophenol.

2,4-DNP durchdringt die Phospholipidmembran und dissoziiert auf der alkalischen Seite (Mitochondrienmatrix). Das Phenolat diffundiert wegen den Konzentrationsgradienten zurück in den sauren Intermembranraum und nimmt ein Proton (H⁺) auf. Daraus resultiert ein Protonen(H⁺)-Fluss.

Die Wirkung von 2,4-DNP hängt von den der Zelle zur Verfügung stehenden Substraten ab, wie in Experimenten an isolierten Hepatozyten gezeigt wurde. Durch Substrate, die vor allem in Mitochondrien oxidiert werden (z. B. Fettsäuren) blieb die Oxidationsrate nach Behandlung mit 2,4-DNP lange auf einem hohen Niveau, der Protonengradient und die ATP-Synthese sanken vorübergehend. Bei zytosolisch oxidierten Substraten (z. B. Zucker) stieg nach Behandlung mit 2,4-DNP die Oxidationsrate nur kurz an, Protonengradient und ATP-Synthese nahmen ab. Das bedeutet, dass die Energieverschwendung im Sinne einer gesteigerten Oxidation nur anfangs gesteigert ist, wenn der Zelle überwiegend Zucker als Substrat zur Verfügung steht. Der Abfall des Protonengradienten ist hierbei jedoch am größten (Leverve et al 1998; Leverve und Fontaine 2001; Sibille et al. 1998; Sibille et al. 2001). In einem *in vitro*-Experiment mit humanen Lungenadenokarzinomzellen induzierte 2,4-DNP einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase, steigerte die Bildung von intrazellulären ROS und die Apoptoserate (Han et al. 2008). Bei Untersuchungen mit murinen Melanomzellen kam es durch Inkubation der Zellen mit 163 μM 2,4-DNP zu einer Hemmung der Zellproliferation (Andres et al. 1996). In Jurkat-Zellen verstärkt 2,4-DNP das FAS/Apo-1/CD-95-Signal und führt dadurch zu Apoptose (Linsinger et

al. 1999). Ein weiterer Mechanismus, wie 2,4-DNP Apoptose auslösen kann ist die Störung des Membranpotentials (Vier et al. 2004; Decaudin et al. 1997). Auch für den kombinierten Einsatz mit klassischen Chemotherapeutika ergaben sich für 2,4-DNP *in vitro* hoffnungsvolle Ergebnisse. In BCR/ABL-exprimierenden Zellen verstärkte 2,4-DNP die apoptoseinduzierende Wirkung von Imatinib (Kurosu et al. 2007).

Neben seiner entkoppelnden Wirkung kann DNP auch verschiedene Enzyme beeinflussen. So wird die ATPase-Aktivität je nach DNP-Konzentration in verschiedenen humanen Tumorzellen unterschiedlich beeinflusst. Konzentrationen im Bereich 20 - 100 μM wirken stimulierend, höhere Konzentrationen eher hemmend auf die ATPase (Knowles 1982). Weiterhin kann es durch 2,4-DNP auch zu Veränderungen der Membranstruktur kommen. Die Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass 54 μM DNP in den ersten 24 Std. die lysosomale Funktion extrem steigert (Andres et al. 1996).

DNP scheint zudem den Elektrolythaushalt zu beeinflussen. In Mitochondrien, welche aus Tumoren isoliert wurden führte DNP zum Efflux von K^+ und Mg^{2+} (Knowles 1982). In Versuchen an isolierten Rattenherzen beobachteten Ganote et al. einen Ca^{2+} -Efflux (Ganote et al. 1984).

Rhodamin 123

Rhodamin 123 wurde als Entkoppler der mitochondrialen Atmung beschrieben (Lampidis et al. 1984). Rhodamin 123 ist ein lipophiles Kation und reichert sich bevorzugt in den Mitochondrien an, da die innere Mitochondrienmembran ein negatives Membranpotenzial aufweist (Johnson et al. 1981, Dairkee und Hackett 1991). Da Tumorzellen im Vergleich zu normalen Epithelzellen ein höheres Plasmamembran- und/oder Mitochondrienpotenzial haben, liegt die Vermutung nahe, dass Rhodamin eine tumorselektive Substanz sein könnte (Modica-Napolitano und Aprile 2001).

In der Literatur finden sich verschiedene Angaben zum genauen Wirkmechanismus von Rhodamin 123. Manche Autoren behaupten, Rhodamin 123 wirke als Entkoppler der mitochondrialen Atmung (Lampidis et al. 1984), andere hingegen nennen als Zielstruktur die F_1F_0 -ATPase (Pathania et al. 2009, Modica-Napolitano et al. 1984). Das höhere Mitochondrienpotenzial in Tumorzellen scheint nur teilweise die bevorzugte Anreicherung von Rhodamin 123 zu erklären. Brouty-Boyé et al. sind der

Meinung, dass unterschiedliche Expressionsmuster des *mdr-1*-Gens für die Anreicherung von Rhodamin in Zellen verantwortlich ist. Sie konnten zeigen, dass die normale Affennierenzelllinie CV-1, welche das *mdr-1*-Gen exprimiert, resistent gegenüber Rhodamin 123 ist. Die von ihnen getesteten Tumorzelllinien, darunter auch MDA-MB 231, exprimierten das *mdr-1*-Gen nicht und waren deutlich sensitiver gegenüber Rhodamin 123 (Brouty-Boyé et al. 1995). In einer Übersichtsarbeit stellt Lan Bo Chen dar, dass das Mitochondrienpotenzial die entscheidende Triebkraft für die Aufnahme von Rhodamin 123 ist. Ionophore, wie Dinitrophenol, zerstören das Membranpotenzial und verhindern die Aufnahme von Rhodamin. Substanzen, die den Elektronentransport in der Atmungskette hemmen, wie z. B. Rotenon, vermindern die Aufnahme von Rhodamin in die Mitochondrien, wenn die Zelle nur eine geringe Glykolyserate aufweist. Auch anaerobe Bedingungen vermindern die Aufnahme (Chen 1988).

In einer Konzentration von 2 μ M führte Rhodamin 123 zu einer Hemmung der Zellproliferation und des ATP-Gehaltes um 50 % in Tumorzellen. Diese Konzentration hatte keine Auswirkungen auf Lymphozyten als benigne Kontrolle (Rodriguez-Enriquez et al. 2006). Auch *in vivo* verlängerte Rhodamin 123 in einer Konzentration von 15 mg/kg (39 μ M) das Überleben von Mäusen mit Ehrlich's Aszites-Tumor und Blasenkarzinom. Die antitumorale Wirkung von Rhodamin 123 wurde hierbei durch 2-DG deutlich gesteigert (Bernal et al. 1983, Liu et al. 2001). Rhodamin erwies sich *in vitro* besonders effektiv in Kombination mit Glykolyseinhibitoren wie 2-DG oder Oxamat (Liu et al. 2001).

Rhodamin 123 wurde bereits in einer klinischen Phase I-Studie bei Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom getestet und als sicher eingestuft. Die Autoren konnten zeigen, dass sich Rhodamin 123 im Tumorgewebe anreicherte (Jones et al. 2005), eine klare Aussage hinsichtlich einer antitumoralen Wirkung in den Patienten konnte jedoch nicht getroffen werden.

Natrium-Dichloracetat

Die Pyruvatdehydrogenase (PDH) ist ein Enzymkomplex aus drei Enzymen, der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Im Menschen sind vier PDK-Isoenzyme beschrieben, die gewebespezifisch exprimiert werden (Popov et al. 1997). PDK-1 findet sich im Herz, in den Inselzellen des Pankreas, der Leber und in der Skelettmuskulatur. PDK-2 wird in allen Geweben exprimiert. In Hoden, Niere und

Gehirn wird vor allem PDK-3 exprimiert. PDK-4 ist in Herz, Skelettmuskulatur, Niere und Inselzellen des Pankreas reichlich vorhanden. PDK-1 wurde als hypoxiesensitives Enzym identifiziert (Kim et al. 2006; Papandreou et al. 2006). Auch PDK-3 wird durch HIF-1 α induziert und führt zu einer Hemmung der mitochondrialen Atmung sowie zu Chemoresistenz (Lu et al. 2008).

Die PDH kontrolliert die Zufuhr von Pyruvat in den Zitratzyklus und ist damit die Schnittstelle zwischen Glykolyse und Glucoseoxidation (McFate et al. 2008). Pyruvat wird durch die PDH schrittweise zu Acetyl-CoA abgebaut. Die Aktivität der PDH ist reguliert durch Substrataktivierung, Endprodukthemmung und reversible Phosphorylierung. Die Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK) phosphoryliert die PDH und inaktiviert sie dadurch. Dephosphorylierung durch die PDH-Phosphatase aktiviert die PDH (Stacpoole 1989). Unter hypoxischen Bedingungen, wie sie häufig in soliden Tumoren vorkommen, ist HIF-1 α aktiviert. Dieser Transkriptionsfaktor erhöht die Glykolyserate, in dem er u. a. die Expression der PDK verstärkt. Dadurch wird die PDH phosphoryliert, also inaktiv, und Pyruvat kann nicht zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Das sich hierdurch anstauende Pyruvat wird nun zu Laktat abgebaut, um einen weiteren Flux durch die Glykolyse zu erlauben (Moreno-Sanchez et al. 2007). Na-Dichloracetat (DCA), ein Salz der Dichloressigsäure, hemmt die PDK und aktiviert damit die PDH (Abb. 14). Untersuchungen der PDK-1 ergaben, dass die DCA-Bindungsstelle in der Helix der N-terminalen Domäne liegt. DCA bewirkt eine Konformationsänderung in der Nukleotid- und in der Lipoylbindungstasche, was schließlich die Kinaseaktivität hemmt (Kato et al. 2007). Der Stoffwechsel wird hierdurch verschoben von der Glykolyse in Richtung oxidative Phosphorylierung, kehrt also den Warburg-Effekt um.

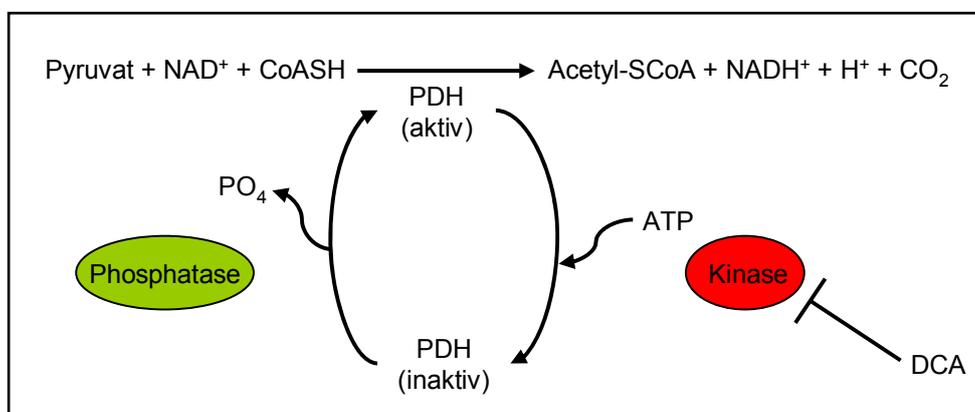


Abb. 14: Hemmung der Pyruvatdehydrogenase-Kinase durch Dichloracetat.
(Verändert nach Stacpoole 1989). Erläuterungen im Text.

Aufsehen erregte DCA im Jahr 2007, als eine kanadische Arbeitsgruppe von vielversprechenden Ergebnissen berichtete. *In vitro* zeigte DCA selektive toxische Wirkung gegenüber mehreren humanen Tumorzelllinien. Die Verabreichung von DCA über das Trinkwasser in einer Konzentration von 75 mg/l an Ratten mit subkutan appliziertem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom reduzierte das Tumorstadium ohne toxische Nebenwirkungen (Bonnet et al. 2007). DCA wurde und wird in klinischen Studien der Phase I und II bei Patienten mit Glioblastom, Kopf-Hals-Tumoren, metastasiertem Brustkrebs und Lungenkarzinom getestet (<http://clinicaltrials.gov>). Erste Ergebnisse über den Einsatz von DCA bei Patienten mit Glioblastom wurden von Michelakis et al. 2010 publiziert (Michelakis et al. 2010). Fünf Patienten erhielten DCA alleine oder in Kombination zur Standardtherapie mit Chemotherapie (Temolozomid) und Bestrahlung. Als Nebenwirkung traten periphere Neuropathien auf, die jedoch reversibel waren. Vier von fünf Patienten erreichten einen stabilen Krankheitsverlauf 15 Monate nach der ersten DCA-Einnahme (Michelakis et al. 2010). Dies macht DCA zu einer sehr aussichtsreichen Substanz für zukünftige Tumorthapien.

1.4.3 Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen

Oxythiamin

Oxythiamin ist ein Thiaminanalogen, das statt der Aminogruppe eine Hydroxylgruppe am Pyrimidinring besitzt (Abb.15).

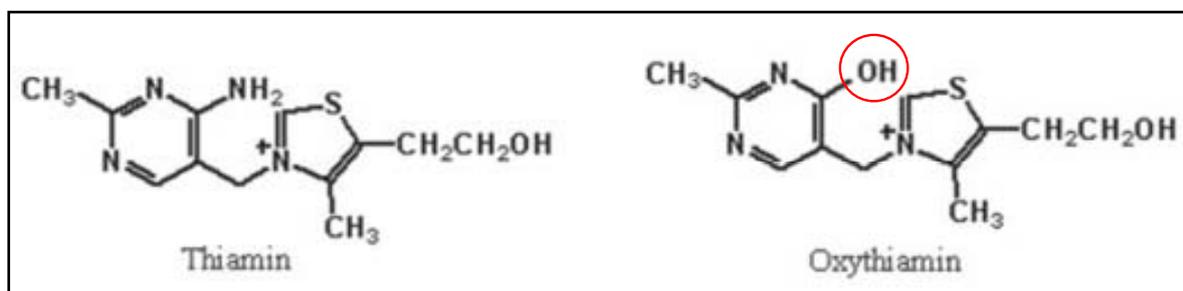


Abb. 15: Thiamin und Oxythiamin. (Übernommen aus Liu et al. 2005).

Oxythiamin hemmt das Enzym Transketolase im Pentosephosphatweg (PPW) und die Pyruvatdehydrogenase in den Mitochondrien (Pelicano et al. 2006). Beide Enzyme benötigen Thiaminpyrophosphat (TPP) als Cofaktor. Die Hemmung der Transketolase ist irreversibel, da Oxythiamin kovalent an das Enzym bindet (Ramos-

Montoya et al. 2006). Oxythiamin wird in der Zelle phosphoryliert und es entsteht ein Diphosphatester, der als starker kompetitiver Inhibitor gegenüber dem natürlichen Cofaktor Thiaminpyrophosphat (TPP) wirkt (Strumilo et al. 1983). Zhang et al. konnten zeigen, dass Oxythiamin ferner den MAP-Kinase-Singalweg beeinträchtigt und mehrere Phosphoproteine hemmt (Zhang et al. 2010). Der nicht-oxidative Teil des Pentosephosphatweges liefert Ribose-5-phosphat für die Synthese von Nukleinsäuren und spielt für die Proliferation von Tumorzellen eine wichtige Rolle (Boros et al. 1997). Ein interessantes Phänomen beschrieben Cascante et al., die zeigen konnten, dass viele Tumorpatienten Thiaminmangelsymptome aufweisen, da Tumore das Vitamin verstärkt mobilisieren (Cascante et al. 2000). Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse mit Oxythiamin klingen vielversprechend, weshalb diese Substanz im Rahmen dieser Arbeit an verschiedenen Tumorzellen und benignen Zellen getestet wurde. In Lewis-Lungenkarzinomzellen hatte Oxythiamin in einer Konzentration von 20 μM zwar keinen Einfluss auf die Zellvitalität, hemmte aber Zellinvasion und -migration (Yang et al. 2010). Die Behandlung von PC-12-Zellen (Pheochromozytom-Zelllinie aus Ratten) mit 100 μM Oxythiamin löste Apoptose aus (Chorny et al. 2007). *In vivo* erwies sich Oxythiamin als stark tumorhemmend. Die Mäuse verloren unter der Behandlung mit Oxythiamin nur minimal an Gewicht und zeigten keine weiteren Nebenwirkungen. (Ramos-Montoya et al. 2006). Erfolgsversprechend sind auch die Ergebnisse von kombinierten Behandlungen mit Oxythiamin und anderen Enzymhemmstoffen (wie Dehydroepiandrosteron) oder Standardchemotherapeutika (z. B. Methotrexat) (Rais et al. 1999, Ramos-Montoya et al. 2006). Oxythiamin verbesserte die Sensitivität primärer Leukämiezellen von Tumorpatienten und xenotransplantierten Tumoren in Mäusen gegenüber Imatinib (Zhao et al. 2010). Daher scheint Oxythiamin eine vielversprechende Substanz für humane Studien zu sein.

DON (6-Diazo-5-oxo-L-norleuzin)

Die Diazoverbindung DON ist eine nicht-proteinogene Aminosäure und wurde aus dem Pilz *Streptomyces* isoliert. Das Glutaminanalogon DON hemmt die mitochondriale Glutaminase im ersten Schritt der Glutaminolyse (Shapiro et al. 1979), mehrere Enzyme der Pyrimidin- (Eidinoff et al. 1958) und Purinsynthese (Rosenbluth et al. 1976), die NAD-Synthase in der Atmungskette (Barclay et al. 1966) und die Asparaginsynthetase (Rosenbluth et al. 1976). Die Hinweise mehrer

sich, dass Glutamin ein wichtiges Energiesubstrat für viele Tumorzellen ist, u. a. für Glioblastomzellen (DeBernardis et al. 2007), HeLa (Reitzer et al. 1979) und Prostatakarzinomzelllinien (Matheson et al. 2007). Wahrscheinlich spielen auch RhoGTPasen im Glutaminstoffwechsel eine Rolle. Ein sog. *small molecule*, das unspezifisch RhoGTPasen blockierte, hemmte auch die Glutaminase in MDA-MB 231-Zellen (Wang et al. 2010). Wu et al. beschrieben, dass die Behandlung mit 50 μ M DON in neuroendokrinen Tumorzellen zu Schäden in den Mitochondrien führte (Wu et al. 1999). Auch Einzelstrangbrüche in der DNA wurden nachgewiesen (Hiramato et al. 1996). Im VM-M3 Tumormodell, einem Mausmodell für systemische Metastasen, wuchs der Primärtumor deutlich langsamer. In Leber, Lunge und Niere wurden keine Metastasen gefunden. Auf die Metastasierung in der Milz hatte DON keinen Einfluss (Shelton et al. 2010). Eine antitumorale Wirkung *in vivo* wurde auch schon sehr früh für Leukämie, Mamma- und Kolonkarzinom im Tiermodell beschrieben (Ovejera et al. 1979). In einer klinischen Studie wurde DON in Kombination mit PEG-PGA (mit Polyethylenglykol modifizierte Pseudomonas 7A Glutaminase-Asparaginase), einem Glutamin-depletierenden Enzym, bei Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren getestet. Die Therapie wurde gut vertragen. Bei einem Patient mit metastasiertem Kolonkarzinom kam es zu einer partiellen Remission. Ein Teil der Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom oder Lungenkarzinom waren zwischen 3 und 12 Monaten progressionsfrei (Mueller C. et al. 2008).

Metformin

Metformin ist ein Antidiabetikum und wird zur Behandlung von Diabetes Typ 2 eingesetzt (Kirpichnikov et al. 2002). Mittlerweile wird es auch wegen seiner tumorhemmenden Wirkung *in vitro* und *in vivo* untersucht. Es wurden verschiedene Mechanismen für die antitumorale Wirkung vorgeschlagen (Abb. 16). Metformin aktiviert die Leberkinase B1 (LKB1), die dann die Adenosin-Monophosphat-aktivierte Protein-Kinase (AMPK) aktiviert. AMPK fungiert in der Zelle als Energiesensor, d. h. droht Zellen ein Energiemangel, welcher sich in einem Anstieg des AMP/ATP-Verhältnisses niederschlägt, wird AMPK aktiviert. Daraufhin werden katabole Prozesse (Glucoseaufnahme, Glykolyse, Fettsäureoxidation) in der Zellen stimuliert und ATP-verbrauchende Prozesse (Synthese von Fettsäuren, Cholesterin, Proteinen) gehemmt (Hadad et al. 2008). Metformin blockiert auch den mTOR-Signalweg,

welcher Zellzyklusprogression, Zellwachstum und Angiogenese reguliert und in vielen Tumoren überaktiviert ist (Menon und Manning 2008). Weiterhin stimuliert Metformin das Tumorsuppressorgen p53, induziert Zellzyklusstopp und Apoptose. Es senkt den Insulinspiegel und hemmt damit den wachstumsfördernden IGF-Signalweg (Jalving et al. 2010). Metformin hemmt ferner den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und die Gluconeogenese aus L-Laktat (Owen et al. 2000). Beschrieben ist auch eine toxische Wirkung gegenüber Tumorstammzellen (Kourelis und Siegel 2011). In einer aktuellen Arbeit konnten Vasquez-Martin et al. diesen Mechanismus der Metforminwirkung aufklären. In der Brustkrebszelllinie MDA-MB 468 unterdrückte Metformin die Expression von CD24, einem Adhäsionsmolekül und Tumorstammzellmarker, welches die Metastasierung von Tumorzellen fördert (Vasquez-Martin et al. 2011).

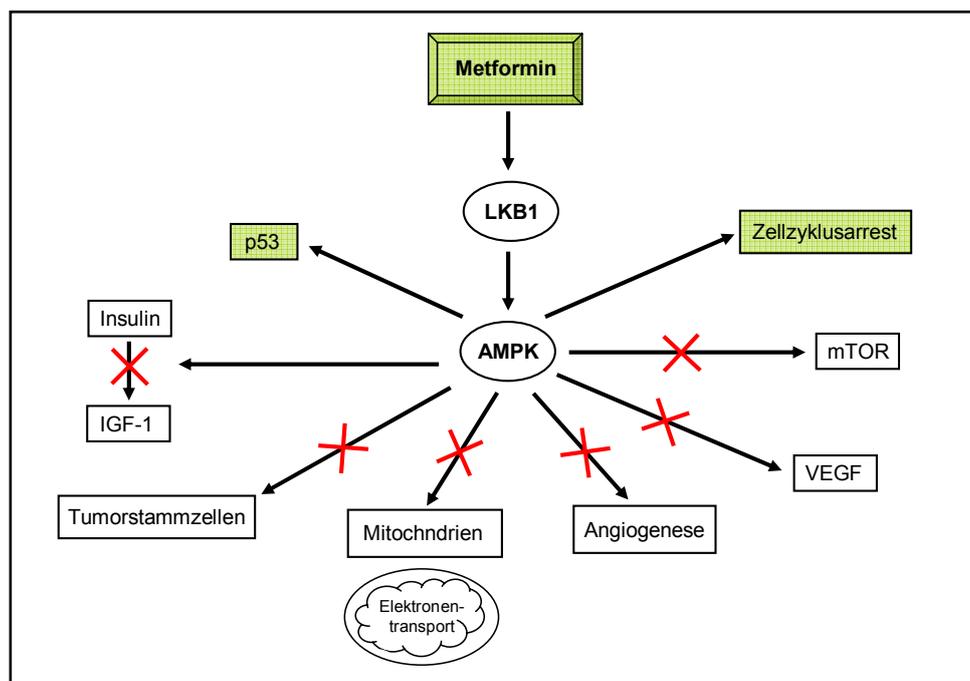


Abb. 16: Antitumorale Wirkung von Metformin.

(Verändert nach Kourelis und Siegel 2011).

Metformin hemmte das Wachstum von Endometrium-Karzinomzellen *in vitro*, indem es einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase induzierte (Cantrell et al. 2010). Phoenix et al. konnten zeigen, dass Metformin das Wachstum von östrogenrezeptornegativen (MDA-MB 231) und -positiven (MCF-7) Brustkrebszelllinien hemmte (Phoenix et al. 2009). In tripelnegativen Brustkrebszellen der Linien MDA-MB 468 und MDA-MB 231 zeigte Metformin ebenfalls eine hemmende Wirkung (Liu et al 2009). Dieselbe

Arbeitsgruppe untersuchte die Wirkung von Metformin auch *in vivo* in einem orthotopen Mausmodell mit der Brustkrebszelllinie MDA-MB 231. In Mäusen, denen Metformin über das Trinkwasser verabreicht wurde, war das Tumorwachstum deutlich verlangsamt (Liu et al. 2009).

Erste Hinweise, dass Metformin auch im Menschen eine antitumorale Wirkung hat, ergaben sich aus der Beobachtung, dass die Tumorzinzidenz bei Diabetikern die Metformin einnahmen, reduziert war (Evans et al. 2005). In einer randomisierten Studie wurde der präventive Effekt von Metformin auf Entstehung von Darmkrebs untersucht. In der behandelten Gruppe war die Anzahl der aberranten kryptischen Foci, ein Maß für ein erhöhtes Darmkrebsrisiko, deutlich zurückgegangen (Hosono et al. 2010). In vielen klinischen Studien wird Metformin derzeit als Einzelsubstanz aber auch in Kombination mit Chemotherapie bei verschiedenen Tumorentitäten, u. a. Brustkrebs, Pankreas- und Prostatakarzinom getestet (www.clinicaltrials.gov).

Perifosin

Perifosin ist ein Alkylphospholipid, welches in die Plasmamembran von Zellen eingebaut wird. Dadurch stört es die Membranintegrität und infolge dessen die lipidabhängige Signaltransduktion in Zellen (van Blitterswijk und Verheij 2008).

Der PI3K-AKT-Signalweg ist für Tumorzellen von besonderer Bedeutung. Wie im Absatz über die Rolle von Onkogenen am Beispiel AKT bereits erläutert, steigert er die Glykolyse und unterdrückt apoptotische Signale. Kondapaka et al. konnten zeigen, dass Perifosin die Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran und dessen Phosphorylierung verhindert (Kondapaka et al. 2003).

In vitro-Untersuchungen zeigten eine sehr gute Wirkung von Perifosin gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien wie Melanom, Bronchial-, Prostata-, Colon- und Mammakarzinom. Chemisch induzierte Mammakarzinome in Ratten sprachen ebenfalls gut auf Perifosin an (Hilgard et al. 1997). In Experimenten mit Zelllinien des multiplen Myeloms wurde die Expression des apoptosehemmenden Proteins Survivin *in vitro* und *in vivo* herunterreguliert (Hideshima et al. 2007).

Mehrere klinische Studien über die Wirkung von Perifosin bei zahlreichen Tumorentitäten (u. a. metastasiertes Mammakarzinom, Pankreas-, Kopf-Hals- und Prostatakarzinom) sind abgeschlossen. Die häufigsten Nebenwirkungen, die bei Patienten beobachtet wurden waren gastrointestinale Beschwerden und Fatigue (Unger et al. 2010, Porta und Figlin 2009).

In einer Phase II-Studie mit metastasiertem Mammakarzinom waren die Ergebnisse jedoch enttäuschend. Keine der Patientinnen erreichte eine Remission. 19 % erreichten eine Stabilisierung der Krankheit für zwei Monate (Leighl et al. 2008). Eine Studie bei Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom musste aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen abgebrochen werden (Marsh et al. 2007). Die orale Verabreichung an Patienten mit hormonrefraktärem Proststakarzinom wurde gut vertragen, reduzierte den PSA-Wert aber um weniger als 50 %. Das mediane progressionsfreie Überleben betrug 9,5 Monate (Chee et al. 2005). Zurzeit aktiv sind Studien bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Glioblastom, Nierenkarzinom und rezidivierendem Ovariakarzinom. Auch die kombinierte Behandlung von Perifosin mit etablierten Chemotherapeutika wird derzeit untersucht (www.clinicaltrials.gov).

Sorafenib

Sorafenib ist ein Multikinaseinhibitor. Es hemmt Raf-Kinasen des Raf/MEK/ERK-Signalweges, die eine entscheidende Rolle für Zellteilung und -überleben spielen (Kolch et al. 2002). Auch Tyrosinkinaserzeptoren wie VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*) und PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) sind Angriffspunkte von Sorafenib (Abb. 17). Sorafenib greift also in zwei verschiedene Signalwege ein, welche die Zellproliferation und die Angiogenese steuern (Greil und Micksche 2006).

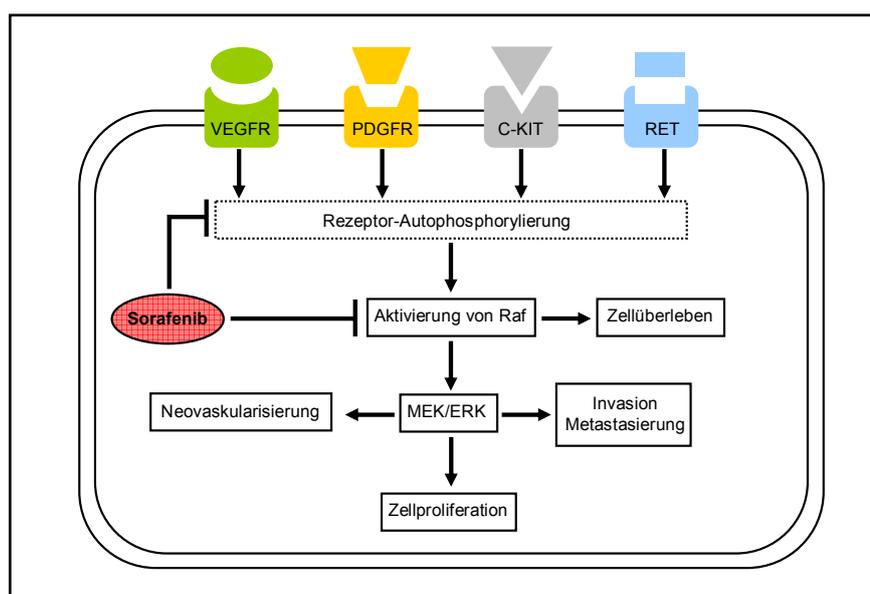


Abb. 17: Zielstrukturen von Sorafenib.

Sorafenib blockiert die Signalübertragung durch Rezeptortyrosinkinasen und die nachfolgenden Signalwege der Raf-Kinase. (Verändert nach Wilhelm et al. 2006).

Sorafenib zeigte *in vitro* bei Brust-, Bauchspeicheldrüsen-, Darm- und Hautkrebs eine wachstumshemmende Wirkung (Valabrega et al. 2010, Ulivi et al. 2009, Plataras et al. 2007, Panka et al. 2006). Bei humanen Xenotransplantaten verschiedener Tumorentitäten (Brust-, Darm-, Lungen-, Eierstocks- und Bauchspeicheldrüsenkrebs) wurde eine dosisabhängige, antiproliferative Wirkung nachgewiesen (Wilhelm et al. 2004). Zugelassen ist Sorafenib für das metastasierte Nierenzellkarzinom und für das Hepatozelluläre Karzinom (<http://www.bayer.de/de/Bayer-HealthCare.aspx>). Sorafenib wird derzeit intensiv in klinischen Studien getestet, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika. In einer Phase-II-Studie bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs hatte Sorafenib als Monotherapie nur mäßige antitumorale Wirkung. Die Nebenwirkungen waren tragbar (Bianchi et al. 2009). Bei Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom wurde in einer Phase-I-Studie Sorafenib in Kombination mit Capecitabine und Cisplatin verabreicht. 10 von 16 Patienten (62,5 %) sprachen auf die Therapie an. Schwerwiegende Nebenwirkungen waren gering und die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Kombinationstherapie bei dieser Patientengruppe praktikabel ist (Kim et al. 2010).

Eine interessante und wirksame Kombinationstherapie fanden Rauch et al.. Sie untersuchten die Wirkung von Sorafenib auf das Wachstum von Tumorstammzellen des Pankreaskarzinoms in Mäusen. Sorafenib unterdrückte das Wachstum aber nur kurzfristig. Die Forscher erklärten sich die Resistenz dadurch, dass Sorafenib den NF- κ B Signalweg aktiviert. Sulforaphan, ein pflanzlicher Wirkstoff aus der Familie der Kreuzblütler verhinderte die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs durch Sorafenib und verstärkte sogar die Wirkung von Sorafenib (Rausch et al. 2010).

1.4.4 Kombination verschiedener Substanzen

In der Literatur ist beschrieben, dass Tumorzellen sowohl die Glykolyse als auch die oxidative Phosphorylierung nutzen können und damit auch den Pentosephosphatweg und die Glutaminolyse, um alle Möglichkeiten für optimale Wachstums- und Vermehrungsbedingungen auszunutzen (Levine und Puzio-Kuter 2010, Gauthier et al. 1990).

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Beeinflussung des Glucosestoffwechsels in Tumorzellen. Daher wurde untersucht, ob Substanzen der Gruppe 1 (Glykolyseinhibitoren) in Kombination mit Substanzen der Gruppe 2 (Substanzen, die

den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen). einen synergistischen Effekt auf die Verminderung des ATP-Gehaltes in Tumorzellen ergeben. Hierdurch könnten die einzelnen Substanzen in einer niedrigeren Dosierung eingesetzt werden und so eventuell eine geringere Toxizität gegenüber benignen Zellen erreicht werden.

Kombinationen mit DCA

Unter der Annahme, dass die oxidative Phosphorylierung in Tumorzellen stark eingeschränkt ist, ergibt sich folgende Überlegung für die Kombination von Substanzen, die den Stoffwechsel beeinflussen. Schulz et al. hatten gezeigt, dass Zellen mit eingeschränkter oxidativen Phosphorylierung sensitiver gegenüber Stimulatoren der oxidativen Phosphorylierung sind (Schulz et al. 2006). Daraufhin stellten Stockwin et al. die Hypothese auf, dass DCA in Kombination mit 2-DG einen synergistischen Effekt auf Zellen mit defekter mitochondrialer Atmungskette haben müsste aber nicht auf Zellen mit intakter oxidativen Phosphorylierung. Durch die kombinierte Behandlung würde die Zelle in eine „metabolische Krise“ getrieben und gezwungen ATP über einen defekten Mechanismus zu generieren. Schließlich würde die Zelle an sämtlichen Nährstoffen verarmen (Stockwin et al. 2010). Die Autoren fanden in der Tat einen synergistischen Effekt von DCA und 2-DG in Zellen, die keine mitochondriale DNA mehr besitzen.

In den hier durchgeführten Experimenten wurde DCA jeweils mit 2-DG (früher Inhibitor der Glykolyse) bzw. Oxamat (später Inhibitor der Glykolyse) bzw. Oxythiamin (Inhibitor der Transketolase im PPW) kombiniert.

Kombinationen mit Rotenon

Ausgehend von der Annahme, dass Tumorzellen in der Lage sind die oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung zu nutzen, ergibt sich folgende Überlegung. Die Behandlung von Tumorzellen mit Substanzen, welche die oxidative Phosphorylierung hemmen, sollte zu einer höheren Sensitivität gegenüber Glykolyseinhibitoren führen. Dies wurde auch schon für verschiedene Tumorzellen gezeigt (Liu et al. 2001, Bernal et al. 1983, Varshney et al. 2003).

In einer Übersichtsarbeit weisen Pelicano et al. daraufhin, dass der ATP-Gehalt in einer Zelle unter einen bestimmten Schwellenwert fallen muss, um Apoptose oder Nekrose auszulösen (Pelicano et al. 2006). Die gleichzeitige Blockade der Glykolyse

und der mitochondrialen Atmung könnte die Zelle energetisch so stark beeinträchtigen, dass sie apoptotisch oder nekrotisch wird.

In Prostatakarzinomzellen führte die alleinige Behandlung mit dem Entkoppler DNP oder dem ATPase-Inhibitor Oligomycin zu keiner Reduktion im ATP-Gehalt. Erst die Hemmung von Glykolyse durch 2-DG und oxidativer Phosphorylierung durch DNP oder Oligomycin führte zu einem verminderten ATP-Gehalt in den Zellen (Matheson et al. 2007).

In den hier durchgeführten Experimenten wurde Rotenon jeweils mit 2-DG bzw. Oxamat bzw. Oxythiamin kombiniert.

Ziel 2:

1.5 Vergleich verschiedener Vitalitätstests

Zytotoxische Substanzen haben verschiedene Wirkungen auf Zellen. Sie können mit dem Stoffwechsel der Zelle interferieren, das Adhäsionsverhalten beeinflussen und die Membranintegrität zerstören. Zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Substanzen auf die Zellvitalität gibt es verschiedene kommerzielle Zytotoxizitäts- bzw. Vitalitätstests. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind vielfältig. Zum einen kann die metabolische Aktivität definierter, konstitutiv exprimierter Stoffwechsellenzyme der Zellen, wie z. B. LDH (Laktatdehydrogenase) bestimmt werden, welche durch Umsetzung eines Farbstoffes als Maß für die metabolische Integrität detektiert wird. Zum anderen kann der ATP-Gehalt der Zellen gemessen werden.

Zytotoxizität ist u. a. durch den Verlust der Zelladhärenz gekennzeichnet. Ein weiteres Testprinzip zur Vitalitätsbestimmung ist daher die Färbung adhärenter Zellen bzw. deren Zellkerne mit einem Farbstoff. Die Adhärenz kann auch über eine Impedanzmessung mit dem sog. xCELLigence-System detektiert werden, und zwar kontinuierlich über den gesamten Zeitraum des Experimentes. Auch die Kombination mehrerer Tests, das sog. *Multiplexing* ist möglich.

Die Auswahl eines geeigneten Testsystems muss vor Durchführung sehr gut überlegt werden. Folgende Fragen sind hierbei wichtig:

- Welche Zellparameter (ATP-Gehalt, metabolische Aktivität, Caspasen, DNA-Synthese, freigesetzte Metabolite) sollen analysiert werden?

- Welche Analysegeräte (Absorptionsphotometer, Lumino- bzw. Fluorometer) sind vorhanden?
- Welche Sensitivität muss der Test haben?
- Sollen mehrere Parameter in einem Versuchsansatz analysiert werden (*Multiplexing*)?
- Soll ein Verlaufs- oder Endpunkttest durchgeführt werden?
- Welche Aussage liefert der Test (Anzahl lebender oder toter Zellen, Gesamtzellzahl, Anzahl apoptotischer Zellen, Anzahl metabolisch aktiver Zellen, ATP-Gehalt)?

Ein Teilziel dieser Arbeit war der Vergleich verschiedener *in vitro*-Vitalitätstests bzgl. Sensitivität, Reproduzierbarkeit, Zeit- und Kostenaufwand. Die Vitalität der Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren wurde mit Hilfe von fünf verschiedenen Tests untersucht, denen unterschiedliche Nachweisverfahren zu Grund liegen, die Luminometrie, die Spektrophotometrie und die Messung der Impedanz. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht der verwendeten Tests.

Tab. 3: Übersicht der verwendeten zellbasierten Vitalitätstests.

Test	Messsignal	Messung von
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Lumineszenz	ATP-Gehalt
Kristallvioletttest	Absorption kolorimetrisch	relative Zellzahl
WST-8 Cell Proliferation Assay	Absorption kolorimetrisch	metabolische Aktivität von Zellen
Vitalitätstest basierend auf Resazurin	Absorption kolorimetrisch	metabolische Aktivität von Zellen
Echtzeitzellanalyse xCELLigence	Impedanz	Zelladhärenz

Die hier verwendeten Tests sind etablierte Verfahren zur Bestimmung von Vitalität bzw. Zytotoxizität von verschiedenen Agenzien (Bopp und Lettieri 2008, Peternel et al. 2009, Urcan et al. 2010, Flick und Gifford 1984).

CellTiter-Glo® Lumineszenz Vitalitätstest

Zur Quantifizierung des ATP-Gehaltes metabolisch aktiver Zellen wurde der CellTiter-Glo® Lumineszenz Vitalitätstest von Promega verwendet. Der hierbei gemessene ATP-Gehalt dient als Maß für die Anzahl lebender Zellen jeweils bezogen auf einen unbehandelten Kontrollansatz mit definierter Zellzahl. Durch Zugabe des Testreagenzes werden die Zellen vollständig lysiert und endogene ATPasen gehemmt. Das in den Zellen vorhandene ATP wird in einer luciferasekatalysierten Reaktion umgesetzt, wobei ein Lichtsignal entsteht welches im Luminometer detektiert wird.

Dieser Test ist ein sog. Endpunkttest, d. h. die Zellen werden durch Zugabe des Testreagenzes lysiert und der ATP-Gehalt der Zellen an diesem definierten Zeitpunkt gemessen. Somit ist keine Aussage über das zeitliche Wirkungsprofil der getesteten Substanzen möglich. Die Sensitivität dieses Testes ist sehr hoch. Die untere Nachweisgrenze in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte liegt bei 50 Zellen. Das Lumineszenzsignal zeigt einen linearen Verlauf von 0 bis 5×10^4 Zellen/Vertiefung. Er ist für die meisten Zelllinien und auch für Primärkulturen geeignet und kann in 6 - bis 1536-Loch-Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Als sogenannter homogener Test (Zugabe von nur einem Reagenz) ist er sehr einfach zu handhaben. Durch die kurze Inkubations- und Messzeit erhält man die Ergebnisse bereits nach 15 Minuten. Aufgrund der relativ langen Halbwertszeit von 5 Std. (abhängig von Zelllinie und Zellkulturmedium) eignet sich der Test auch für Anätze im großen Maßstab (*high-throughput*). Ein weiterer Vorteil ist das zu vernachlässigende Hintergrundsignal (Medium ohne Zellen mit Substrat). Mit derzeit 4,96 € - 5,48 € pro Ansatz (= eine Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte) ist dieser Test jedoch relativ teuer.

Kristallvioletttest

Ein schon sehr lange etabliertes kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der relativen Zellzahl adhärenter Monolayerkulturen ist der Kristallvioletttest (Gillies 1986, Kueng 1989). Der basische Triphenylmethanfarbstoff Kristallviolett färbt v. a. Kernproteine an. Nachdem die Zellen mit einer zytotoxischen Substanz für einen definierten Zeitraum inkubiert wurden, wird der Zellkulturüberstand vollständig abgenommen und somit auch die nicht adhärenen Zellen entfernt. Nach Fixierung der verbleibenden adhärenen Zellen mit Methanol erfolgt deren Färbung mit Kristallviolettlösung. Nicht gebundener Farbstoff wird durch Waschen mit Aqua bidest

entfernt. Nach Trocknen der Platten an der Luft wird der gebundene Farbstoff mit 10 %iger Essigsäure in Lösung gebracht und die optische Dichte bei 630 nm im Photometer gemessen. Als Leerwert dient 10 %ige Essigsäure. Die hierbei erzielte optische Dichte (OD) wird von den gemessenen OD-Werten der Zellen subtrahiert. Auch dieser Test ist ein Endpunkttest. In einem Bereich von $500 - 5 \times 10^4$ Zellen korreliert die Zellzahl linear mit den gemessenen OD-Werten (Gillies 1986). Das Verhältnis zwischen Zellzahl und gemessener OD ist jedoch von Zelllinie zu Zelllinie verschieden und da sich viele Zellen auch während der Zellteilung vom Plattenboden ablösen, ist eine direkte Korrelation zur Anzahl der abgestorbenen Zellen nur bedingt möglich. Mit ca. 0,80 €/Ansatz ist der Test unschlagbar günstig.

WST-8 Proliferationstest

Mit diesem Test kann die Anzahl lebender, metabolisch aktiver Zellen bestimmt werden. In stoffwechselaktiven Zellen wird NADH bzw. NADPH durch zelluläre Dehydrogenasen generiert. Das Tetrazoliumsalz WST-8 wird durch den Wasserstoff in NADH bzw. NADPH in Gegenwart des Wasserstoffakzeptors 1-Methoxy PMS zu orangefarbenem WST-8-Formazan umgesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 - 4 Std. wird die Menge des gebildeten wasserlöslichen Formazansalzes im Photometer bei 450 nm gemessen. Der Leerwert (Medium ohne Zellen mit WST-8-Reagenz) wird von den gemessenen OD-Werten subtrahiert, um Medieinflüsse auszuschliessen.

Abhängig vom Zelltyp können mit diesem Test 10^3 bis 10^5 Zellen detektiert werden. Die Zugabe von nur einem Reagenz macht diesen Test sehr einfach und schnell in der Durchführung. Vorteilhaft ist die Tatsache, dass das entstehende Formazan wasserlöslich ist und somit weitere Lösungsschritte entfallen. Dadurch ist der WST-8-Test deutlich präziser als andere Vitalitätstests, die auf der Umsetzung von Tetrazoliumsalzen beruhen, wie z. B. der klassische MTT-Test. Hierbei ist das entstehende orangefarbene Formazan-Salz nicht wasserlöslich und muss in einem weiteren Arbeitsschritt erst in Lösung gebracht werden. Mit einem Preis von 1,25 € - 1,39 € pro Ansatz liegt der WST-8-Test in der mittleren Preisklasse. Das WST-8-Reagenz ist nicht zytotoxisch und erlaubt daher wiederholte Messungen über mehrere Stunden, wodurch sich dieser Test auch für kinetische Analysen eignet. Weiterhin werden die Zellen nicht angefärbt, so dass sie nach Testende für weitere Tests, z. B. den Kristallvioletttest, verwendet werden können.

Vitalitätstest basierend auf Resazurin

Ein weiterer Vitalitätstest basierend auf der metabolischen Aktivität von Zellen ist der kostengünstige Resazurin-Test (0,84 € pro Ansatz). Man nimmt an, dass der Farbstoff Resazurin passiv in die Zellen eindringt und dort durch mitochondriale Enzyme zu fluoreszierendem Resorufin reduziert wird. Gleichzeitig erfolgt ein Farbumschlag von blau nach pink, was auch eine spektrophotometrische Auswertung des Testes ermöglicht. Gemessen wird die Abnahme der Absorption von nichtmetabolisiertem Resazurin bei 600 nm, woraus sich reziproke Werte ergeben. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional, die Absorption invers proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Als homogener Test ist der Resazurin-Test sehr einfach und schnell durchzuführen. Da Resazurin nur minimal zytotoxisch ist kann dieser Test sowohl für kinetische Messungen (innerhalb 24 Std.) als auch für Endpunkttests eingesetzt werden. Außerdem können die Zellen für weitere Tests verwendet werden, was zeit- und kostensparend ist. Die Sensitivität des Resazurintestes ist abhängig von der Zellart und der Detektionsmethode. Die fluorimetrische Messung erlaubt die Detektion von mindestens 80 Zellen (HepG2) (O'Brien et al. 2000) bis 3000 Zellen (ChoK1 und JurkatE6.1) (Peternel et al. 2009). Mittels Absorptionsmessung können, ebenfalls abhängig von der Zellart, 50000 (Hybridomzelllinie YCD3-1), 3000 (Makrophagen-Monozyten-Zelllinien PU5-1.8, P388D1) bzw. 4000 (Myelomzelllinie Sp2/O) Zellen detektiert werden (Ahmed et al. 1993).

Messung der Impedanz mit dem xCELLigence-System

Das xCELLigence-System ermöglicht eine permanente Analyse des Zellstatus während des Experimentes und gibt Auskunft über Zellwachstum, morphologische Veränderungen und Zelltod. Über Mikroelektroden, die im Boden von sog. E-Platten integriert sind wird der Zellwiderstand gemessen. Die Dynamik der Wechselwirkungen zwischen Zelle und einer Testsubstanz werden zeitlich aufgelöst und kontinuierlich dokumentiert. Veränderungen der Zell-Elektroden-Impedanz geben Informationen über Adhäsion und Morphologie der Zellen. Der dimensionslose Zellindex (CI = *cell index*) spiegelt den Zellstatus wieder und beruht auf der Messung von Änderungen in der Impedanz. Die Änderung der Impedanz korreliert hierbei mit der Anzahl adhärenter Zellen (Xiao et al. 2002). Je mehr Zellen auf den Elektroden adhären, desto größer wird der Zellindex. Unabhängig von der Zellzahl beeinflusst

auch die zweidimensionale Ausbreitung der Zellen und die Stärke der Anheftung den Zellindex.

Ein großer Vorteil dieses Systems ist die kontinuierliche Beobachtung der Zellen über den gesamten Zeitraum des Experimentes. Im Gegensatz zu üblichen Endpunkttests werden Effekte von z. B. zytotoxischen Substanzen vom Anfang bis zum Ende des Experimentes präzise erfasst. So kann der Zeitpunkt des Wirkeintritts exakt bestimmt und der zeitliche Wirkverlauf der zytotoxischen Substanz verfolgt werden.

Teure Testreagenzien, wie sie für herkömmliche Vitalitätstests benötigt werden, sind nicht notwendig. Weiterhin können während des ganzen Experimentes zeitabhängige mittlere effektive Konzentrationen, sog. EC50 (*effective concentration*) bestimmt werden. Diese liefern damit verlässlichere physiologische Werte als die Bestimmung eines EC50-Wertes, wie es bei den klassischen Zytotoxizitätstests der Fall ist. Mit Hilfe der zugehörigen Software können nützliche Parameter wie Minimal- und Maximalwerte, Standardabweichung, mittlere Hemmkonzentration (IC50) ermittelt und Grafiken generiert werden.

Ein großer Vorteil ist die Beobachtung der Zellen unter natürlichen Bedingungen ohne die Zugabe von Detektionsreagenzien, welche Zellvitalität und -metabolismus beeinflussen könnten.

Die Zellen können nach Beendigung der Messung für weitere Vitalitäts- oder Zytotoxizitätstests eingesetzt werden. Für Zellzahlen zwischen 1×10^2 und 1×10^4 ergibt sich eine lineare Korrelation zwischen Zellzahl und Zellindex (xCELLigence Application Note 1, Roche 2008), wobei dies für jede Zelllinie individuell ausgetestet werden muss.

Dieses Verfahren ist allerdings sehr teuer. Die Anschaffungskosten für das System betragen 50.000 €. Die E-Platten kosten 100 € pro Stück und sind nur für den einmaligen Gebrauch ausgelegt. Für spezielle Fragestellung und Experimente in einem definierten Zeitrahmen besteht die Möglichkeit das System monatsweise zu mieten (1.500 €/Monat), was eine bezahlbare Alternative zum Kauf darstellt.

Ziel 3:**1.6 Berechnung von Hemmkonzentrationen (*Inhibitory Concentration, IC*)**

Die mittlere Hemmkonzentration (IC₅₀-Wert) ist eine charakteristische Größe zur Beurteilung der Wirksamkeit von potentiell zytotoxischen/zytostatischen Substanzen und entspricht der Wirkstoffkonzentration, bei der das Zellwachstum um 50 % gehemmt wird. Anhand des IC₅₀-Wertes ist ein objektiver Vergleich der Hemmwirkung verschiedener Substanzen möglich. Es können auch andere Hemmkonzentrationen berechnet werden. Die IC₂₅ z. B. entspricht der Wirkstoffkonzentration, bei der das Zellwachstum um 25 % gehemmt wird. Für eine exakte Bestimmung der Hemmkonzentrationen sollte eine ausreichende Anzahl an Inhibitorkonzentrationen über einen möglichst breiten Konzentrationsbereich getestet werden, um einen sigmoiden Kurvenverlauf zu erhalten, wobei die beiden Plateaus gegen 100 % bzw. 0 % Hemmung streben sollten (Abb. 18).

Zur Berechnung der Hemmkonzentrationen der hier verwendeten Substanzen wurden drei verschiedene Methoden verwendet: nichtlineare Regressionsanalyse, nichtlineare Interpolation (beide mit dem Programm GraphPad Prism 4) und lineare Interpolation mit dem Programm Microsoft Excel. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sollte beurteilt und daraus eine einfach anzuwendende Methode zur Berechnung der IC abgeleitet werden.

Nichtlineare Regressionsanalyse mit GraphPad Prism 4

Die Regressionsanalyse ist ein Verfahren für Ursachen- und Wirkungsanalysen. Hierbei wird eine mathematische Gleichung hergeleitet, die einen Zusammenhang zwischen zwei quantitativen metrisch skalierten Merkmalen optimal beschreibt. Anhand dieser Gleichung lässt sich dann aus einem bekannten Wert für das Merkmal x ein Wert für das dazugehörige Merkmal y ableiten. Für den IC₅₀-Wert bedeutet dies, dass einer bestimmten Dosis (Merkmal x) der Wert $y = 50\%$ (= 50 % Vitalität bezogen auf die Kontrolle) zugeordnet werden kann. Man unterscheidet lineare und nichtlineare Regression.

In der Pharmakologie wird der Zusammenhang zwischen der Konzentration einer Substanz und deren Wirkung durch nichtlineare Regression mit dem Modell der Dosis-Wirkungskurve dargestellt (Abb.18).

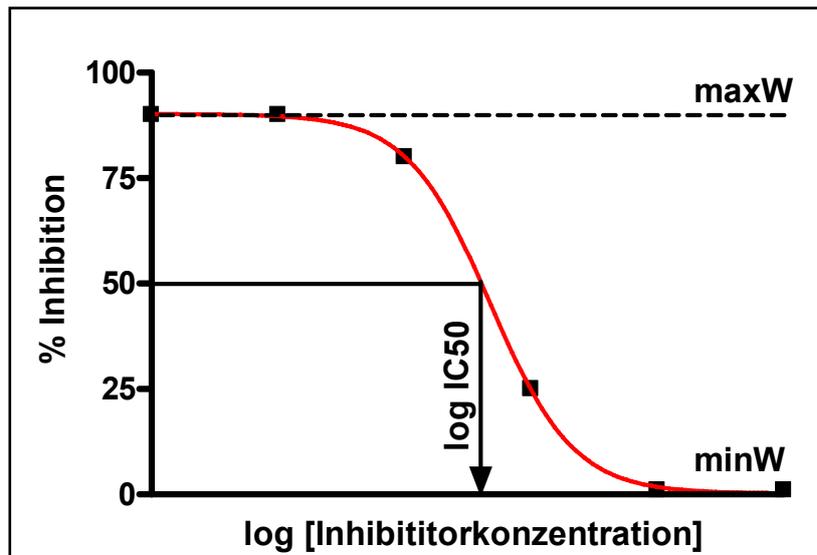


Abb. 18: Sigmoide Dosis-Wirkungskurve mit Darstellung des IC50-Wertes.

Die Dosis wird als Logarithmus auf der x-Achse, die Wirkung (hier % Vitalität) linear auf der y-Achse aufgetragen. Üblicherweise haben diese Kurven einen sigmoiden Verlauf. Ein weiterer Parameter, der den Verlauf der Kurve bestimmt ist die Steigung. Damit ist die Dosis-Wirkungskurve eine logistische Funktion mit vier Parametern und wird durch folgende Formel beschrieben:

$$y = \text{minW} + \frac{\text{maxW} - \text{minW}}{1 + 10^{((\log \text{IC50} - x) \cdot \text{Steigung})}}$$

Abb. 19: Formel zur Berechnung der IC50 mit GraphPad Prism.

Sigmoide Dosis-Wirkungskurve mit variabler Steigung. x = Logarithmus der Inhibitorkonzentration; y = Wirkung (hier Vitalität in %); minW = minimale Wirkung; maxW = maximale Wirkung; $\log \text{IC50}$ = Logarithmus der IC50.

Die nichtlineare Regressionsanalyse, für die mindestens vier Konzentrationsstufen erforderlich sind, wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4 durchgeführt.

Nichtlineare Interpolation mit dem Programm GraphPad Prism 4

Auf Grundlage der oben beschriebenen nichtlinearen Regressionsanalyse wurde der IC50-Wert durch nichtlineare Interpolation ebenfalls mit GraphPad Prism bestimmt. Das Programm kann zu jedem gewünschten Hemmwert (z. B. IC10, IC25 oder IC 75) die entsprechende Konzentration anhand der nichtlinearen Regressionskurve berechnen. Voraussetzung ist allerdings, dass das Programm aufgrund der Messwerte eine Regressionskurve erstellen kann.

Lineare Interpolation mit Microsoft Excel

Als weiteres Verfahren zur IC50-Bestimmung wurde eine lineare Interpolation mit dem Programm Excel durchgeführt. In der linearen Interpolation werden die Parameter a und b der linearen Gleichung $y = a x + b$ optimal an die Messpunkte x_i, y_i angepasst. Auch hier wird die Dosis als Logarithmus auf der x-Achse und die Wirkung (% Vitalität) linear auf der y-Achse aufgetragen. Für die Bestimmung des IC50-Wertes lautet die Formel also:

$$50 = a x + b$$

Abb. 20: Formel zur Berechnung der IC50 mit Excel.

a = Steigung; b = Achsenabschnitt. x = gesuchte Hemmkonzentration (IC).

Excel berechnet zwischen dem bekannten Wert oberhalb und unterhalb von $y = 50$ eine Geradengleichung. Durch Auflösen dieser Gleichung nach x erhält man die gesuchte Konzentration. Abb. 21 zeigt exemplarisch die Geradengleichung für die Berechnung der IC50 für den Inhibitor 2-Deoxyglucose bei MDA-MB 468.

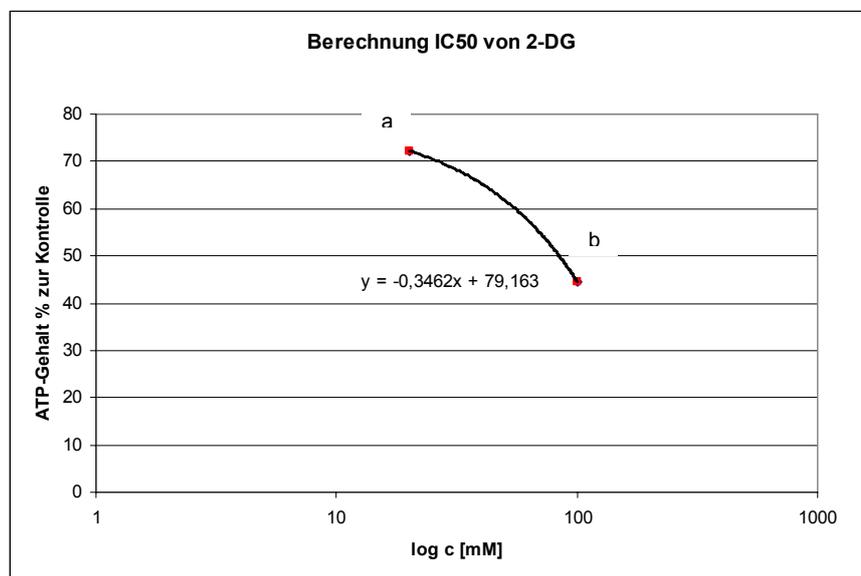


Abb. 21: Formel zur Berechnung der IC50 durch lineare Interpolation mit Excel.

Excel berechnet eine Geradengleichung zwischen der bekannten Konzentration oberhalb (a) und unterhalb (b) der gesuchten Konzentration.

Eine grobe Abschätzung der IC50 kann durch graphische Bestimmung anhand der Dosis-Wirkungskurve erreicht werden. Dazu wird der Schnittpunkt einer horizontalen

Geraden ausgehend von der y-Achse bei 50 % mit der Dosis-Wirkungskurve ermittelt und das Lot auf die x-Achse gefällt. Abb. 22 zeigt ein Beispiel der graphischen Bestimmung der IC₅₀ für 2-Deoxyglucose bei der Zelllinie MDA-MB 468. Im Programm GraphPad Prism lässt sich der Logarithmus des x-Wertes auf der Kurve ablesen und in die Konzentration umrechnen.

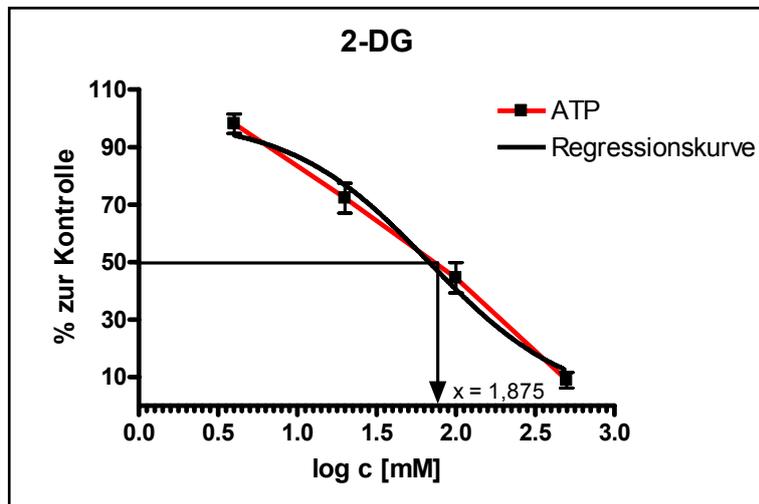


Abb. 22: Graphische Ermittlung der IC₅₀.

Vom Schnittpunkt einer horizontalen Geraden bei 50 % auf der y-Achse mit der ATP-Kurve (rot) wird das Lot auf die x-Achse gefällt und der Logarithmus der Konzentration abgelesen. Daraus wird dann die Konzentration berechnet.

Ziel 4:

1.7 Quantifizierung der Milchsäureproduktion von malignen und benignen Zellen im Zellkulturüberstand nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen

Eine vermehrte Milchsäureproduktion bietet Tumorzellen einige Vorteile: Hochregulierung von Genen (VEGF, HIF-1 α), die das maligne Potenzial von Tumorzellen steigern, Degradation der umgebenden extrazellulären Matrix, Induktion von Apoptose benachbarter gesunder Zellen und gesteigerte Zellmotilität erleichtern die Metastasierung. Für Plattenepithelkarzinome des Gebärmutterhalses und des Kopf-Hals-Bereiches sowie für Adenokarzinome des Rektums wurde ein Zusammenhang zwischen hoher Laktatproduktion und Metastasierungsrisiko nachgewiesen (Walenta 2000, Walenta 2003, Brizel 2001). Außerdem korreliert eine starke Milchsäurekonzentration mit einer erhöhten Radio- und Chemotherapieresistenz. Auch das Immunsystem wird durch Laktat beeinträchtigt.

Der Einfluss der verschiedenen Substanzen auf die Produktion von Milchsäure wurde untersucht. Mit Hilfe eines UV-Tests wurde der Gehalt an Milchsäure in Zellkulturüberständen bestimmt. Das Testprinzip ist im Abschnitt 3.3.1 beschrieben.

Ziel 5:

1.8 Charakterisierung der verwendeten malignen und benignen Zellen

1.8.1 Quantifizierung der Glucoseaufnahme

Die gesteigerte Glykolyse und die damit verbundene erhöhte Aufnahme von Glucose ist ein typisches Charakteristikum von schnell wachsenden Tumorzellen. Die Glucoseaufnahme kann um das bis zu 10-fache gegenüber Normalgeweben gesteigert sein (Czech et al. 2000). Die rasche Aufnahme von Glucose macht man sich in der bildgebenden Diagnostik zu nutze, bei der sog. Positron-Emissions-Tomographie (PET; Fukuda et al. 1982). Eine hohe Glykolyserate ist jedoch nicht nur für Tumorzellen charakteristisch ein. Auch normale schnell proliferierende Zellen haben eine erhöhte Zuckeraufnahme (Doughty et al. 2006). Für nicht-radioaktive *in vitro*-Untersuchungen der Glucoseaufnahme in Tumorzellen eignet sich das fluoreszierende Glucoseanalogon 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG). Ebenso wie 18-FDG wird 2-NBDG durch die Hexokinase am C-6-Atom phosphoryliert und akkumuliert in der Zelle (O'Neil et al. 2005). Die hierdurch zunehmende grüne Fluoreszenz kann dann im Durchflusszytometer analysiert werden.

Zur Charakterisierung der getesteten malignen und benignen Zellen wurde die Zuckeraufnahme in Tumorzellen und benignen Zellen mittels FACS-Analyse untersucht.

1.8.2 Immunhistochemische Charakterisierung

Nachweis charakteristischer Proteine des Tumorstoffwechsels

Die Physiologie von Tumoren unterscheidet sich grundlegend von normalem Gewebe. Charakteristisch für das Mikromilieu sind u. a. der verminderte Sauerstoffgehalt (Hypoxie und Anoxie), extrazelluläre Azidose, gesteigerte Glykolyse, hohe Laktatspiegel sowie eine unzureichende Vaskularisierung (zur Übersicht siehe Vaupel 2004). Für die Aufrechterhaltung des gesteigerten

Glucosebedarfs werden in Tumorzellen verstärkt die insulinunabhängigen Glucosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 exprimiert. Die Ausschleußung der anfallenden Milchsäure in hoch glykolytischen Zellen erfolgt über den Monocarboxylattransporter MCT-4, wohingegen atmende Tumorzellen über MCT-1 das energiereiche Laktat aufnehmen und zur Energiegewinnung nutzen können. Aufgrund der gesteigerten Glykolyserate werden viele glykolytische Enzyme in Tumoren überexprimiert, u. a. die Pyruvatkinase M2 (M2-PK). Wegen des verminderten Sauerstoffgehaltes findet man in Tumoren eine hohe Expression des Hypoxie induzierbaren Faktors HIF-1 α . Ein weiteres Protein, das im Tumormetabolismus eine wichtige Rolle spielt ist das Proto-Onkogen Akt, eine Serin/Threonin Kinase. Sowohl HIF-1 α also auch Phospho-Akt (pAkt) steigern die Glucoseaufnahme und den Glucosestoffwechsel in Karzinomzellen.

Zur näheren Charakterisierung der hier untersuchten benignen und malignen Zellen hinsichtlich des Glucosestoffwechsels, wurde die Expression folgender typischer Proteine mit Hilfe der Immunhistochemie analysiert: Als Schlüsselproteine des Glucosemetabolismus p-Akt und M2-PK, die Stoffwechseltransporter GLUT-1 und MCT-1 sowie der Hypoxiemarker HIF-1 α .

Immunhistochemischer Nachweis von M2-PK

Für Tumorzellen mit einem glykolytischen Stoffwechselphänotyp ist die Aktivierung der Kinase Akt und die Hochregulation der Pyruvatkinase M2 (M2-PK) charakteristisch. Proliferierende Zellen sind in zweierlei Hinsicht auf die Glykolyse angewiesen. Zum einen dient sie der Energiegewinnung, zum anderen werden die entstehenden Intermediate als Vorläufer für Syntheseprozesse benötigt.

Eine Schlüsselrolle nimmt hierbei die M2-PK ein, welche je nach Bedarf die Kohlenstoffatome der Glucose in den entsprechenden Stoffwechselweg dirigiert. Die tetramere aktive Form der Pyruvatkinase katalysiert die Phosphatübertragung von Phosphoenolpyruvat auf ADP, wodurch Energie in Form von ATP entsteht. Die dimere inaktive und in Tumorzellen vorherrschende Form führt zur Anhäufung von metabolischen Intermediaten für die Synthese von Nukleinsäuren, Aminosäuren und Fetten (Mazurek et al. 2005).

Immunhistochemischer Nachweis von pAkt

Ein Schlüsselenzym des glykolytischen Stoffwechsels in Tumorzellen ist die Serin/Threonin-Kinase Akt, welche die Expression und Aktivität verschiedener Proteine und Enzyme beeinflusst und somit den Warburg-Effekt in Krebszellen fördert. Die Aktivierung von Akt (phosphorylierte Form, pAkt) führt zu einer gesteigerten Transkription und Membranlokalisation des Glucosetransporters GLUT-1, einer vermehrten Bindung der Hexokinase an die äußere Mitochondrienmembran (Rathmell et al. 2003) und zu einer Hemmung der Fettsäureoxidation (Buzzai et al. 2005).

Immunhistochemischer Nachweis von GLUT-1

Die Bedeutung der Glucosetransporter wurde im Abschnitt 1.2.3 bereits detailliert beschrieben. Für den Glucosetransporter GLUT-1 wurde eine verstärkte Expression an der Zellmembran bei Brusttumoren (Younes et al. 1996) und beim Plattenepithelkarzinom (Baer et al. 1997) nachgewiesen. Die Expression korreliert mit dem Tumorgrad und der Invasivität (Younes et al. 1995; Grover-McKay et al. 1998). Beim duktalem Mammakarzinom wurde GLUT-1 erst ab dem Stadium des duktales Carcinoma *in situ* und hier vor allem an der Plasmamembran detektiert (Chen et al. 2010).

Immunhistochemischer Nachweis von MCT-1

Durch den hohen Glucoseumsatz in Tumorzellen kommt es unweigerlich zu einer gesteigerten Laktatproduktion und zu einer Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes. Für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus wird die Milchsäure im Ko-Transport mit Protonen über den Monocarboxylattransporter 4 (MCT 4) aus der Zelle transportiert. MCT-1 wird von den meisten Zellen/Geweben exprimiert und importiert Ketonkörper, Pyruvat und Laktat zur Energiegewinnung (Garcia et al. 1994 a, b). Laktat kann auch über MCT-1 aus der Zelle hinaus transportiert werden (Poole und Halestrap 1993). Dieser Transport ist abhängig vom Konzentrationsgradienten zwischen Zytoplasma und extrazellulärer Laktatkonzentration (Halestrap und Price 1999). Der Haupttransport von Laktat nach extrazellulär wird durch MCT-4 vermittelt (Halestrap und Meredith 2003). MCT-4 kommt hauptsächlich in hoch-glykolytischen Zellen vor wie Tumorzellen oder Leukozyten (Dimmer et al. 2000). Verschiedene Studien der letzten Jahre konnten zeigen, dass MCT-1 in Tumoren überexprimiert ist,

z. B. in Brustkrebs (Pinheiro et al. 2010), hochgradigen Glioblastomen (Froberg et al. 2001) und kolorektalen Karzinomen (Pinheiro et al. 2008). Eine Studie von Soneveaux et al. berichtet von einer Art Symbiose zwischen hypoxischen und normoxischen Tumorzellen bzgl. des Laktats. Hypoxische Zellen produzieren große Mengen Laktat welches über MCT-4 in die Umgebung exportiert wird. Oxygenierte Tumorzellen nehmen dieses Laktat über MCT-1 auf und konvertieren es in Pyruvat für die oxidative Energiegewinnung (Soneveaux et al. 2008).

Immunhistochemischer Nachweis von HIF1- α

Wie im 1.2.3 (Mikromilieu des Tumors) bereits ausführlich beschrieben weisen solide Tumore hypoxische oder anoxische Areale auf. Als Anpassung an diese Bedingungen exprimieren Tumorzellen verstärkt die Hypoxie-induzierbaren Faktor HIF-1 α und HIF-2 α . Ein heterogenes Expressionsmuster beider Proteine wurde u. a. in Tumoren von Brust, Darm, Eierstock, Bauchspeicheldrüse und Niere detektiert (Talks et al. 2000). Als prognostischer Marker sind sowohl HIF-1 α als auch HIF-2 α von Bedeutung. Bei Brustkrebs korreliert eine hohe Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und schlechtem Therapieerfolg für Patienten (Leek et al. 2002, Giatromanolaki et al. 2006).

Die Expression von HIF in Tumoren wurde von vielen Arbeitsgruppen untersucht. Chen et al. analysierten die Expression von HIF-1 α bei verschiedenen Stadien des duktales Mammakarzinoms. Ab dem Stadium der duktales Hyperplasie war HIF-1 α im Gewebe exprimiert, jedoch nicht in normalem Brustgewebe. Beim duktales Carcinoma *in situ* und invasivem duktales Karzinom fanden sie eine diffuse nukleäre Färbung (Chen et al. 2010). Untersuchungen von van der Groep et al. ergaben, dass bei erblich bedingtem Brustkrebs HIF-1 α in 90 % der untersuchten Gewebe überexprimiert war, bei sporadisch aufgetretenen Brustkrebserkrankungen in 44 % der Fälle (van der Groep et al. 2007). Wie bereits im Abschnitt 1.2.3 erläutert, wird die Expression von HIF nicht nur durch Sauerstoffmangel induziert. Auch bei normalen Sauerstoffbedingungen, d. h. 21 %, wurde HIF-1 α -Protein in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen, so z. B. in der Zelllinie UM-22B, die aus einer Metastase eines Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms isoliert wurde (McFate et al. 2008). In MDA-MB 231 detektierten Robey et al. HIF-1 α -Protein auch unter normoxischen Bedingungen, wobei die Proteinexpression durch Hypoxie (16 - 20 Std. bei \leq 2 % Sauerstoff) noch weiter gesteigert wurde (Robey et al. 2005).

Ziel 6:**1.8.3 Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die Expression von Transkriptionsfaktoren, Stoffwechseltransporter und Enzymen**

Wie oben bereits beschrieben ist das Mikromilieu solider Tumore starken Schwankungen der Sauerkonzentration unterlegen, wodurch hypoxische Bedingungen entstehen. Hypoxie induziert u. a. die Expression von Genen der Glykolyse, der Glucoseaufnahme und verschiedene Transkriptionsfaktoren (Harris 2002) und ist Ursache für Tumorprogression und Therapieresistenz (Vaupel et al. 2006). Untersuchungen an gesundem und malignem Brustgewebe ergaben folgende Sauerstoffpartialdrücke (pO_2).

Tab. 4: Sauerstoffpartialdrücke (pO_2) in gesundem und malignem Brustgewebe.

Gewebe	Sauerstoffpartialdruck
Gesundes Brustgewebe	6,5 %
Malignes Brustgewebe	0,35 - 1,9 %

(Entnommen aus Vaupel et al. 2003).

Für *in vitro*-Experimente werden die Zellen normalerweise bei 21 % Sauerstoff und optimalen Nährstoffbedingungen kultiviert, was nicht der *in vivo*-Situation entspricht. Daher wurden sowohl Tumorzellen als auch benigne Zellen unter Sauerstoffbedingungen kultiviert, wie sie *in vivo* vorzufinden sind. Der Schwellenwert, ab dem HIF-1 und -2 stabilisiert werden, liegt bei etwa 5 % Sauerstoff (Klimova und Chandel 2008). Der Einfluss beschränkter Sauerstoffkonzentrationen auf die Regulation von Transkriptionsfaktoren (HIF-1 α , HIF-2 α), Stoffwechseltransporter (GLUT-1 bis GLUT-5) und Enzyme (Glyoxalase-1 und -2, LDH-A, PDK-1 bis PDK-4) wurde auf mRNA- bzw. Proteinebene untersucht.

Glucosetransporter GLUT-1 bis GLUT-5

Die Bedeutung der Glucosetransporter wurde bereits in Abschnitt 1.2.3 beschrieben.

Hypoxie-induzierbarer-Faktor HIF

Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α wurde bereits in Abschnitt 1.2.3 beschrieben.

Glyoxalasen

Das Enzymsystem der Glyoxalasen nimmt im glykolytischen Stoffwechsel eine wichtige Rolle ein. Das Glyoxalasesystem besteht aus den beiden homodimeren Metalloenzymen Glyoxalase 1 und 2. Diese beiden Enzyme katalysieren die Detoxifizierung von Methylglyoxal, welches als Nebenprodukt der Glykolyse aus Glycerol-3-phosphat entsteht, und wandeln es in D-Laktat um. In Kolonkarzinomen (Ranganathan et al. 1993) und fötalen Geweben (Amicarelli et al. 1998) wurde eine gesteigerte Aktivität der Glyoxalase 1 nachgewiesen. Möglicherweise sind Tumore mit hoher Glyoxalaseaktivität resistenter gegenüber Chemotherapeutika (Sakamoto et al. 2000, Ranganathan et al. 1995). Die Entgiftung des Methylglyoxal durch Glyoxalase 1 und 2 ist vor allem für glykolytische Tumorzellen von Bedeutung, da hierdurch eine hohe Glykolyserate aufrechterhalten werden kann ohne dass schädigende Nebenprodukte akkumulieren.

Pyruvatdehydrogenase-Kinase und Laktatdehydrogenase

Zwei Enzyme, die im glykolytischen Tumorstoffwechsel eine wichtige Rolle spielen sind Laktatdehydrogenase A und Pyruvatdehydrogenase, welche den Abbauweg von Pyruvat bestimmen.

Laktatdehydrogenase A (LDH-A), welche ebenfalls durch HIF-1 reguliert wird (Semenza et al. 1996), katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat wobei NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Das Enzym wurde bereits ausführlich im Abschnitt 1.4.1 (Oxamat) beschrieben. Im Gegensatz zu normalen Geweben ist LDH-A in Tumoren hochreguliert (Balinsky et al. 1983, Hilf et al. 1976).

HIF-1 α reguliert auch die Expression des Pyruvatdehydrogenasekomplexes (PDH) in Mitochondrien. Dieser Enzymkomplex und seine Regulation wurden im Abschnitt 1.4.2 (NaDCA) bereits ausführlich beschrieben und werden hier nur nochmals kurz umrissen.

Unter normoxischen Bedingungen wird Pyruvat durch die Pyruvatdehydrogenase (PDH) zu Acetyl-CoA abgebaut, der erste Schritt des Krebs-Zyklus. Unter hypoxischen Bedingungen wird über HIF-1 α die Expression der PDK gesteigert.

Dadurch wird die PDH phosphoryliert, also inaktiv, und Pyruvat kann nicht zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Das sich hierdurch anstauende Pyruvat wird nun zu Laktat abgebaut, um einen weiteren Flux durch die Glykolyse zu erlauben. Kim et al. konnten nachweisen, dass dies eine wichtige Anpassungsreaktion für das Überleben von Tumorzellen unter anhaltenden hypoxischen Bedingungen ist (Kim et al. 2006).

2 Material

2.1 Chemikalien

Acrylamid (30 %ig)	Roth, Karlsruhe
Agarose, TopVision™	Fermentas, St. Leon-Rot
Ammoniumpersulfat	Sigma, Steinheim
Amphotericin B (250 mg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Antibody Diluent	Dako, Hamburg
Beriglobin	Csl Berhing GmbH, Haltersheim
Blottingpapier 550 g/m ² Format 580 x 600 mm	Hartenstein, Würzburg
Borsäure	AppliChem, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
3-Brombrenztraubensäure ≥97 %	Sigma
2-Deoxy-D-Glucose ≥98 %	Sigma
6-Diazo-5-oxo-L-norleuzin (DON) ≥98 %	Sigma
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Coumarinsäure	Sigma
Cryo-SFM	PromoCell, Heidelberg
DEPC-Wasser	Promega, Mannheim
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma
2,4-Dinitrophenol 97 %	Sigma
DMEM ohne L-Glutamin, ohne Glucose	PAA, Pasching, Österreich
DMEM/Ham's F12 mit L-Glutamin	PAA
DMSO	Sigma
DNA-Ladepuffer 6x	Fermentas
DNase	Sigma
DTT	Sigma
EDTA	AppliChem
Eindeckmittel Vitro-Clud®	Langenbrinck, Emmendingen
Entwicklerlösung	Kodak, Stuttgart-Wange
EnVision+ System-HRP	Dako
Ethanol 70 %	Apotheke Universitätsklinikum Würzburg

Ethanol zur Analyse 100 %	Sigma
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Sigma
Essigsäure	Merck
Endothelial Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg
Fibroblast Basal Medium 2	PromoCell
Fixierlösung	Kodak, Stuttgart-Wangen
Formalin	Merck
Fötale Kälberserum (FCS Gold)	PAA
Gentamycin (10 mg/ml)	PAA
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas
Glycin	Calbiochem, Bezug über Merck
Hämalaun	Merck
Hepes	Sigma
H ₂ O ₂ 30 %ig	Merck, Darmstadt
Hyaluronidase	Sigma
Isopropanol	Apotheke Universitätsklinikum Würzburg
Kaliumchlorid	Sigma
Keratinocyte Growth Medium 2	PromoCell
Kollagenase I	Sigma
Kristallviolett	Sigma
Liquid DAB+ Substrat	Dako
Luminol	Sigma
Lymphozytenseparationsmedium 1077	PAA
Magermilchpulver	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma
Metformin 97 %	Sigma
Methanol	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Natrium-Citrat (Alsever)	Haemonetics, Massachusetts, USA
Natriumchlorid	Sigma
Natrium-Deoxycholat	AppliChem
Natrium-Dichloracetat 98 %	Sigma

Natrium-Fluorid ≥ 99 %	Fluka, Bezug über Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Sigma
Natriumhydroxid (1N)	Merck
Natrium-Iodoacetat ≥ 98 %	Sigma
Natrium-Oxamat 98 %	Sigma
2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino] -2-deoxy-D-glucose (2-NBDG)	Invitrogen, Darmstadt
Nonidet P40 [®] (NP-40)	Applichem
Oligomycin von <i>Streptomyces</i> <i>diastatochromogenes</i> ≥ 90 %	Sigma
Oxythiamin Chlorid Hydrochlorid ≥ 95 %	Sigma,
PageRuler [™] Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon
Paraffin	Merck
PBS-Lösung mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin
PBS Trockensubstanz ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II	Calbiochem
Ponceau S 0,1 %	Sigma
Propidiumjodid	Sigma
Resazurin	Sigma
Rhodamine 123	Sigma
Rotenon ≥ 95 %	Sigma
Roti [®] -Quant	Roth
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA
Salzsäure, rauchend 37 %	Merck
SDS ultra pure	Roth
TEMED	Sigma
Tris-glycine-SDS Electrophoresis Buffer 10x (= Laufpuffer)	Fermentas
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris Base)	Calbiochem
Trypanblaulösung 0,4 % (w/v)	Sigma
Trypsin/EDTA Solution in PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom AG
Tween 20	Roth
Xylol	Roth

Zitronensäure-Monohydrat

Merck

2.2 Größenstandards

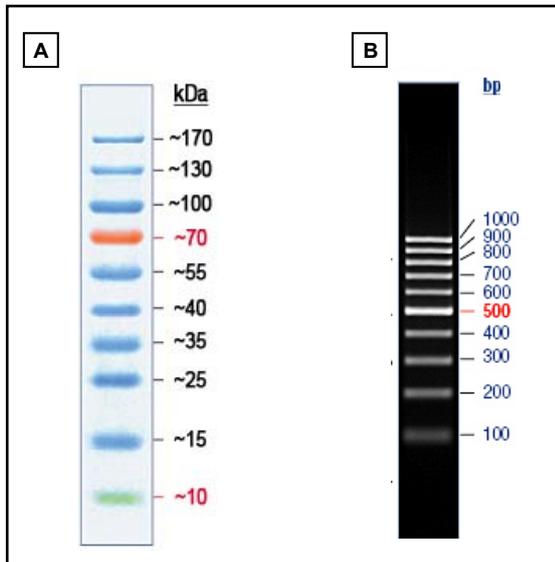


Abb. 23: Protein- und DNA-Größenstandards. PageRuler™ Prestained Protein Ladder für SDS-Polyacrylamidgele (A) und Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus für DNA-Agarosegele (B). Beide Fermentas.

2.3 Antikörper

Tab. 5: Antikörper für Westernblot

Spezifität	Isotyp	Klon	End- verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen–anti-Mensch LDH-A	IgG		1:10000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaninchen–anti-Mensch PDK-1	IgG		1:5000	Sigma-Aldrich
Kaninchen–anti-Mensch PDK-2	IgG		1:5000	Sigma-Aldrich
Kaninchen–anti-Mensch PDK-3	IgG		1:5000	Sigma-Aldrich
Kaninchen–anti-Mensch PDK-4	IgG		1:5000	Sigma-Aldrich
Maus-anti-Mensch β-Actin	IgG1	abcam 8226	1:10000	Abcam, Cambridge, UK
Ziege-anti-Maus HRP	IgG		1:7500	KPL, Maryland, USA Bezug über Medac GmbH, Wedel
Ziege-anti-Kaninchen HRP	IgG		1:7500	KPL

Tab. 6: Antikörper für Immunhistologie

Spezifität	Isotyp	Klon	End- verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen-anti-Mensch Glucose Transporter 1 GLUT 1	IgG		1:100	US Biologicals Massachusetts, USA
Kaninchen-anti-Mensch HIF 1 α	IgG		1:500	Sigma
Maus-anti-Mensch M2-PK	IgG1	DF4	1:250	ScheBo Biotech, Giessen
Kaninchen-anti-Mensch pAkt	IgG		1:100	Abcam
Kaninchen-anti-Mensch MCT-1	IgG		1:1000	AbD Serotec, UK Bezug über MorphoSys AG, Martinsried/ Planegg
Kaninchen-anti-Mensch EnVision HRP			unverdünnt	Dako
Maus-anti-Mensch EnVision HRP			unverdünnt	Dako

Antikörper für magnetische Zellseparation

Anti-Fibroblast MicroBeads, Mensch

Miltenyi Biotec,
Bergisch Gladbach

2.4 Primer für PCR

Tab. 7: Primer

Primer	Sequenz	Produktlänge	Annealing-Temperatur
GLUT-1 F GLUT-1 R	5' CTC CCC ACA CAC ACA AAA TG 5' CCA AAT CGG CAT CTT CTC AT	241 bp	55°C
GLUT-2 F GLUT-2 R	5' GGA CAG CCT GGT TTT CAC AT 5' GAA GCC CAC ACT CAG GAA TC	205 bp	57°C
GLUT-3 F GLUT-3 R	5' ACC GGC TTC CTC ATT ACC TT 5' AGG CTC GAT GCT GTT CAT CT	159 bp	57°C
GLUT-4 F GLUT-4 R	5' AAT TCT TGC CAC GCA GAC TC 5' TAA CAT GGT GAA ACC GCG TA	248 bp	55°C
GLUT-5 F GLUT-5 R	5' CAT CAC TGT TGG CAT CCT TG 5' GCG TCT GTA GGG CTT TCT TG	203 bp	57°C
HIF-1a L1 HIF-1a R1	5' ACC CAC CGC TGA AAC GCC AA 5' TCA GGG CTT GCG GAA CTG CT	414 bp	58°C
HIF-2a L1 HIF-2a R1	5' TGT CAG GCA TGG CAA GCC GG 5' AGG GCT CTG CGA GGG AGA CG	640 bp	58°C
GLO1-L2 GLO1-R2	5' GGC TCT TGG GCT GGA GTA CCG 5' CAA GCA CGG TTG GCA TGG CCT	375 bp	57°C
GLO2-L2 GLO2R2	5' GAC GAC CGT ATC GGG GCC CT 5' GCC AGC TTC TCC CGG ATG GC	359 bp	58°C

F = *forward*-Primer, R = *reverse*-Primer. L = linker Primer. R = rechter Primer.

2.5 Laborgeräte

Analysenwaage Explorer	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Biophotometer	Eppendorf
Brutschrank NAPCO Model 5420-1R	Labotect, Göttingen
Digitalkamera Powershot A620	Canon, Krefeld
Drucker Video Graphic Printer ,UP-890CE	Sony, Japan
Einkanal- und Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
ELISA-Platten-Lesegerät Genios Plus	Tecan, Grödig, Österreich
FACScan [®]	BD Biosciences, Heidelberg
Filmkassette Dr. Goos-Suprema	Hartenstein
Gefriertruhe GTS 2563 Öko-super	Liebherr, Österreich
Gefriertruhe Herafreeze HFC 586 Basic	Thermo Electron Corporation, Langensfeld
Gelelektrophoresekammer	
Model 45-1010 Class II	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Hybridisierungs-Ofen Techne Hybridizer HB-1D	Techne Inc, Burlington, Kanada
Hypoxiewerkbank Polymer Hypoxie Glove Box	Coy Laboratory Products, Michigan, USA
	Bezug über Toepffer Laborsysteme, Göppingen
Kryotom Leica CM 1900	Leica, Solms
Lichtmikroskop Typ DM IRB	Leica
Magnetrührer Ikamag [®] RH	IKA Labortechnik, Staufen
Microcomputer Electrophoresis Power Supply E835 300V-500mA	Consort, Turnhout, Belgien
Mini-MACS-Zellseparationsgerät	Miltenyi Biotec
Minishaker KMS1	KA-Labortechnik, Staufen
Multipipette [®] plus	Eppendorf, Hamburg
Owl B2 Easy Cast Mini Elektrophorese Kammer	Thermo Fisher Scientific
PH 211 Micorprocessor pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl
Pipettierhilfe accu-jet [®]	Brand, Wertheim
Präzisionswaage 510-33 max. 600 g	Kern, Albstadt

Px2 Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific
Sicherheitswerkbank SterilGARD® Class II Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, Maine, USA
Semi-Dry Elektrobloetter 45-1010 ClassII	PEQLAB Biotechnologie
Techne Progene Thermal Cycler	Techne, Burlington Kanada
Tischzentrifuge EBA12	Hettich, Tuttlingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Transferpette®-8 30-300 µL	Brand, Wertheim
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
UV-Transilluminator Biometra TI 1	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe	VacuBrand, Wertheim
Vortexgerät MS 1 Minishaker	Ika Works Inc, Wilmington, USA
xCELLigence System	
Analyseeinheit	
Messstation	
Kontrolleinheit	Roche, Mannheim
Zählkammer Neubauer (0,1 mm/0,0025 cm ²)	Brand, Wertheim
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Universal 32	Hettich
Zentrifuge Universal 16R	Hettich

2.6 Verbrauchsmaterialien

Blottingpapier 550 g/m ² Format 580 x 600 mm	Hartenstein
Deckgläser 24 x 60 mm	Nunc, Wiesbaden
Einfrierbehälter Nalgene® Mr. Frosty	Sigma
Einmalspritzen	BD Biosciences
E-Platten 96 für xCELLigence	Roche, Mannheim
Färbebox aus POM Kunststoff	Hartenstein
Film UPP-100s Typ I 110 x 20 mm	Sony, Japan
Film Fuji Medical X-Ray Film	Fuji Tokio, Japan
	Bezug über Hartenstein
Gewebekapsel	Langenbrinck
Knopfkanüle	Gynemed, Lensahn

Kryokonservierungsröhrchen	Nunc
MACS Preseparationsfilter	Miltenyi Biotec
MACS Präparationssäule LS	Miltenyi Biotec
Mullkomresse Gazin®	Lohmann & Rauscher, Neuwied
FACS-Röhrchen 5 ml, Polypropylen	Hartenstein
Adhäsions-Objektträger SuperFrost®	Langenbrinck
PCR-Streifen mit Deckel	Hartenstein
Perfusorspritze 50 ml	BBraun, Meslungen
Pipettenspitzen	Eppendorf
Protran™ Nitrocellulose Membran	Whatman GmbH, Dassel
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Polypropylenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Schere	VWR, Darmstadt
Skalpell	Aesculap, Tuttlingen
Stahlnetz, steril, Porengröße 50 µm	VWR
Stahlsieb	VWR
Spritzenfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht
UV-Küvette Mikro	Brand
Venenklemme	VWR
Wiegemesser	WMF, Geislingen
Zellkulturflaschen 75 cm ² und 175 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturtestplatten 24-Loch Flachboden, klar	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatten 96-Loch Flachboden, klar	TPP
Zellkulturtestplatten 96-Loch Flachboden, weiß	Costar, Bezug über Schubert & Weiß
Zellkulturschale 146 mm Ø	TPP

2.7 Software

GraphPad Prism Version 4.0	GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA
Image J	Freeware, NIH, Bethesda, MD, USA
RTCA Software	Roche, Mannheim
Pimer-BLAST	NCBI, Bethesda, USA
WinMDI Version 2.8	Joe Trotter, The Scripps Research Institute, San Diego, USA
Windows XP	Microsoft Corporation, Redmond, USA

2.8 Kits

CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Mannheim
Detach Kit für Keratinozyten	PromoCell
In vitro toxicology assay kit, Resazurin based	Sigma
GoTaq [®] Colorless Mastermix für PCR	Promega
NE-PER [®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Fischer Scientific
NucleoSpin [®] RNA/Protein Isolations-Kit	Machery-Nagel, Düren
RevertAid [™] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
UV-Test zur Bestimmung von L-Milchsäure	Boehringer Mannheim/ R-Biopharm, Darmstadt
WST-8 Cell Proliferation Assay Kit	Cayman, Bezug über Biozol, Eching

2.9 Medien, Puffer, Lösungen

2.9.1 Medien für Zellkultur

(Angaben beziehen sich auf angesetzte Arbeitslösung)

Zellkulturmedium für MDA-MB 231, MDA-MB 468, 23132/87 und Fibroblasten

DMEM/Ham's F12 mit 3151 mg/l D-Glucose und 365 mg/l L-Glutamin

(Fa. PAA, Kat.-Nr.: E15-813)

20 µg/ml Gentamycin

10 % (v/v) FCS

Zellkulturmedium für Leukozyten

RPMI 1640 mit 2000 mg/l D-Glucose und 300 mg/l L-Glutamin

(Fa. PAA, Kat.-Nr.: E15-840)

20 µg/ml Gentamycin

10 % (v/v) FCS

Zellkulturmedium für Keratinozyten

Keratinocyte Growth Medium 2 mit 1000 mg/l D-Glucose

(Fa. PromoCell, Kat.-Nr.: C-20011)

Supplementmix, 12 ml auf 500 ml Medium (Fa. PromoCell, Kat.-Nr.: C-39016)

CaCl₂-Lösung, 150 µl, 0,5 M

20 µg/ml Gentamycin

Zellkulturmedium für Endothelzellen

Endothelial Cell Growth Medium 2 mit 1000 mg/l D-Glucose

(Fa. PromoCell, Kat.-Nr.: C-22011)

Supplementmix, 12 ml auf 500 ml Medium (Fa. PromoCell, Kat.-Nr.: C-39211)

20 µg/ml Gentamycin

Adhäsionsmedium für Endothelzellen

Endothelial Cell Growth Medium 2 mit 1000 mg/l D-Glucose

(Fa. PromoCell, Kat.-Nr.: C-22011)

20 µg/ml Gentamycin

500 µg/ml Amphotericin B

Anzuchtmedium für Fibroblasten

Fibroblast Basal Medium 2 mit 1440 mg/l Glucose (Fa. PromoCell, Kat.-Nr.: C-23220)

20 µg/ml Gentamycin

Medium für Zuckeraufnahmetest

DMEM ohne L-Glutamin, ohne Glucose (Fa. PAA, Kat.-Nr.: E15-079)

10 % (v/v) FCS

Einfriermedium für MDA-MB 468, MDA-MB 231, 23132/87, Fibroblasten

Zellkulturmedium für MDA-MB 468, MDA-MB 231, 23132/87, Fibroblasten

10 % DMSO

Einfriermedium für Leukozyten

Zellkulturmedium für Leukozyten / 10 % DMSO

Einfriermedium für HUVEC

Zellkulturmedium für Endothelzellen / 10 % DMSO

Einfriermedium für Keratinozyten

Cryo-SFM, Fa. PromoCell

2.9.2 Puffer und Lösungen

PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (pH 7,4): PBSohne

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄

PBS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (pH 7,4): PBSmit

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄
0,5 mM MgCl₂
0,9 mM CaCl₂

Stammlösung A für Citratpuffer: 0,1 M Zitronensäure in Aqua bidest

Stammlösung B für Citratpuffer: 0,1 M Natriumcitrat in Aqua bidest

10 mM Citratpuffer pH 6,0

9 ml Stammlösung A
41 ml Stammlösung B
auf 500 ml mit Aqua bidest
auf pH 6,0 einstellen mit NaOH

Fixierlösung für Immunhistochemie: 2 % Formalin in PBSohne (v/v)

Peroxidaseblockierungslösung für Immunhistochemie: 3 % H₂O₂ in Methanol (v/v)

Waschpuffer für Isolierung von Endothelzellen aus Nabelschnur

PBSohne / 20 µg/ml Gentamycin / 500 µg/ml Amphotericin B

MACS-Puffer: PBS*mit* / 1 % BSA / 1 mM EDTA

über eine Vakuumpumpe für 30 min. entgast, immer eiskalt verwendet

FACS-Puffer: PBS*ohne* / 10 % FCS

PBS-Tween (PBS-T): 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS*ohne*

Ripa-Puffer

25 mM Tris/HCl pH 7,6

150 mM NaCl

1 % (w/v) NP-40

1 % (w/v) Na-Deoxycholat

0,1 % (w/v) SDS

2 mM DTT

Proteaseinhibitorlösung 1:25

Phosphataseinhibitorlösung 1:100

Elektrophoresepuffer pH 8,3

25 mM Tris Base

250 mM Glycin

auf 1 l mit Aqua bidest

0,1 % (w/v) SDS

Transferpuffer pH 8,3

25 mM Tris Base

192 mM Glycin

auf 800 ml mit Aqua bidest

0,037 % (w/v) SDS

20 % (v/v) Methanol

TBE-Puffer

89 mM Tris

2 mM EDTA

89 mM Borsäure

Proteaseinhibitorlösung für Zelllysate

1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail
in 2 ml Aqua bidest

2 %ige bzw. 5 %ige Magermilchlösung

2 % bzw. 5 % Magermilchpulver (w/v) in PBSohne-T

ECL-Entwicklerlösung

90,88 % (v/v) Lösung A (1,26 mM Luminol in 0,1 M Tris/HCl pH 8,6)
9,09 % (v/v) Lösung B (6,7 mM Coumarinsäure in DMSO)
0,03 % (v/v) Lösung C (30 %iges H₂O₂)

„Stripping“-Puffer

0,2 M Glycin pH 2,2
0,1 % (w/v) SDS
1 % (v/v) Tween 20

Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) (v/v)

Trypsin/EDTA Lösung (10x) 0,5 %/0,2 % (w/v) in 10x PBSohne gelöst 1:10 in
Aqua bidest

Kristallviolettlösung

0,5 % (w/v) Kristallviolettpulver
25 % (v/v) Methanol
75 % (v/v) PBSohne

Kollagenase-I-Mix in PBSmit

Kollagenase I 400U/ml
DNase 48 U/ml
Hyaluronidase 200 U/ml

PBS/Citrat: PBSohne / 5,3 mM NaCitrat

Glukose-freie Locke's Lösung

154 mM NaCl,
5,6 mM KCl
2,3 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
3,6 mM NaHCO₃
5 mM Hepes

CaCl₂ wurde erst in die Lösung gegeben, nachdem die anderen Salze gelöst waren, da sonst schwerlösliches Ca(CO₃)₂ entsteht.

2.10 Zelllinien

Die MDA-MB 231-Mammakarzinomzelllinie gilt als hormonunabhängig, da nahezu kein Progesteron- und nur sehr geringe Mengen an Estrogenrezeptoren nachweisbar sind (Engel und Young 1978). Die Zelllinie MDA-MB 468 ist ebenfalls negativ für den Estrogenrezeptor und relativ stark entdifferenziert, gilt aber als wenig maligne (Zhang et al 1991). Die Zelllinien MDA-MB 468, MDA-MB 231 wurden von der Firma Cell Line Service (CLS, Eppelheim) bezogen. Die Magenkarzinomzelllinie 23132/87 wurde im Jahre 1987 von Vollmers und Mitarbeitern aus dem Magenadenokarzinom eines 72-jährigen Mannes etabliert (Vollmers et al. 1993). Bei dieser Zelllinie handelt es sich um einen intestinalen Wachstumstypen nach Laurén.

Die Leukozyten wurden aus peripherem Blut isoliert. Dieses Blut wurde vom Institut für klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg bezogen.

Fibroblasten wurden aus Deziduagewebe isoliert. Das Gewebe stammte von Frauen, die sich einer Abtreibung im Rahmen der Fristenlösung mittels Saugkürettage unterzogen haben und fiel aus anderen Forschungsprojekten an.

HUVEC wurden aus der Vene von Nabelschnüren isoliert. Die Nabelschnüre wurden direkt nach der Entbindung aus dem Kreissaal von der Universitäts-Frauenklinik Würzburg bezogen. Gemäß dem Ethikvotum wurde die Einverständniserklärung der Mutter eingeholt.

Primäre Keratinozyten wurden von der Firma PromoCell (Heidelberg) bezogen.

Tab. 8: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie/Gewebe	Histologie	Herkunft	Referenz
MDA-MB 468 Brust	Adenokarzinom	Pleuraerguß 51-jährige schwarze Patientin	Cailleau R et al. 1978
MDA-MB 231 Brust	Adenokarzinom	Pleuraerguß 51-jährige Kaukasierin	Cailleau R et al. 1974
23132/87 Magen	Adenokarzinom	Primärtumor 72-jähriger Mann	Vollmers, H.P., et al. 1993

Die beiden Zelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231 gehören beide zur Entität Brustkrebs, sind aber in einigen Merkmalen verschieden, wodurch sich möglicherweise Unterschiede in der Sensitivität gegenüber den getesteten Substanzen ergeben könnten. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Merkmale der beiden Brustkrebszelllinien.

Tab. 9: Merkmale der beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231.

Zelllinie	ER-Status	tumorigenes Potenzial	p53 Status	Ras Mutation	andere Merkmale
MDA-MB 468	-	++	mutiert	keine Angabe	EGF-R + PTEN -
MDA-MB 231	-	+++	mutiert	+	-

EGF-R: *Epidermal Growth Factor Receptor*, epidermaler Wachstumsfaktor. PTEN: Phosphatase und Tensin Homolog. (Übernommen aus Blancher et al. 2000).

2.11 Primäre Zellen

Tab. 10: Primäre Zellen.

Zelle	Herkunft
Leukozyten	peripheres Blut gesunder Blutspender
Fibroblasten	Deziduagewebe, 6. - 11. Schwangerschaftswoche
HUVEC	Nabelschnur
Keratinocyten	Epidermis, adult, Fa. PromoCell

2.12 Verwendete Substanzen

Tab. 11: Glykolyseinhibitoren

Substanz	Wirkungsweise
2-Deoxy-D-Glucose	Kompetitive Hemmung der Hexokinase
3-Bromopuyruvat	Hemmung Hexokinase II
Iodoacetat	Hemmung GA3PDH
Natriumfluorid	Hemmung Enolase
Oxamat	Hemmung LDH

Tab. 12: Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen

Substanz	Wirkungsweise
Rotenon	Hemmung Komplex I der Atmungskette
Oligomycin	Hemmung F_0F_1 ATPase
2,4-Dinitrophenol	Entkoppler Mitochondrien
Rhodamin 123	Entkoppler Mitochondrien
NaDCA	Hemmung PDH

Tab. 13: Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen

Substanz	Wirkungsweise
Oxythiamin	Hemmung TK und PDH
DON	Hemmung Glutaminase
Metformin	Aktivierung AMPK
Perifosin	inhibiert p-Akt
Sorafenib	Multikinaseinhibitor (u. a. Raf-1, B-RAF, cKIT, VEGFR-1)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung und Passagieren adhärenter Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank (Klasse II) durchgeführt. Die Zellen wurden im entsprechenden Zellkulturmedium bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Wasserdampfsättigung im Zellinkubator kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % wurden die Zellen passagiert.

Im Folgenden wird das Passagieren für MDA-MB 468, MDA-MB 231, 23132/87 und HUVEC beschrieben. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS ohne gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung 5-10 min. unter wiederholter Kontrolle im Brutschrank inkubiert, bis sich erkennbar die Zellrasen vom Boden abklopfen ließen. Die gelösten Zellen wurden in 10 ml PBS ohne aufgenommen und in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 280 x g für 10 min. bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Fibroblasten und HUVEC wurden im Verhältnis 1:2, MDA-MB 231 und MDA-MB 468 im Verhältnis 1:4 und 23132/87 im Verhältnis 1:8 auf neue Flaschen aufgeteilt und mit frischem Medium versorgt. Zwischen den Passagen erfolgte alle zwei bis drei Tage ein kompletter Austausch des Zellkulturmediums. Wurden die Zellen für Experimente verwendet, wurde die Zellzahl in der Suspension mittels Trypanblaufärbung ermittelt.

Passagieren von Keratinozyten

Für das Passagieren von Keratinozyten wurde ein spezieller Detach-Kit verwendet, in dem alle benötigten Lösungen gebrauchsfertig geliefert wurden. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen mit 5 ml HEPES-BSS unter leichtem Schwenken für 30 Sek. gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit 100 µl Trypsin/EDTA-Lösung pro cm² Wachstumsfläche bei RT inkubiert. Der Ablösevorgang wurde permanent unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Nachdem etwa 50 % der Zellen abgeschwommen waren, wurden die restlichen Zellen durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflasche abgelöst. Zum Abstoppen wurden 100 µl „Trypsin Neutralizing Solution“ pro cm² Wachstumsfläche hinzupipettiert und die

Zellen in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgt für 4 min. bei 220 x g bei RT. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment in Zellkulturmedium resuspendiert. Die Keratinozyten wurden im Verhältnis 1:2 auf jeweils neue Zellkulturflaschen geteilt. Zwischen den Passagen erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Austausch des Zellkulturmediums. Wurden die Zellen für Experimente verwendet, schloss sich an das Resuspendieren eine Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblaufärbung an.

3.1.2 Kultivierung von Zellen unter Hypoxie

Die Inkubation von Zellen unter Sauerstoffmangelbedingungen erfolgte in der Hypoxiewerkbank „Polymer Hypoxie Glove Box“. Die Werkbank ermöglicht die Kultivierung der Zellen unter konstanten hypoxischen Bedingungen (5 % O₂, 5 % CO₂, 90 % N₂) und 95 % Wasserdampfsättigung.

3.1.3 Zellfärbung und Zellzählung

Zur Bestimmung der Anzahl an vitalen Zellen wurden diese mit 0,4 % Trypanblau gefärbt. Aufgrund der Membranschädigung nehmen tote Zellen den Farbstoff ins Cytoplasma auf, während lebende Zellen nicht angefärbt werden. Die resuspendierten Zellen wurden 1:2 mit Trypanblau verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden vier Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times \text{Volumen der Zellsuspension in ml} \times 10^4}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}}$$

Abb. 24: Formel zur Berechnung der Zellzahl.

3.1.4 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1-4 x 10⁶/ml im entsprechenden Einfriermedium resuspendiert und in Kryokonservierungsröhrchen überführt. Die Zellen wurden mittels eines speziellen Einfrierbehälters (Mr. Frosty) mit einer Abkühlungsrate von 1°C/min. auf -80°C abgekühlt und anschließend für die längerfristige Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Für die Reaktivierung wurden die Zellen in den Einfrierröhrchen (alle verwendeten Zellen bis auf Keratinozyten) in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und sofort in ein PP-Röhrchen mit 40 ml PBS ohne überführt. Die Zellen wurden bei 280 x g für 10 min. bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen im entsprechenden Zellkulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät.

Reaktivierung von Keratinozyten

Für die Reaktivierung von Keratinozyten wurden diese in einem 37°C warmen Wasserbad zu 90 % aufgetaut und durch sanftes Schütteln bei RT vollständig aufgetaut. Die Zellen wurden sofort in 37°C warmes Medium in Zellkulturflaschen ausgesät. 24 Std. später wurde das Zellkulturmedium ausgetauscht.

3.1.5 Isolation von Leukozyten

Als Ausgangsmaterial dienten 7 mL EDTA-Blut von gesunden Spendern, die vom Institut für klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg bezogen wurden. Das Blut wurde mit 53 ml PBS/Citrat gemischt. Je 30 ml Blut-PBS/Citrat-Gemisch wurden in einem 50 ml PP-Röhrchen vorsichtig auf 15 ml Lymphozytenseparationsmedium überschichtet und für 30 min. bei 400 x g (RT) zentrifugiert. Die entstandene Interphase (weißer Ring) wurde geerntet, in einem neuen PP-Röhrchen mit PBS/Citrat auf 50 ml aufgefüllt und bei 250 x g für 10 min. bei RT zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Zellkulturmedium für Leukozyten aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

3.1.6 Isolierung von Fibroblasten aus Deziduagewebe

Die Fibroblasten wurden aus Deziduagewebe isoliert und mittels magnetischer Zellseparation (MACS für engl. *Magnetic Cell Separation*, Miltenyi, S et al. 1990) aufgereinigt. Bei der magnetischen Zellseparation werden die gewünschten Zellen mit magnetischen Mikropartikeln (Microbeads) mit einem Durchmesser von 50 nm markiert. Der wichtigste Bestandteil des MACS ist ein starkes Permanentmagnet-System, in dessen Magnetfeld eine Trennsäule eingebracht wird. Diese Trennsäule besitzt eine Matrix aus ferromagnetischen Stahlkügelchen. Das Permanentmagnet-System erzeugt in der direkten Umgebung der Kugeln bzw. in der Säule einen Feldgradienten, der um ein Tausendfaches größer ist, als die von einem

vergleichbaren einfachen Magneten erzeugten magnetischen Kräfte. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung (positive Selektion) oder zum Ausschluss einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode nur zur Anreicherungen von Zellen angewendet.

Das verwendete Deziduagewebe stammte von Frauen, die sich im Rahmen der Fristenlösung einer Abtreibung zwischen der 6. und 11. Schwangerschaftswoche mittels Saugkürettage unterzogen haben. Die Frauen wurden vor Durchführung sonographisch zur Bestätigung einer intakten, intrauterinen Schwangerschaft untersucht und gemäß §19 des Schwangerschaftskonfliktgesetzes beraten. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission genehmigt.

Zunächst wurde die Dezidua (basaler und parietaler Teil) vom übrigen Gewebe isoliert und durch mehrmaliges Waschen mit PBS_{ohne} von Blut und Zotten befreit. Zur weiteren Zellisolation wurde das deziduale Gewebe mit einem Wiegemesser in annähernd 1 mm³ große Stücke zerkleinert, eingewogen, und für 45 min. bei 37°C mit Kollagenase-I-Mix (4 ml pro Gramm isoliertem Gewebe) inkubiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde anschließend mit dem Stempel einer Einmalspritze (20 ml) durch ein grobes Sieb gerieben, danach durch ein steriles Stahlnetz mit einer Porengröße von 50 µm gefiltert und bei 280 x g für 10 min. bei RT zentrifugiert. Das auf diese Weise gewonnene Zellsediment wurde in PBS_{ohne} resuspendiert (1 ml je g Ausgangsgewebe). Zur Separation der mononuklearen Zellen wurde das Zellgemisch mittels eines Dichtegradienten (Lymphozytenseparationsmedium) aufgetrennt (400 x g, 30 min., RT, ohne Bremse, siehe Isolation von Leukozyten 3.1.5). Die so erhaltenen Zellen aus der Interphase wurden erneut in PBS_{ohne} resuspendiert, ein Aliquot zum Auszählen der Zellzahl entnommen und zentrifugiert (280 x g, 10 min., RT). Das hieraus gewonnene Zellsediment wurde für die weitere Zellisolation verwendet.

Anhand der ermittelten Zellzahl wurde die zuzugebende Menge an Anti-Fibroblasten-Antikörper (MicroBeads) und PBS-Beriglobin dosiert. Zu je 10 Millionen Zellen wurden 10 µl Anti-Fibroblasten Antikörper und 90 µl PBS-Beriglobin (Beriglobin in PBS_{ohne} 1:50) pipettiert und für 30 min. bei RT auf einem Rotationsschüttler inkubiert. In dieser Zeit bindet der Antikörper spezifisch an Fibroblasten, Beriglobin blockiert unspezifische Bindungsstellen. Danach wurden die Zellen mit PBS_{ohne} gewaschen und bei 280 x g für 10 min. bei RT zentrifugiert. Das Sediment wurde in

500 µl MACS-Puffer resuspendiert und über einen MACS-Preseparationsfilter auf die, für Positivselektion ausgelegte, vorgewaschene MACS-LS-Säule aufgetragen. Preseparationsfilter und Säule wurden mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen, bis die Zellsuspension komplett in die Säule eingelaufen war. Anschließend wurde die Säule dreimal mit 5 ml MACS-Puffer gewaschen, um unspezifische Zellen zu eluieren. Nach dem Waschen wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und in ein 15 ml PP-Röhrchen platziert. 3 ml MACS-Puffer wurden nun mit Hilfe des Säulenstempels vorsichtig durch die Säule gedrückt, die magnetisch markierten Zellen eluiert, pelletiert und in Anzuchtmedium aufgenommen.

Die Zellen wurden in eine Zellkulturflasche ausgesät und zur Adhäsion der Fibroblasten für 1 – 3 Std. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhärenen Zellen durch mehrmaliges Waschen mit PBS ohne entfernt. Für die folgenden zwei Passagen wurden die Fibroblasten in Anzuchtmedium kultiviert. Danach wurden die Zellen in normalem Zellkulturmedium kultiviert.

3.1.7 Isolierung von HUVEC

Für die Isolierung von humanen venösen Endothelzellen (HUVEC) wurden Nabelschnüre nach Trennung von der Plazenta für maximal 24 Std. in sterilem Waschpuffer für die Isolierung von Endothelzellen aus Nabelschnur bei 4°C bis zur Zellisolierung aufbewahrt. Vor der Isolierung wurden Abschnitte mit Spuren von Nabelschnurklemmen abgetrennt. Zur Entfernung von Blutrückständen wurde die Vene mit einer Knopfkanüle sondiert und mit zweimal 20 ml Waschpuffer gespült. Zur Ablösung der Endothelzellen wurde die Vene zunächst mit 2 ml Kollagenase-Mix gespült. Danach wurde das untere Ende der Nabelschnur mit einer Venenklemme verschlossen und die Vene mit Kollagenase-Mix gefüllt. Das obere Ende der Nabelschnur wurde ebenfalls mit einer Venenklemme verschlossen. Es folgte eine 8 minütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C. Nach der Inkubation wurde die Nabelschnur außen mit 70 %igem Ethanol abgespült. Anschließend wurde das untere Ende oberhalb der Venenklemme mit Hilfe einer Schere abgetrennt und die austretende Flüssigkeit in einem Becherglas aufgefangen. Die obere Klemme wurde ebenfalls geöffnet und die Vene mit Hilfe einer Knopfkanüle mit 50 ml Waschpuffer nachgespült, um möglichst viele Endothelzellen zu gewinnen. Die erhaltenen Endothelzellen wurden in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und bei 280 x g für 10 min. bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment zweimal mit

Waschpuffer gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Die gewaschenen Endothelzellen wurden in Zellkulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät und zur Adhäsion für 3 – 6 Std. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhärenen Zellen durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Für die weitere Kultivierung wurden die Endothelzellen mit Zellkulturmedium versorgt.

3.2 Vitalitätstests

3.2.1 Aussaat der Zellen für Vitalitätstests

Die Aussaat erfolgte im Anschluss an das Passagieren. Die Zellen wurden in 96-Loch-Flachboden-Zellkulturtestplatten ausgesät, wobei das Volumen der ausgesäten Zellsuspension 50 µl je Vertiefung betrug. Für den CellTiter-Glo[®] Lumineszenz Vitalitätstest wurden die Zellen in opake, weiße Zellkulturtestplatten ausgesät. Für die Impedanzmessung wurden die Zellen in sogenannten E-Platten ausgesät.

Die Aussaatdichte für MDA-MB 468, MDA-MB 231, 23132/87, HUVEC und Keratinozyten betrug 2×10^4 Zellen je Vertiefung, für Fibroblasten $1,3 \times 10^4$ Zellen je Vertiefung und für Leukozyten 1×10^5 Zellen je Vertiefung. Die ausgesäten Zellen wurden für 24 Std. im Brutschrank kultiviert.

3.2.2 Aussaat der Zellen für Proliferationsstudien

Für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens mit Hilfe des xCELLigence-Systems wurden die Zellen in spezielle 96-Loch-Flachbodenplatten mit integrierten Elektroden, sogenannte E-Platten 96 ausgesät. Die Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen (5×10^3 , 1×10^4 , $1,5 \times 10^4$, 2×10^4), jeweils in Triplikaten, in einem Volumen von 50 µl ausgesät.

Ansatz der zu testenden Substanzen

Die zu testenden Substanzen wurden als Stammlösungen in DMSO, PBSohne, Wasser oder im entsprechenden Zellkulturmedium angesetzt (siehe Tabelle 14). 2,4-Dinitrophenol wurde in glukosefreier Locke's Lösung angesetzt.

Ansatz der 2,4-Dinitrophenol-Lösung

2,4-DNP ist in Glukose-freier Locke's Lösung löslich (Mattson et al., 1993). 2 g 2,4-DNP wurden in 1 Liter Locke's Lösung gelöst. Über den mittleren Wassergehalt (20 %) von 2,4-DNP errechnete sich eine 2,4-DNP-Konzentration von 9 $\mu\text{mol/ml}$.

Zugabe der Testsubstanzen

Von jeder Substanz wurde eine Stammlösung im passenden Lösungsmittel hergestellt (Tab. 14), die dann mit dem entsprechenden Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration (jeweils zweifach der Endkonzentration im Zellkulturansatz) verdünnt wurde. Nach 24 stündiger Vorkultur der entsprechenden Zellen in 50 μl Kulturmedium in einer 96-Loch-Platte wurden die Inhibitoren aus den verschiedenen Vorverdünnungsstufen in einem Volumen von 50 μl zu den Zellansätzen zugegeben. Das Gesamtvolumen je Vertiefung betrug somit 100 μl . Jede Wirkstoffkonzentration wurde in drei Replikaten getestet. Entsprechende Lösungsmittelkontrollen aller Konzentrationsstufen wurden ebenfalls in drei Replikaten mitgeführt. Nach Inhibitorzugabe wurden die Testplatten für 24 Std. im Brutschrank inkubiert.

Die Stammlösungen der zu testenden Substanzen wurden im jeweiligen Zellkulturmedium verdünnt. In Tabelle 14 sind die verschiedenen Substanzen mit Lösungsmittel, Stammlösung und Verdünnungsreihe dargestellt.

Tab. 14: Stammlösungen und Verdünnungsreihe der getesteten Substanzen.

Substanz	Lösungs- mittel	Konzentration der Stammlösung	Verdünnungsreihe (Endkonzentration in Zellkultur)
2-DG	Medium	1 M	500 – 100 – 20 – 4 mM
3-BrPA	Wasser	500 mM	2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,3125 mM
Iodoacetat	Wasser	5 mM	25 – 12,5 – 6,25 – 3,125 μ M
Natriumfluorid	Wasser	500 mM	10 – 5 – 2,5 – 1,25 mM
Oxamat	Medium	500 mM	100 – 20 – 4 – 0,8 mM
Oxythiamin	Medium	300 mM	100 – 20 – 4 – 0,8 mM
Rotenon	DMSO	1 mM	10 – 0,1 – 0,001 – 0,00001 μ M
Oligomycin	DMSO	5 mM	50 – 25 – 12,5 – 6,25 μ M
2,4-DNP	Locke's	9 mM	200 – 100 – 50 – 25 μ M
Rhodamin 123	DMSO	2,5 mM	25 – 2,5 – 0,25 – 0,025 μ M
NaDCA	PBSohne	1 M	100 – 20 – 4 – 0,8 mM
DON	PBSohne	30 mM	1000 – 200 – 40 – 8 μ M
Metformin	Wasser	300 mM	5 – 1 – 0,2 – 0,04 mM
Perifosin	PBSohne	50 mM	500 – 50 – 5 – 0,5 μ M
Sorafenib	DMSO	100 mM	100 – 10 – 1 – 0,1 μ M

3.2.3 CellTiter-Glo® Lumineszenz Vitalitätstest

Mit diesem Test wird der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen als Maß für die Zahl lebender Zellen bestimmt. Durch Lyse der Zellen wird das Gesamt-ATP freigesetzt und kann in einer Luciferase-katalysierten Reaktion mit Luciferin zu Oxyluciferin umgesetzt werden, wobei ein Lumineszenzsignal gebildet wird. Dieses Signal wird mit einem Luminometer quantifiziert. Abb. 25 zeigt das Reaktionsschema des CellTiter-Glo® Lumineszenz Vitalitätstests.

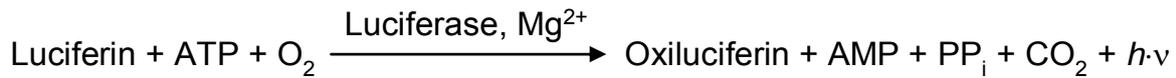


Abb. 25: Reaktionsschema des CellTiter-Glo® Lumineszenz Vitalitätstests.

Das Test-Kit besteht aus einem lyophilisierten Testsubstrat (Luciferin) und einem Puffer, welche direkt vor der Testdurchführung zusammengemischt werden, dazu werden 10 ml Puffer in das Fläschchen mit dem lyophilisierten Substrat gegeben. Hiervon wurden je 100 µl Testreagenz pro Vertiefung in die Zellkulturansätze pipettiert. Anschließend wurden die Platten für 2 min. auf einem Plattenvortexer geschüttelt, um die Zellyse zu induzieren. Zur Stabilisierung des Lumineszenzsignals wurden die Platten danach für 10 min. bei RT inkubiert. Darauf erfolgte die Messung der Platten im Luminometer mit einer Integrationszeit von 1 Sek. Die Integrationszeit ist proportional zur Anzahl der gemessenen relativen Lichteinheiten (*Relative Light Units* = RLU).

3.2.4 Kristallvioletttest

Der Kristallvioletttest ist ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der relativen Zellzahl adhärenter Monolayerkulturen (Gillies 1986). Diese Methode eignet sich sehr gut zur Bestimmung der zytotoxischen Wirkung von Substanzen auf Zellen (Flick, Gifford 1983).

Nach 24 stündiger Inkubationszeit der Inhibitoren wurde der Zellkulturüberstand mit Hilfe einer Mehrkanalpipette vorsichtig abgenommen und in eine separate Mikrotiterplatte überführt. Bis zur Bestimmung des Gehaltes an L-Milchsäure im Überstand wurde diese bei -20 °C eingefroren. Auf die Zellrasen wurden je Vertiefung 100 µl Methanol pipettiert, um die Zellen zu fixieren. Nach kurzer Einwirkzeit (etwa 1 min.) wurde das Methanol wieder abgenommen und die Platte kopfüber auf ein Papiertuch gestellt, so dass restliches Methanol ablaufen konnte. Danach wurden die Zellen mit 100 µL Kristallviolettlösung für 10 min. inkubiert. Kristallviolett färbt vor allem Nucleoproteine an. Die Färbelösung wurde abgenommen und überschüssiges Kristallviolett durch fünfmaliges Waschen mit Aqua bidest entfernt. Zur Entfernung des restlichen Wasser wurde die Platte auf einem Papiertuch ausgeklopft und anschließend getrocknet. Der zellgebundene

Farbstoff wurde mit 200 µl 10 %iger Essigsäure gelöst und photometrisch bei 630 nm gemessen. Abb. 26 zeigt exemplarisch eine Testplatte des Kristallvioletttests mit Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Inhibitoren.

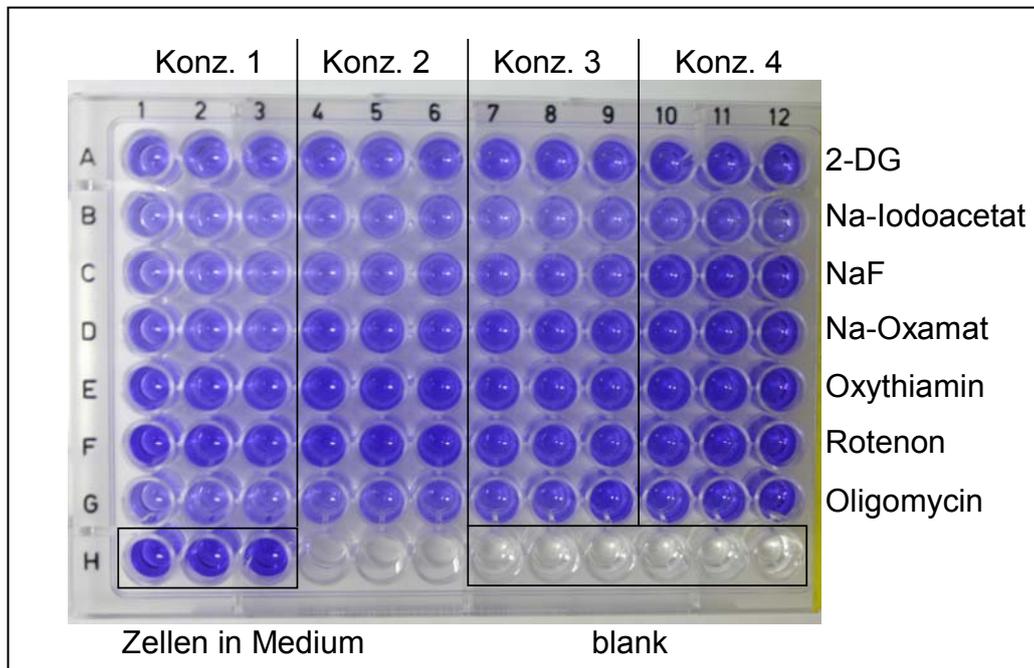


Abb. 26: Mikrotiterplatte nach Kristallvioletttest.

Die Zellen wurden 24 Std. mit den angegebenen Substanzen behandelt. Danach wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen mit Methanol fixiert. Darauf folgte die Färbung mit Kristallviolettlösung. Nach mehrmaligem Waschen mit Aqua dest und Trocknen der Platte wurde der Farbstoff durch Zugabe von 10 %iger Essigsäure in Lösung gebracht. Die Absorption wurde bei 630 nm gemessen. Konz. 1 = höchste Konzentration der jeweiligen Substanz. Konz. 4 = niedrigste Konzentration der jeweiligen Substanz. blank = Essigsäure.

3.2.5 WST-8 Proliferationstest

Dieser Test eignet sich für die Untersuchung von Induktion und Inhibition der Zellproliferation. Er basiert auf der extrazellulären Reduktion des Tetrazoliumsalzes WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, Mononatriumsalz) zu wasserlöslichem Formazan durch NADH (Ishyama 1997). Die Farbreaktion wird durch die auf der Außenseite der Zellmembran lokalisierten NADH-Oxidase vermittelt. Die Menge an gebildetem Formazan wird im Photometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge 650 nm) gemessen und korreliert direkt mit der Zahl lebender, stoffwechselaktiver Zellen. Abb. 27 zeigt das Reaktionsschema der Umsetzung des WST-8-Substrates.

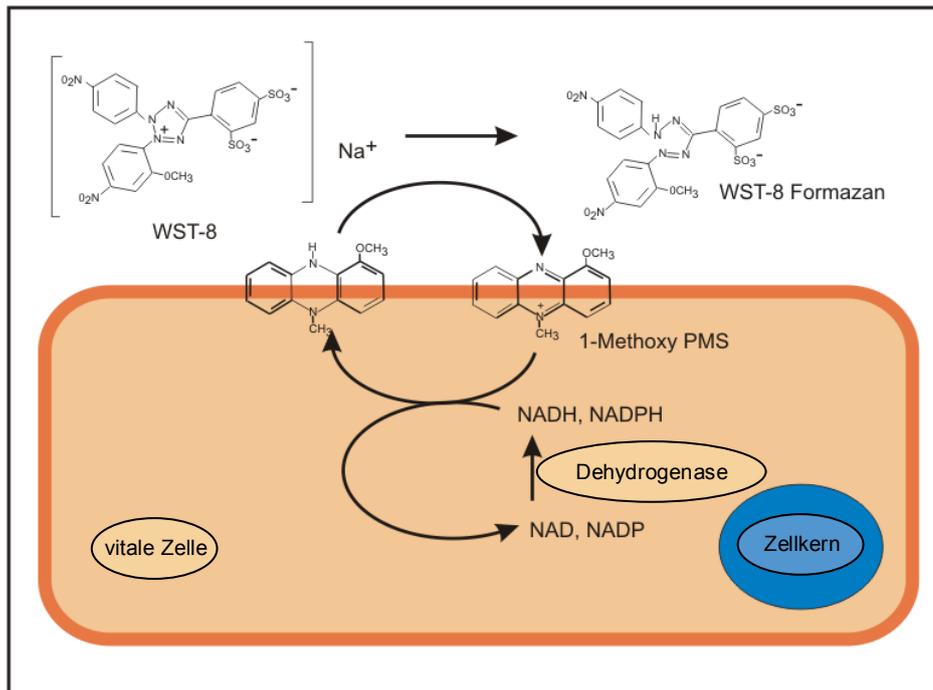


Abb. 27: Reaktionsschema des WST-8-Proliferationstests.
(Verändert nach BioTek Instruments Inc., Vermont, USA).

Das Test-Kit besteht aus einem lyophilisierten Testsubstrat und einer Elektronenkopplerlösung, welche vor der Durchführung zusammengemischt werden. Hiervon wurden je 10 µl WST-8-Reagenz pro Vertiefung in das Zellkulturmedium (100 µl) pipettiert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert bis sich ein deutlicher gelblicher Farbumschlag zeigte. Die Platte wurde in Zeitabständen von 30 min. mehrmals gemessen, um bestmögliche OD-Werte für die Auswertung zu erhalten. Für den Inhibitor 2,4-DNP wurde eine Hintergrundkontrolle (entsprechende 2,4-DNP Lösung in reinem Zellkulturmedium) mitgeführt, da diese Substanz mit dem WST-8-Reagenz interferiert. In Abb. 28 ist eine exemplarische Mikrotiterplatte nach dem WST-8-Test dargestellt.

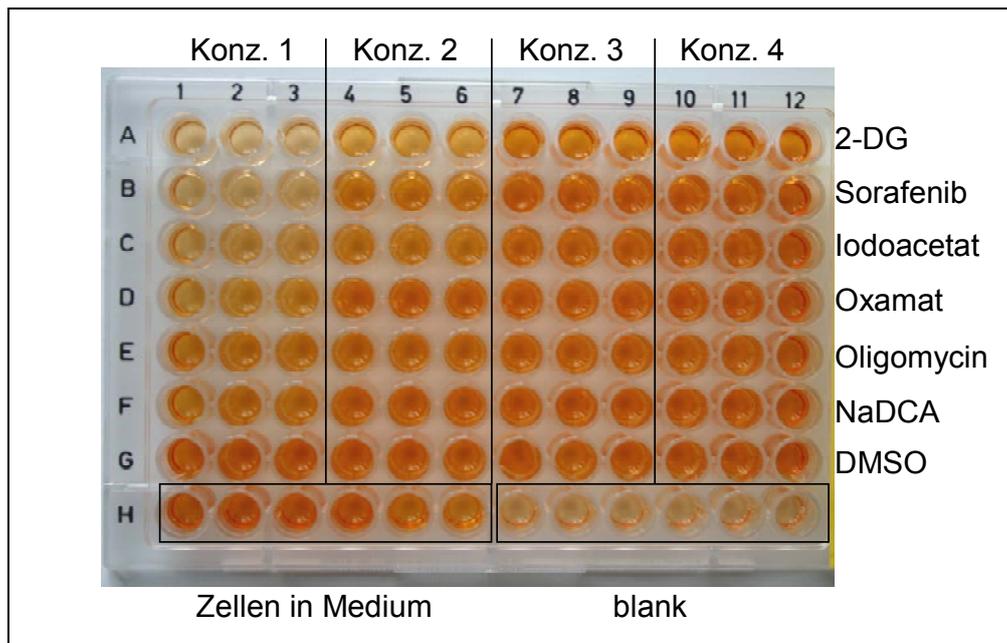


Abb. 28: Mikrotiterplatte nach WST-8 Test.

Die Zellen wurden 24 Std. mit den angegebenen Substanzen behandelt. Danach wurde je Vertiefung 10 μ l WST-8-Reagenz hinzupepitiert und die Platte bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Absorption wurde alle 30 min. bei 450 nm gemessen. Konz. 1 = höchste Konzentration der jeweiligen Substanz. Konz. 4 = niedrigste Konzentration der jeweiligen Substanz. blank = Zellkulturmedium ohne Zellen mit WST-8-Reagenz.

3.2.6 Vitalitätstest basierend auf Resazurin

Dieser Test zur Bestimmung der Zellvitalität beruht auf der Umsetzung des blauen Farbstoffes Resazurin zu pinkfarbenem Resorufin (O'Brien et al. 2000) durch das Enzym Diaphorase unter Oxidation von NADH zu NAD⁺. Abb. 29 zeigt das Reaktionsschema.

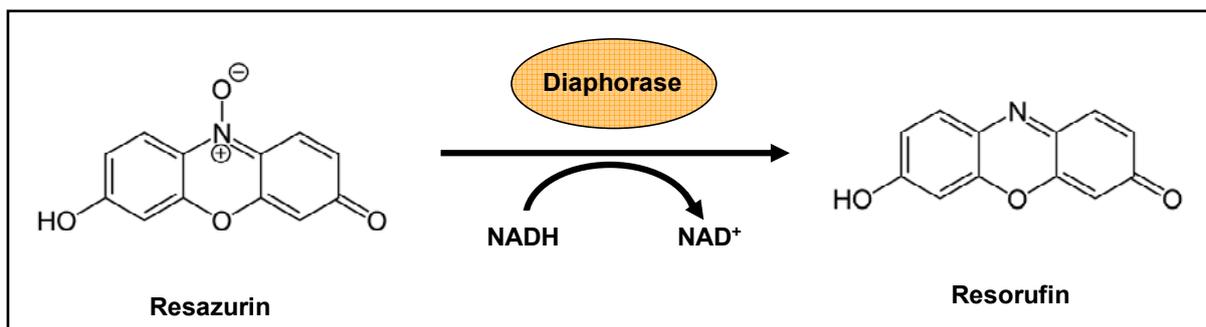


Abb. 29: Reaktionsschema des Resazurintests.

Es wird angenommen, dass Resazurin in den Mitochondrien reduziert wird, wo es den molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor von Oxidoreduktasen wie etwa der Cytochromoxidase, dem letzten Enzym der Atmungskette, ersetzt. Da Resazurin somit Elektronen erst im letzten Schritt der Atmungskette aufnimmt, stört es - im

Gegensatz zu anderen Farbstoffen wie MTX und XTT, welche von Komponenten weiter oben in der Atmungskette reduziert werden - nicht die Zellatmung und wirkt deshalb nicht toxisch auf die Zellen (McMillian et al., 2002). Somit kann Resazurin über einen längeren Zeitraum in der Zellkultur verbleiben und erlaubt Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten. Bei 600 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) wird die Abnahme der Absorption des blauen, nichtmetabolisierten Resazurins detektiert. Die Höhe der gemessenen Absorption korreliert somit direkt invers mit der Anzahl lebender Zellen. Zur Testdurchführung wurden je 10 µl Resazurinreagenz pro Vertiefung pipettiert und die Platte im Brutschrank inkubiert. Sobald ein Farbumschlag in den Kontrollen sichtbar war, wurde die Platte photometrisch vermessen. Abb. 30 zeigt exemplarische eine Testplatte nach dem Resazurintest.

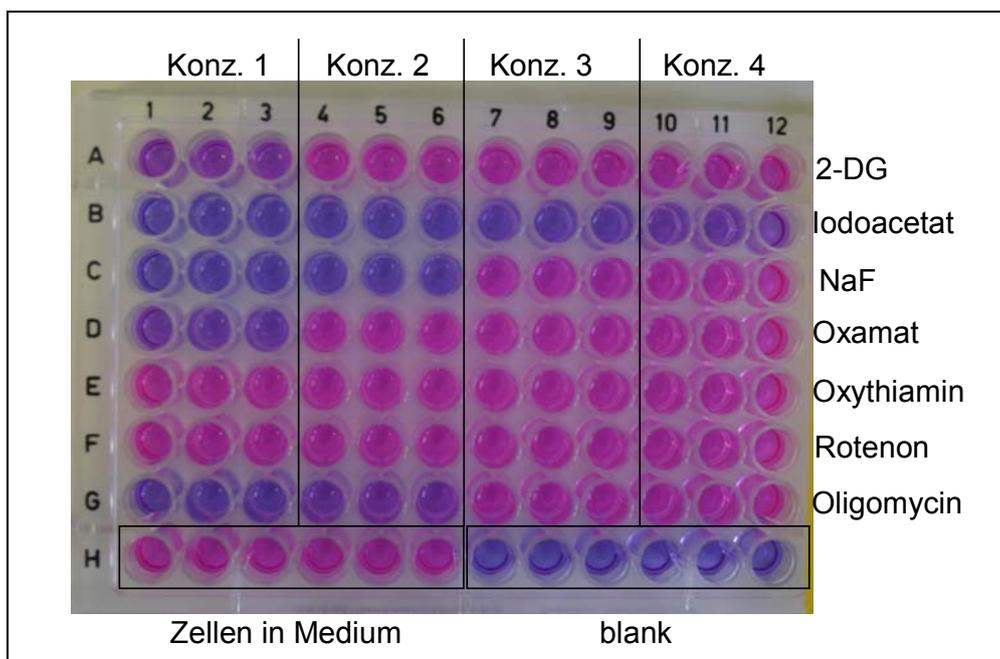


Abb. 30: Mikrotiterplatte nach Resazurintest.

Die Zellen wurden 24 Std. mit den angegebenen Substanzen behandelt. Danach wurde je Vertiefung 10 µl Resazurin hinzupipettiert und die Platte bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Absorption wurde alle 30 min. bei 600 nm gemessen. Konz. 1 = höchste Konzentration der jeweiligen Substanz. Konz. 4 = niedrigste Konzentration der jeweiligen Substanz. blank = Zellkulturmedium ohne Zellen mit Resazurin.

3.2.7 Echt-Zeit-Zellanalyse mit dem xCELLigence-System (RTCA = real-time cell analyzer)

Das xCELLigence-System ermöglicht die kontinuierliche Überwachung des zellulären Phänotyps in Echtzeit. Das Messprinzip beruht auf Wechselwirkung der Zellen mit elektronischen Biosensoren. Am Boden von speziellen 96-Loch-Flachboden-

Mikrotiterplatten, sog. E-Platten sind Mikroelektroden integriert, über welche der Zellwiderstand gemessen wird. Veränderungen der Zell-Elektroden-Impedanz werden kontinuierlich in Echtzeit dokumentiert und liefern somit Informationen von experimentellen Einflüssen auf den Zellstatus, also Zellzahl, Adhäsion, Toxizität und Morphologie. Im Gegensatz zu üblichen Endpunkttests werden Effekte von z. B. zytotoxischen Substanzen vom Anfang bis zum Ende des Experimentes präzise erfasst.

Komponenten des Systems

Das xCELLigence-System besteht aus einer Analyseeinheit, einer Messstation, einer sogenannten „E-Platte“ und der Kontrolleinheit. Die Analyseeinheit misst mit Hilfe der RTCA-Software über die Sensor-Elektroden in den Vertiefungen der E-Platte die elektronische Impedanz (Zellwiderstand). Die Messstation wird in den Brutschrank gestellt und übermittelt permanent die Signale der E-Platte an die Analyseeinheit. Die E-Platte 96 ist den Standard-96-Loch-Mikrotiterplatten ähnlich. Jede der 96-Vertiefungen der E-Platte enthält am Boden integrierte Sensorelektroden und misst die elektronische Impedanz, so dass die Zellen in den Vertiefungen analysiert werden können. Die Kontrolleinheit besteht aus einem Laptop mit der dazugehörigen Analysesoftware, welcher mit der Messeinheit verbunden ist.

Messprinzip

Das Messprinzip beruht auf einer zeitaufgelösten Messung der Impedanz womit zeitaufgelöste Zellformänderungen verfolgt werden können. Die Zellen wachsen auf einer Goldfilm-Elektrode, welche auf dem Boden von sog. E-Platten aufgebracht ist. Bei einer bestimmten Frequenzen wird die Impedanz Z (= Wechselstromwiderstand) als Funktion der Zeit gemessen. Die Plasmamembran der Zellen besitzt isolierende Eigenschaften, daher verhalten sich die Zellen wie dielektrische Partikel. Je mehr und je stärker Zellen auf der Goldelektrode adhären, desto höher ist die Impedanz. Die Impedanz ist außerdem abhängig von der Art der Interaktion zwischen Zellen und Elektroden, sowie der Zellform. Veränderungen der Adhäsionseigenschaften der Zellen oder der Zellform führen dazu, dass sich die Stromwege um und durch die Zellen ändern und damit auch die Impedanz. Eine starke Zelladhäsion oder Ausbreitung der Zellen führt auch zu einem größeren Zellwiderstand. Die relative Änderung der elektronischen Impedanz im Verlauf der Zeit wird als dimensionsloser

„Cell Index“ (CI) dargestellt und repräsentiert den Zellstatus. Sind keine Zellen in der Vertiefung vorhanden oder adhären diese nicht am Plattenboden, ist der Zellindex null. Wenn die Zellen am Boden der Platte anhaften, steigt der Zellindex an. Veränderungen der Adhäsionsstärke, der Morphologie und der Zellvitalität führen ebenfalls zu Änderungen im Zellindex. In Abb. 31 ist das Messprinzip des xCELLigence dargestellt.

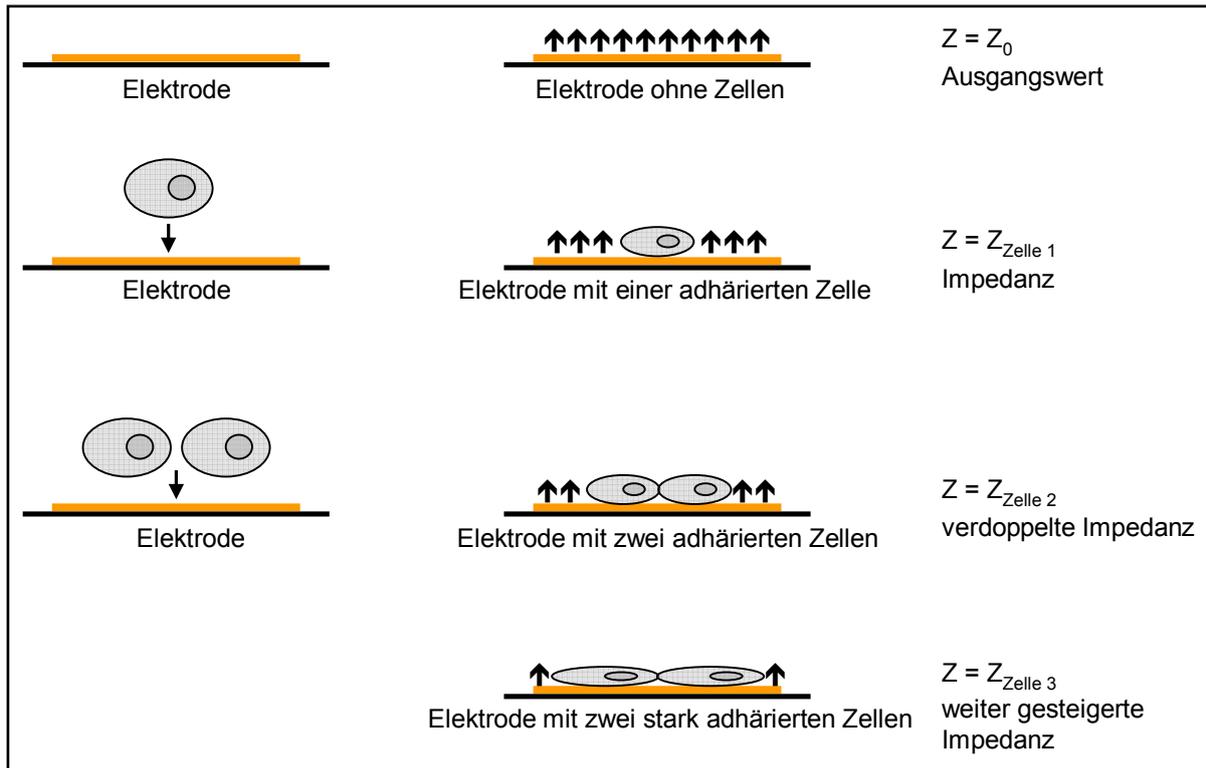


Abb. 31: Messprinzip des xCELLigence-Systems.

Ohne Zellen ist die Impedanz (Z) minimal. Diese wird als Ausgangswert herangezogen und der entsprechende Cell Index als null definiert. Adhären Zellen auf der Goldelektrode so steigt die Impedanz. Je mehr Zellen adhären bzw. je stärker sie sich auf dem Boden der E-Platte ausbreiten, desto höher wird die Impedanz. (Abb. verändert nach Roche, Mannheim).

Vitalitätsbestimmung mit dem xCELLigence-System

Durch Impedanzmessung mit dem xCELLigence-System wurde die Vitalität der Zellen bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass sterbende und tote Zellen ihre Adhärenz verlieren und somit der Zellindex sinkt. Lebende Zellen adhären gut auf dem Boden der E-Platte und führen zu hohen Zellindex-Werten.

Für die Hintergrundmessung wurde in jede Vertiefung der E-Platte 50 µl des entsprechenden Zellkulturmediums pipettiert. Die Platte wurde in der Messstation arretiert und die 1 minütige Hintergrundmessung gestartet. Die Zellen wurden in der für die jeweilige Zelllinie definierten Anzahl in einem Volumen von 50 µl ausgesät. Final betrug das Volumen 100 µl je Vertiefung. Die Zellen verblieben nach der Aussaat zunächst für 30 min. bei RT unter der Sterilwerkbank, da aufgrund der Konvektion direkt nach der Aussaat keine aussagekräftige Widerstandsmessung erfolgen konnte. Nachdem sich die Zellen am Boden der E-Platte abgesetzt hatten, wurde die E-Platte in der Messeinheit arretiert und die Messung des Zellwiderstandes gestartet. Das Messprotokoll war folgendermaßen aufgebaut: In den ersten 4 Std. wurde der Zellindex alle 30 Sek. dokumentiert, um Effekte in der anfänglichen Adhäsionsphase zu erfassen. Danach erfolgte alle 30 min. eine Messung.

Nach 24 Std. wurde die E-Platte aus der Messstation entnommen und die Substanzen wie oben beschrieben auf die Zellen gegeben. In den ersten 4 Std. nach Zugabe der Inhibitoren wurde die Impedanz alle 30 Sek. aufgezeichnet, danach alle 30 min. bis zum Ende des Experimentes.

Für die Auswertung wurden die Zellindex-Werte jeder Zelllinie in Abhängigkeit der Zeit in einem Diagramm dargestellt. Aus den gemessenen Werten wurde ebenfalls die Verdopplungszeit während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen berechnet. Die Standardabweichung der Triplikate jeder Zelllinie wurde mit Hilfe der RTCA-Software des Herstellers berechnet.

3.2.8 Auswertung der Vitalitätstests

Für jeden der Tests wurden die Werte als Quotient der jeweiligen Extinktionen nach Subtraktion des Leerwerts auf die jeweilige Kontrolle normiert und prozentual angegeben. Für den CellTiter-Glo[®] Lumineszenz Vitalitätstest war der Leerwert vernachlässigbar, da dieser kein Lumineszenzsignal ergab. Die gemessenen RLU wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert. Das angenommene Überleben in den

Kontrollen wurde als 100% definiert. Bei der Impedanzmessung wurden die Zellindices am letzten Messzeitpunkt für die Berechnung der Vitalität herangezogen. Der Hintergrundwert wurde von der Auswert-Software schon abgezogen. Die Normierung erfolgte prozentual auf die jeweilige Kontrolle. Das Zellüberleben wurde entsprechend der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Überleben (\%)} = \frac{(\text{OD}_{\text{Probe}} - \text{OD}_{\text{leer}})}{(\text{OD}_{\text{Kontrolle}} - \text{OD}_{\text{leer}})} \times 100$$

Abb. 32: Formel zur Berechnung des Zellüberlebens.

Dosis-Wirkungsfunktion

Die Wirkung der einzelnen Substanzen wurde als Dosis-Wirkungsfunktion dargestellt. Das Zellüberleben wurde auf der Ordinate gegen die getesteten Inhibitorkonzentrationen auf der Abszisse aufgetragen. Im Normalfall zeigen Dosis-Wirkungskurven einen sigmoidalen Verlauf.

Berechnung von Hemmkonzentrationen (*Inhibitory Concentration*)

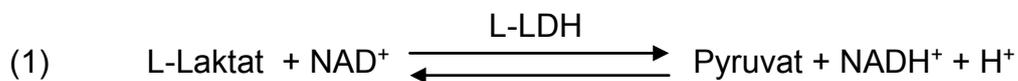
Ein charakteristischer Wert zur Beurteilung der Wirkung eines Inhibitors ist die mittlere inhibitorische Konzentration, die sogenannte IC50. Definitionsgemäß wird bei dieser Konzentration eine halbmaximale Hemmung erreicht. Zur Bestimmung wird eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, bei der die Hemmstoffkonzentration auf der x-Achse logarithmisch gegen die Zellvitalität auf der y-Achse aufgetragen wird. Die Berechnung der IC50 erfolgte unter Anwendung einer nichtlinearen Regressionsanalyse mit dem Programm GraphPad Prism 4. Für die Durchführung einer Regressionsanalyse sind mindestens vier verschiedene Konzentrationsstufen notwendig. Für einige der getesteten Inhibitoren konnte das Programm aufgrund des nicht-sigmoidalen Kurvenverlaufs keine Regression anpassen. Daher wurden für diese Inhibitoren zwei andere Verfahren angewandt um die IC50 zu berechnen. Zum einen wurde die IC50 mit GraphPad Prism 4 durch Interpolation bestimmt, zum anderen wurde mit dem Softwareprogramm Excel eine lineare Regression durchgeführt. In einigen seltenen Fällen konnte die IC50 auch nicht durch Interpolation bestimmt werden, daher wurde dieser Wert anhand der Dosis-Wirkungskurve abgeschätzt. Bei einigen Inhibitoren wurde die IC50 in dem

gewählten Konzentrationsbereich nicht erreicht. Für diese Fälle wurden andere Hemmkonzentrationen (IC10, IC25, IC75) durch Interpolation mit GraphPad Prism 4 und lineare Regression mit Excel bestimmt.

3.3 Weitere Tests

3.3.1 UV-Test zur Quantifizierung von L-Milchsäure in Zellkulturüberständen

L-Milchsäure (L-Laktat) wird durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) in Gegenwart des Enzyms L-Laktat-Dehydrogenase (L-LDH) zu Pyruvat oxidiert (Reaktion 1).



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite von L-Laktat. Es kann jedoch durch Abfangen des Pyruvats mit Hilfe einer nachgeschalteten Reaktion mit dem Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in Gegenwart von L-Glutamat auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben werden (Reaktion 2).



Die während der Reaktion (1) gebildete NADH-Menge ist dem L-Laktat äquivalent. Die Absorbtion von NADH wird bei 340 nm bestimmt.

Die Bestimmung von L-Laktat erfolgte mit dem UV-Test zur Bestimmung von L-Laktat der Firma Boehringer Mannheim/R-Biopharm. Der Test erfolgte in frischen 96-Loch-Zellkulturplatten und wurde mit 1/10 der ursprünglich im Testprotokoll angegebenen Volumina durchgeführt. Die Formel zur Berechnung von L-Laktat wurde ebenfalls adaptiert.

Zur Herstellung des Reaktionspuffers wurden die Lösungen 1 – 3 wie im Protokoll des Herstellers beschrieben im entsprechenden Verhältnis gemischt. Lösung 1 ist ein Glycylglycinpuffer pH 10, Lösung 2 ist in 6 ml Auqua bidest rekonstituiertes NAD-Lyophilisat und Lösung 3 ist eine Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Suspension. Pro Vertiefung wurden 204 µl dieses Gemisches vorgelegt. Dann wurden 10 µl

Zellkulturüberstand hinzugegeben. Als Leerwertkontrolle diente Wasser. Der Gehalt an L-Laktat im Zellkulturmedium wurde ebenfalls bestimmt (= Mediumkontrolle) und später von den berechneten Werten in den Zellkulturüberständen subtrahiert. Es erfolgte die Leer-Messung (E1) vor Zugabe der L-Laktat-Dehydrogenase-Lösung (Lösung 4) bei 340 nm im ELISA-Plattenlesegerät. Zum Start der enzymatischen Reaktion wurden je Vertiefung 2 µl Lösung 4 benötigt. Zur besseren Handhabbarkeit wurde diese vorab mit 8 µl des Reaktionspuffers (s. o.) verdünnt und hiervon je 10 µl in die einzelnen Vertiefungen pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 30 min. bei RT. Danach erfolgte die Messung nach Reaktionsumsatz (E2).

Für die Auswertung wurde zunächst die Extinktionsdifferenz nach Subtraktion des Leerwertes berechnet.

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

Diese wurde dann in die folgende Formel zur Berechnung der Konzentration eingesetzt.

$$c = \frac{V \times MG}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ [mg/ml]}$$

V = Testvolumen: 224 µL

v = Probenvolumen: 10 µl

MG = Molekulargewicht L-Milchsäure: 90,1 g/mol

d = Schichtdicke: 0,64 cm

ε = Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm: 6,3 l x mmol⁻¹ x cm⁻¹

3.3.2 Proliferationsstudien mit dem xCELLigence-System

In dieser Arbeit wurde dieses System eingesetzt, um die Wachstumsrate der verwendeten Zellen zu untersuchen und so den optimalen Behandlungszeitpunkt mit den verschiedenen Inhibitoren zu bestimmen.

Zur Hintergrundmessung wurden in jede Vertiefung der E-Platte 50 µl des entsprechenden Zellkulturmediums zugegeben. Die Platte wurde in der Messeinheit arretiert und die 1 minütige Messung gestartet. Nun wurden die Zellen in verschiedenen Konzentrationen (5 x 10³, 1 x 10⁴, 1,5 x 10⁴, 2 x 10⁴), jeweils in

Triplikaten, in einem Volumen von 50 µl ausgesät. Das finale Volumen je Vertiefung betrug 100 µl. Nach der Aussaat verblieben die Zellen zunächst für 30 min. bei RT unter der Sterilwerkbank, bis sich die Zellen auf den Boden der Platte abgesetzt hatten. Dann wurde die E-Platte in der Messeinheit arretiert und die Messung des Zellwiderstandes aufgezeichnet. Folgendes Messprotokoll wurde verwendet: In den ersten 4 Std. wurde die Impedanz alle 30 Sek. dokumentiert, um Effekte in der anfänglichen Adhäsionsphase zu erfassen. Danach wurde bis zum Ende des Experimentes (48 Std.) die Impedanz alle 30 min. aufgezeichnet.

Für die Auswertung wurden die Zellindex-Werte jeder Zelllinie in Abhängigkeit der Zeit in einem Diagramm dargestellt. Aus den gemessenen Werten wurde ebenfalls die Verdopplungszeit während der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen berechnet. Die Standardabweichung der Triplikate jeder Zelllinie wurde mit Hilfe der RTCA-Software des Herstellers berechnet.

3.3.3 Durchflusszytometrie zur Quantifizierung der Glucoseaufnahme in Zellen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Erfassung von diversen physikalischen Zellparametern wie der Granularität der Zelle, die relative Größe und der relativen Fluoreszenzintensität von Zellen, die mit spezifischen fluoreszierenden Molekülen markiert wurden.

In den letzten Jahren wurde das fluoreszierende Glucosederivat 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) zur Untersuchung der Glucoseaufnahme in verschiedene Zellen, unter anderem in Tumorzellen, etabliert. 2-NBDG wird konzentrations- und zeitabhängig über Glucosetransporter (GLUTs) in die Zelle aufgenommen (O'Neil *et al.* 2005).

Die hier verwendeten Zellen wurden mit dieser Methode auf ihre Zuckeraufnahmekapazität hin untersucht. Dazu wurden 1×10^5 Zellen bzw. 5×10^5 Leukozyten je Vertiefung einer 24-Loch-Zellkulturtestplatte in 500 µl Zellkulturmedium ausgesät und für 24 Std. im Brutschrank kultiviert. Dann wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS ohne gewaschen. Die Leukozyten wurden aus der Platte mitsamt Medium in Reaktionsgefäße überführt und bei $280 \times g$ für 10 min. bei RT zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit 190 µl glucosefreiem Medium für 15 min. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde 2-NBDG in einem Volumen von 10 µl zugegeben, so dass die finale Konzentration in der Vertiefung 0,05 mM betrug. Die Zellen wurden für 60 min. im Brutschrank

inkubiert. Die Kontrollzellen wurden ohne 2-NBDG und nur mit glucosefreiem Medium inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die Platte danach sofort auf Eis gestellt, das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit kaltem PBS ohne gewaschen. Die Leukozyten wurden bei 280 x g für 10 min. bei 4°C zentrifugiert und ebenfalls zweimal mit kaltem PBS ohne gewaschen. Die adhärenen Zellen wurden mit 100 µl Trypsin/EDTA Lösung für 2 – 5 min. im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Zentrifugation bei 280 x g für 10 min. bei RT wurde das Zellsediment in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Leukozyten wurden nach dem Waschen mit PBS ohne direkt in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Für die Messung wurden die Zellen in 5 ml FACS-Röhrchen überführt. Tote Zellen oder degenerierte Zellen und Zelltrümmer stellen bei der durchflusszytometrischen Analyse ein Problem dar, da sie häufig unspezifisch mit den zur Detektion eingesetzten Molekülen interagieren. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurden daher die Zellen vor der Messung mit 10 µl Propidiumjodid (1 µg/ml Endkonzentration) versetzt. Propidiumjodid kann die Zellmembran lebender Zellen nicht passieren und färbt somit nur tote Zellen an. Die Messung der gefärbten Zellen erfolgte in drei Replikaten mit einem FACScan® Durchflusszytometer. Die Einstellung und Kompensation der Fluoreszenzen erfolgte anhand von nur mit Propidiumjodid behandelten Zellen. Diese wurden in Form eines Standardprotokolls gespeichert und für alle folgenden Messungen verwendet. Die Granularität (*sideward scatter*, SSC) und Größe (*forward scatter*, FSC) der Zellen dienten zur Festlegung eines Auswertefensters. Insgesamt wurden je Messung 10000 Zellen aufgenommen.

Die Analyse der Messdaten erfolgte mit dem Programm WinMDI Version 2.8.

3.4 Statistische Verfahren

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung oder Median von mindestens zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Da die zu vergleichenden Proben unabhängig voneinander waren, wurden für die statistische Auswertung parameterfreie Verfahren gewählt. Innerhalb der Tests wurden Unterschiede zwischen den Medianen der verschiedenen Substanzen anhand der Varianzanalyse mit dem Kruskal-Wallis-H-Test (für mehr als zwei Gruppen) und mit dem Mann-

Whitney-U-Test (für zwei Gruppen) durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (zweiseitiger Test) angenommen.

Kruskal-Wallis-H-Test

Hierbei handelt es sich um einen Rangsummentest für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen. Im Rahmen einer Varianzanalyse wird überprüft, ob sich die Gruppen hinsichtlich eines stetigen Merkmals unterscheiden.

Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-U-Test ist ein parameterfreier Homogenitätstest für zwei unverbundene Stichproben. Es wird überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen zwei unabhängigen Stichprobenverteilungen besteht.

3.5 Western Blot

3.5.1 Herstellung von Zelllysaten für SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden 1×10^6 Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit PBS ohne gewaschen. Zur Lyse wurde das Sediment in 100 μ l Ripa-Puffer resuspendiert, für 30 min. auf Eis inkubiert und in regelmäßigen Abständen mit Hilfe eines Vortexgerätes gemischt. Anschließend wurden die Proben für 10 min. bei 14000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Sediment verworfen. Der Proteingehalt des Lysates wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt. Die Proben wurden mit fünffach Laufpuffer versetzt und zur Denaturierung der Proteine für 5 min. bei 95°C inkubiert.

3.5.2 Herstellung von Zytoplasma- und Kernextrakten für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Gewinnung von Kernextrakten aus Zellen nach Kultur unter hypoxischen Bedingungen wurden die „NE-PER[®] Nuclear und Cytoplasmic Extraction Reagenzien“ von Thermo Fischer verwendet. Das Kit enthielt folgende Reagenzien:

Cytoplasma Extraktions-Reagenz I (CER I)

Cytoplasma Extraktions-Reagenz II (CER II)

Nuklear Extraktionsreagenz (NER)

Proteaseinhibitor wurde 1:25 in den Reagenzien CER I und NER eingesetzt.

Die Zellen wurden direkt unter hypoxischen Bedingungen (5 % O₂) geerntet. 2 x 10⁶ Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit eiskaltem PBS *ohne* gewaschen (Zentrifugation bei 500 x g für 3 min. bei 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit 200 µl eiskaltem CER I versetzt, für 15 Sek. stark gevortext und anschließend 10 min. auf Eis inkubiert. Dann wurden 11 µl eiskaltes CER II zugegeben und ebenfalls für 5 Sek. stark gevortext. Nach einer Inkubation von 1 min. auf Eis wurde der Extrakt bei 16000 x g für 5 min. bei 4°C. zentrifugiert. Der Überstand, welcher das zytoplasmatische Extrakt enthielt, wurde sofort in ein frisches vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren. Das verbliebene Sediment enthielt die Kernfraktion. Dieses wurde mit 100 µl eiskaltem NER versetzt und alle 10 min. über einen Zeitraum von 40 min. für 15 Sek. stark gevortext. Danach wurde der Extrakt bei 16000 x g für 10 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Kernextrakt) wurde sofort in ein frisches vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration der hergestellten Lysate wurde photometrisch nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Sie beruht auf der Beobachtung, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 durch Bindung an Proteine vom kationischen in den anionischen Zustand überführt wird, was mit einer Verschiebung

des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm einhergeht. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm, die sich in einem sichtbaren Farbumschlag zeigt, ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Um den Proteingehalt quantifizieren zu können, wurde eine Standardreihe mit BSA in Aqua bidest in folgenden Konzentrationen erstellt:

Proteinstandardreihe: 0 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml.

Das Bradfordreagenz wurde gemäß den Herstellerangaben angesetzt. Die Zellysate wurden je nach erwartetem Proteingehalt entweder unverdünnt oder 1:2 mit Ripa-Puffer verdünnt. Je 10 µl Proteinstandard bzw. Zellysat wurden mit 1ml angesetzten Bradfordreagenz gemischt, 5 min. bei RT inkubiert und anschließend bei 595 nm gegen den Nullwert gemessen. Aus den im Photometer gemessenen Extinktionswerten wurde eine Eichkurve erstellt. Der Proteingehalt der Zellysate wurde durch Vergleich mit der Eichkurve ermittelt.

3.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes. Die meisten Proteine binden SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen. SDS denaturiert die Proteine, besonders nach vorheriger Reduktion mit DTT, und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich dann nur noch in ihrer Größe.

Bei der SDS-Elektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Molekulargewicht auf. Das diskontinuierliche System nach Laemmli besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel, die sich in pH-Wert, Porengröße und Ionenstärke unterscheiden. Proteine mit einem MG von 30 – 120 kd werden mit 10 %igen Trenngelen analysiert. Die Zusammensetzung der Gele zeigt Tab. 15.

Tab. 15: Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngelen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Chemikalien	Sammelgel	Trenngel 10 %	Trenngel 8 %
Acrylamid/Bisacrylamid	700 µl	3,3 ml	2,67 ml
0,5 M Tris-Base pH 6,7	650 µl	-----	-----
3 M Tris-Base pH 8,9	-----	1250 µl	1250 µl
10 % SDS	50 µl	100 µl	100 µl
Aqua bidest	3,6 ml	5,3 ml	6 ml
10 % Ammoniumpersulfat	200 µl	100 µl	100 µl
TEMED	2,5 µl	5 µl	5 µl

Zunächst wurde die Lösung für das Trenngel zwischen zwei Glasplatten (100 x 100 mm) gegossen, die durch 1,5 mm dicke Abstandshalter getrennt und durch Einspannen in eine geeignete Gießvorrichtung seitlich und unten gut abgedichtet waren. Nach Überschichten mit Isopropanol erfolgte die Polymerisation des Gels für mindestens 20 min. bei RT. Anschließend wurde das Sammelgel überschichtet und ein Probenkamm eingesteckt. Nach erneuter 20-minütiger Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt, Elektrophoresepuffer in die Kathodenkammer eingefüllt und der Probenkamm entfernt. Die Taschen des Sammelgels wurden sorgfältig ausgespült. Im vorliegenden System (0,5 cm breite Taschen) konnten 50 µg Protein in 62 µl Füllvolumen je Tasche aufgetragen werden, wobei fehlendes Volumen der Ausgangslösung mit 1-fach Laufpuffer ausgeglichen wurde. Bei 1,5 mm dicken Gelen und 0,5 cm breiten Taschen liegt die obere Grenze der Auftragsmenge bei 1 mg Protein pro Tasche. Als Molekulargewichtsstandard wurden 10 µl Proteinmarker aufgetragen. Die Anodenkammer wurde ebenfalls mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die sich anschließende elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst bis zum Erreichen des Trenngels bei einer Spannung von 80 Volt (für ca. 25 min bei RT), danach bei 120 Volt bis die blaue Farbbande (Bromphenolblau) 2 mm vor Gelende erreicht hatte (ca. 90 min. bei RT).

3.5.5 Blottingverfahren

Bei dieser Methode werden die durch Elektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine synthetische (Nitrocellulose-) Membran übertragen, so dass ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters entsteht. Es gibt zwei verschiedene Elektro-Blotting-Verfahren: das „Nasszellen-Blotting“ und das „Semidry-Blotting“. Mit einer anschließenden Immunfärbung lassen sich die geblotteten Antigene detektieren. Der immunologische Nachweis wird meist indirekt in zwei Stufen durchgeführt. Zuerst bindet ein unmarkierter polyklonaler oder monoklonaler Primärantikörper bekannter Spezifität an das Antigen. Danach folgt die Bindung eines radioaktiv-, Phosphatase- oder Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers an den primären Antigen-Antikörper-Komplex. Die Detektion des Antigen-Antikörperkomplexes erfolgt für Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper kolorimetrisch oder luminometrisch. Bei der in dieser Arbeit eingesetzten luminometrischen Detektion wird in einer chemischen Reaktion eine luminogene Substanz in ein elektronisch angeregtes Photonen emittierendes Produkt umgewandelt (Chemilumineszenz). Das entstehende Licht wird über einen Film gemessen.

In dieser Arbeit wurde das Blotverfahren in einer Halbtrockenzelle („Semidry-Blotting“) mit anschließender chemilumineszenter Detektion durchgeführt.

Blottingpapier und Nitrocellulosemembran wurden auf die entsprechende Gelgröße zugeschnitten und für 5 min. in Transferpuffer äquibriert. Hierbei aktiviert das Methanol aus dem Puffer die Proteinbindungsstellen der Nitrocellulosemembran. Auf die Anodenseite der Transferkammer wurde ein Blottingpapier gelegt und darauf die Nitrocellulosemembran. Das Sammelgel wurde vom Trenngel abgeschnitten und verworfen. Das Trenngel wurde kurz in Transferpuffer geschwenkt und dann luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Auf das Gel wurde wiederum ein Blottingpapier gelegt und mit der Kathode angepresst. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 10 Volt für 60 min. Nach dem Transfer wurde durch reversible Ponceau-Rot-Färbung die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran sichtbar gemacht und dokumentiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen auf der Membran wurde diese anschließend mit 5 %iger Magermilchlösung für 60 min. bei RT auf einen Plattformschüttler inkubiert.

3.5.6 Immunfärbung

Die blockierte Membran wurde mit dem gewünschten Primärantikörper, welcher in 2 %iger Magermilchlösung verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Zur Vermeidung von Verdunstungsverlusten wurde die Inkubationsschale mit Folie abgedichtet. Nicht-gebundener Antikörper wurde am darauf folgenden Tag durch dreimal 10 minütiges Waschen mit PBS-T entfernt. Die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, welcher ebenfalls in 2 %iger Magermilchlösung verdünnt wurde, erfolgte für 60 min. bei RT auf einem Plattformschüttler. Durch dreimal 10 minütiges Waschen mit PBS-T wurde nicht-gebundener Sekundärantikörper entfernt. Zur Signaldetektion wurde die Membran 3 min. unter Lichtausschluss mit frisch angesetzter ECL-Entwicklerlösung inkubiert. Die Membran wurde in einer vorbereiteten Röntgenkassette fixiert. Die Röntgenfilme wurden abhängig von der Signalstärke verschiedenen Belichtungszeiten ausgesetzt. Die Entwicklung und Fixierung der Filme erfolgte durch jeweils 1 minütiges Schwenken nacheinander in den entsprechenden Lösungen (Entwickler – waschen in Aqua dest - Fixierer - waschen in Aqua dest).

3.5.7 „Strippen“ von Westernblotmembranen

Für die Überprüfung der gleichmäßigen Beladung der SDS-Gele wurden die Membranen nach der Erstentwicklung mit β -Actin-Antikörper als Ladekontrolle inkubiert. Zuvor wurden die Antikörper der ersten Detektion durch „Strippen“ entfernt. Dazu wurde die Blotmembran aus der Röntgenkassette entnommen und für 1 min. in PBS-T gewaschen. Danach folgte eine 3 x 10 minütige Inkubation mit „Stripping“-Puffer auf einem Plattformschüttler. Der Stripping-Puffer wurde zwischen den Inkubationsschritten erneuert. Anschließend wurden die Membranen mit 5 %iger Magermilchlösung blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit β -Actin-Antikörper nach den oben beschriebenen Bedingungen.

3.6 RT-PCR

3.6.1 Primer und Primerdesign

Der Erfolg einer PCR hängt entscheidend von den verwendeten Primern ab, die einige Bedingungen erfüllen sollten. Primer haben normalerweise eine Länge von 18 – 30 Basen. Am 3'-Ende sollten ein bis zwei G oder C sitzen, um eine bessere

Bindung und Elongation zu erhalten. Der G/C-Gehalt ihrer Sequenzen sollte zwischen 40 und 60 % liegen. Die Sequenz sollte möglichst spezifisch sein, so dass die Primer nur an der richtigen Stelle hybridisieren.

Die Primer sollten keine internen Sekundärstrukturen wie Haarnadeln bilden, weil diese die Wahrscheinlichkeit des Hybridisierens mit der Ausgangs-DNA reduzieren. Die Primer dürfen nicht miteinander hybridisieren und sollten eine möglichst geringe Komplementarität an ihren 3'-Enden besitzen, um Primerdimere zu verhindern. Es sollte darauf geachtet werden, dass die Schmelztemperaturen der beiden eingesetzten Primer etwa gleich hoch sind. Die Berechnung der Schmelztemperatur für Primer mit bis zu 20 Basen kann näherungsweise aus dem GC-Gehalt des Primers mit folgender Formel berechnet werden:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \times (\text{Anzahl G} + \text{C}) + 2 \times \text{Anzahl (A} + \text{T)}$$

Für die Berechnung der Anlagerungstemperatur (T_a) gilt folgende Formel:

$$T_a [^{\circ}\text{C}] = (T_m \text{ linker Primer} + T_m \text{ rechter Primer}) / 2 - 3$$

Die Primer (Tab. 7) wurden mit dem im Internet frei verfügbaren Programm Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) des „National Center for Biotechnology Information (NCBI)“ konstruiert.

3.6.2 Extraktion von mRNA

Die Extraktion von RNA und Protein aus Zellen wurde mit dem Kit „NucleoSpin[®] RNA/Protein“ von Machery-Nagel durchgeführt. Zunächst wurden der Zellyse-Premix und der rDNase-Premix (rekombinante DNase) vorbereitet. Der Zellyse-Premix bestand aus 350 μl RP1-Puffer welcher mit 3,5 μl β -Mercaptoethanol, zur Inhibition von RNasen versetzt wurde. Der rDNase-Premix bestand aus 10 μl gelöster rDNase + 90 μl rDNase-Reaktionspuffer.

1 x 10⁶ Zellen wurden zunächst einmal mit PBS ohne gewaschen und bei 300 x g für 5 min. bei RT zentrifugiert. Das Sediment wurde in 353,5 μl Lysepuffer resuspendiert. Zur Homogenisierung wurde das resuspendierte Sediment auf eine Filtersäule aufgetragen und bei 11000 x g für 1 min. bei RT zentrifugiert. Das Lysat wurde nun mit 350 μl 70 %igem Ethanol versetzt, resuspendiert und auf eine RNA-bindende

Säule aufgetragen. Es folgte eine Zentrifugation bei 11000 x g für 1 min. bei RT. RNA und DNA befanden sich danach in der Säule. Der Durchfluss enthielt die Proteine. 350 µl des Durchflusses wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur späteren Proteinaufreinigung auf Eis aufbewahrt. Der restliche Durchfluss wurde in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Die Säule wurde mit 350 µl MDB-Puffer gewaschen. Die im Filter vorhandene DNA wurde durch einen DNase-Verdau beseitigt, da diese in der späteren PCR zu falschen Ergebnissen führen kann. Dazu wurden 95 µl rDNase-Premix auf die Säule pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit 200 µl RA2 Puffer, gefolgt von einem zweiten mit 600 µl RA3-Puffer und einem dritten mit 250 µl RA3-Puffer. Die Elution der RNA erfolgte mit 60 µl Wasser, welches im Kit enthalten war. Die RNA wurde bei -20°C gelagert.

3.6.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Ausbeute der isolierten RNA wurde mittels UV-Spektralphotometrie bestimmt. Die Messung der optischen Dichte (OD) ermöglicht zudem eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure. Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Für Proteine liegt das Maximum bei 280 nm. Ein Absorptionwert von 1,0 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist ein Maß für die Kontamination der Nukleinsäure mit Proteinen. Bei einer reinen Nukleinsäurelösung beträgt das Verhältnis 1,7 – 2,0. Ein kleinerer Wert deutet auf Verunreinigungen hin. Für die Konzentrationsbestimmung wurde die RNA 1:50 in Aqua dest verdünnt. Die Messung erfolgte gegen Aqua dest als Leerwert.

3.6.4 c-DNA Synthese mittels RT-PCR

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion) wird meist in zwei getrennten Arbeitsschritten durchgeführt. Im ersten Abschnitt wird mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reversen Transkriptase), welche aus Retroviren isoliert wird, zur mRNA ein komplementärer DNA-Strang gebildet. Im zweiten Abschnitt wird das gewünschte Fragment mittels PCR vervielfältigt. (Sambroock et al. 1989). Da eukaryontische mRNA ausschließlich aus Exons besteht, unterscheidet sich die so hergestellte DNA von genomischer DNA, die zusätzlich nicht-kodierende intronische DNA-Abschnitte enthält. Die durch die reverse Transkription synthetisierte DNA wird auch als cDNA bezeichnet, wobei das

„c“ für „*complementary*“ steht. Diese Methode kann zum Nachweis eines Gens, das zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle aktiviert ist, verwendet werden. Dabei wird die Anwesenheit einer bestimmten mRNA – das unmittelbare Produkt eines angeschalteten Gens – mit Hilfe von spezifischen Primern nachgewiesen.

Für die cDNA-Synthese wurde das RevertAid™ H-Minus Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas verwendet. Für die cDNA-Synthese wurden 100 ng RNA mit 1 µl Oligonukleotidprimer versetzt und mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung der RNA wurde der Reaktionsansatz für 5 min. bei 70°C inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Nun wurden 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl Riboblock™ Ribonuklease Inhibitor und 2 µl dNTP Mix hinzupipettiert, gemischt und kurz abzentrifugiert. Es folgte eine Inkubation für 5 min. bei 37°C. Danach wurde 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben. Das finale Volumen betrug 20 µl. Die cDNA-Synthese erfolgte für 60 min. bei 42°C. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70°C für 10 min. abgestoppt. Die erhaltene cDNA wurde auf Eis abgekühlt und für die darauf folgende PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

In der Polymerase-Kettenreaktion wird *in vitro* ein DNA-Abschnitt vervielfältigt. Die Amplifikation basiert auf einer sich zyklisch wiederholenden Einzelstrang-DNA-Synthese durch thermostabile DNA-Polymerasen. Die klassische Polymerase für die PCR ist die Taq-DNA-Polymerase, die aus thermophilen Archaeobakterien (*Thermus aquaticus*) isoliert wurde. Die Taq-Polymerase fügt am 3'-Ende des neu synthetisierten Stranges Adenosin-Überhänge an. Sie arbeitet mit einer Syntheseleistung von ca. 2800 Nukleotiden pro Minute und besitzt keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Fehlerkorrektur). Die Grenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes werden durch kurze, künstlich hergestellte DNA-Stücke, sogenannte Primer festgelegt. Primer sind Oligonukleotide, deren Sequenzen so gewählt sind, dass sie komplementär zu jeweils einem der Bereiche sind, die das zu vermehrende Fragment flankieren. Die so entstandenen kurzen, doppelsträngigen DNA-Bereiche dienen der Polymerase als Startpunkte, von denen ausgehend sie in 5'-3'-Richtung komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Die Polymerase benötigt neben den Primern auch noch Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), die Grundbausteine eines DNA-Moleküls. Ein PCR-Zyklus gliedert sich in drei charakteristische Schritte:

- (1) Denaturierung (= „Aufschmelzen“) des DNA-Doppelstrangs bei 95°C.
- (2) Annealing (= „Anlagerung“) der im Überschuss vorliegenden Oligonukleotid-Primer bei 50 – 60°C; die Primer bilden das 5'-Ende der neu zu synthetisierenden Komplementärstränge.
- (3) Elongation (= „Verlängerung“) des komplementären Tochterstrangs durch die DNA-Polymerase bei 72°C.

Nach wiederholtem Denaturierungsschritt (1) bilden nun die beiden neu gebildeten DNA-Abschnitte ihrerseits eine Matrize aus. Durch die Verdopplung der DNA nach jedem Zyklusdurchlauf kommt es theoretisch zu einer exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Fragmentes. Im Normalfall wird ein PCR-Zyklus 25-35 mal wiederholt. Die PCR wurde nach Mullis et al. 1986, Mullis und Faloona 1987 und Saiki et al. 1988 durchgeführt.

Die PCR-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

GoTaq [®] Colorless Mastermix, 2x	12,5 µl
linker Primer	0,25 µM
rechter Primer	0,25 µM
Matritzen-DNA	100 – 200 ng
Aqua dest	ad 25 µl

Der GoTaq[®] Colorless Mastermix enthält 400 µM je dNTP und 3 mM MgCl₂ in GoTaq[®] Reaktionspuffer (pH 8,5). Für jeden PCR-Ansatz wurden die einzelnen Komponenten in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und die DNA als letztes zugegeben. Der Ansatz wurde durchmischt und kurz abzentrifugiert.

Folgendes Amplifizierungs-Programm wurde verwendet:

Initiale Denaturierung	94°C	5 min	} spezifische Annealing- temperatur je nach Primer
Denaturierung	94°C	30 sek	
Annealing	X °C	30 sek	
Elongation	72°C	1 min	
finale Elongation	72°C	10 min	

Für die einzelnen Primerpaare wurden die jeweiligen Reaktionsbedingungen optimiert. Es wurden 30 Reaktionszyklen durchgeführt.

3.6.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren weisen aufgrund ihres Ribosephosphat-Gerüsts eine negative Nettoladung auf. Im elektrischen Feld wandern DNA-Moleküle daher zur positiv geladenen Anode. Im Allgemeinen findet die Auftrennung in einer Trägermatrix statt. Als Trägermaterial wird Agarose verwendet. Im Gel werden die Nukleinsäuren bei ihrer Wanderung der Größe nach aufgetrennt. Durch die maschenartige Vernetzung der Agarose-Moleküle können kleinere DNA-Fragmente schneller wandern als größere. Die Trennschärfe hängt von der Agarosekonzentration des Gels ab. Diese sollte dem Größenbereich der aufzutrennenden DNA-Moleküle angepasst werden. Fragmente zwischen 0,5 und 7 kb werden mit 1 %igen Agarosegelen analysiert.

Für die Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wurde 1,5 g Agarose in 150 ml TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden 10 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) hinzupipettiert. Ethidiumbromid lagert sich an die DNA an und dient der anschließenden Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente im UV-Licht. Die Agaroselösung wurde gut durchmischt und luftblasenfrei in die zum Gießen vorbereitete Gelkammer mit eingestecktem Kamm gegossen. Die vollständige Polymerisation des Gels dauerte etwa 30 min.. Danach wurde das Gel in der für die Elektrophorese korrekten Orientierung in der Gelkammer plaziert und mit TBE-Puffer etwa 1 cm überschichtet. 10 µl der zu analysierenden Proben wurden mit 2 µl 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten Fragmente wurden 2,5 µl eines definierten Größenmarkers mit aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V für 45 min. durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte in einem UV-Transilluminator und wurde mit einer Digitalkamera dokumentiert.

3.6.7 Bestimmung der Expressionsstärke

Für die Bestimmung der Expressionsstärke auf Proteinebene wurden die Röntgenfilme eingescannt und die Stärke der Banden mit dem Programm image j quantifiziert. Ebenso wurde die Expressionsstärke der mittels PCR untersuchten Gene quantifiziert.

3.7 Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie basiert auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an ein Epitop und ermöglicht die Lokalisation von Proteinen in Zellen oder Geweben. Die antigenen Epitope in den zu untersuchenden Geweben oder Zellen müssen zuvor durch Fixierung, z. B. mit Formalin konserviert werden. Das Gewebe bzw. die Zellen werden in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom in 2 - 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Danach schließt sich die Inkubation mit einem Primärantikörper gegen das darzustellende Antigen an. Für die Detektion wurde das EnVision+ System-HRP verwendet (Abb. 33). Dies ist ein zweistufiges Verfahren bei dem zunächst der Primärantikörper an das Antigen bindet. Der Sekundärantikörper, an den ein HRP-markiertes Polymer gekoppelt ist, bindet an den Primärantikörper. Durch Zugabe eines Substrates wird in einer Enzym-Substratreaktion aus dem farblosen chromogenen Substrat ein farbiges Präzipitat gebildet und so die Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht. Als Enzyme werden Alkalische Phosphatase (AP) oder Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. für *horse radish peroxidase*) verwendet. Mit einer Hämalaunlösung wird eine sog. Gegenfärbung durchgeführt wodurch die Zellkerne dargestellt werden.

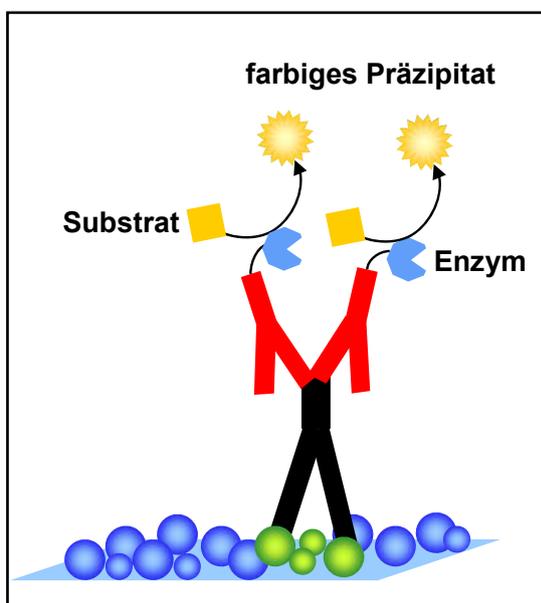


Abb. 33: Detektionssystem für Immunhistochemie.

Der Primärantikörper bindet spezifisch an das antigene Epitop, welches detektiert werden soll. Darauf folgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, an den ein HRP-markiertes Polymer gekoppelt ist. Im nächsten Schritt wird ein Substrat hinzugegeben, welches in einer Enzym-Substrat-Reaktion zu einem farbigen Reaktionsprodukt umgesetzt wird.

Für die Darstellung der zu untersuchenden Proteine in Zellen wurde das Zytoblock-Verfahren eingesetzt. Dazu werden die Zellen sedimentiert und in flüssiger Agarose aufgeschwemmt, die beim Abkühlen erstarrt. Danach erfolgt die Einbettung in Paraffin und die übliche Weiterverarbeitung.

3.7.1 Probenvorbereitung

Die Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit PBSohne gewaschen und bei 280 x g für 10 min. bei RT zentrifugiert. Für die Fixierung wurde das Zellsediment in 4 ml 2 %igem Formalin/PBSohne aufgenommen und 1 Std. auf einem Schüttelinkubator bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBSohne und Zentrifugation bei 750 x g für 5 min. bei RT wurde das Sediment in 75 µl PBSohne resuspendiert und mit 75 µl 2 %iger Agaroselösung versetzt. Das Gemisch wurde in den Deckel eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes pipettiert. Nach vollständigem Aushärten wurde der Agarosepfropf aus dem Deckel des Reaktionsgefäßes gelöst und der Routineeinbettung am Institut für Pathologie der Universität Würzburg zugeführt.

3.7.2 Paraffinschnitte

Nach vollständigem Aushärten der Proben wurden mit einem Schlittenmikrotom 2 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hilfe einer Pinzette in ein kaltes Wasserbad überführt und Luftblasen und Falten entfernt. Zum Strecken wurden die Schnitte in ein 50°C warmes Wasserbad überführt und dann auf einen Objektträger aufgebracht. Die Paraffinschnitte wurden über Nacht bei RT getrocknet.

3.7.3 Immunhistochemische Färbung

Die Schnitte wurden durch zweimaliges Inkubieren für 10 min. in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurden die Proben in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 2 min. 100 % Ethanol, 1 x 96 % Ethanol, 1 x 80 % Ethanol, 1 x 70 % Ethanol, 1x Ethanol 50 %) bis zu Aqua bidest rehydriert. Die Verweildauer in den entsprechenden Alkohollösungen war so lange, bis die Lösung ohne Schlieren vom Schnitt lief.

Für die Antigen-Demaskierung wurden die Schnitte in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 zweimal 5 min. bei 750 Watt in einem Mikrowellengerät gekocht. Nach 20 minütigem Abkühlen wurden die Schnitte mit Aqua bidest gespült. Für die Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate für 10 min. bei RT mit 3 %iger Peroxidase-Blockierungslösung inkubiert und anschließend mit PBSohne gespült. Unspezifische Antikörperbindung wurde durch Inkubation mit 50 µl Antibody Diluent für 15 min. bei RT unterbunden. Der Primärantikörper (50 µl pro Schnitt) wurde über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Folgende Verdünnungen in

Antibody-Diluent wurden eingesetzt: GLUT-1 1:100, p-Akt 1:100, M2-PK 1:250, HIF-1 α 1:500 und MCT-1 1:1000. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit PBS ohne gespült. Die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (50 μ l pro Schnitt) erfolgte für 15 - 30 min. bei RT. Danach wurde wiederum mit PBS ohne gespült. Dann wurde die DAB-Substratlösung auf die Präparate aufgetragen, bis zur gewünschten Intensität inkubiert und durch Aqua bidest abgebrochen.

Zur Kerndarstellung wurden die Zellen für 1 - 2 min. mit Hämalaun gegengefärbt und durch mehrmaliges Waschen in Leitungswasser gebläut. Anschließend wurde mit Aqua bidest gespült. Nachdem die Präparate getrocknet waren wurden sie mit Vitro-Clud eingedeckt.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche zur Bestimmung der Vorinkubationszeit und Aussaatdichte

Für die Untersuchung auf Zytotoxizität von Substanzen wird im Allgemeinen eine bestimmte Zellzahl in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät, die Zellen für eine definierte Zeit vorinkubiert und dann die zu testende Substanz zugegeben. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird die Wirkung der potenziell zytotoxischen Substanzen mit verschiedenen Vitalitätstests, z. B. Kristallvioletttest oder WST-8-Test ausgewertet.

Für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der verschiedenen verwendeten Zellarten wurde das xCELLigence-System eingesetzt. Hiermit konnte das Proliferationsverhalten der Zellen kontinuierlich beobachtet und der optimale Zeitpunkt für die Behandlung der Zellen mit den Substanzen, sowie die geeignete Zellmenge für die Aussaat bestimmt werden. Die Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen je Vertiefung der E-Platte ausgesät und die Zellproliferation über einen Zeitraum von 48 Std. verfolgt. Für die Berechnung der Verdopplungszeit wurde der Zeitraum zwischen 8 und 20 Std. gewählt, weil aus langen Vorerfahrungen mit den verwendeten Zelllinien im Labor davon ausgegangen werden konnte, dass die Zellen 8 Std. nach Aussaat komplett adhäriert waren und somit eine aussagekräftige Messung möglich war. Die Auswertung der Wachstumskurven zeigte für den Zeitraum 8 bis 12 Std. eine logarithmische Wachstumsphase aller Zellen und war daher für die Berechnung der Verdopplungszeit geeignet. Abb. 34 zeigt exemplarische Wachstumskurven für den Zeitraum zwischen 8 und 12 Std. der einzelnen Zellen eines repräsentativen Experimentes.

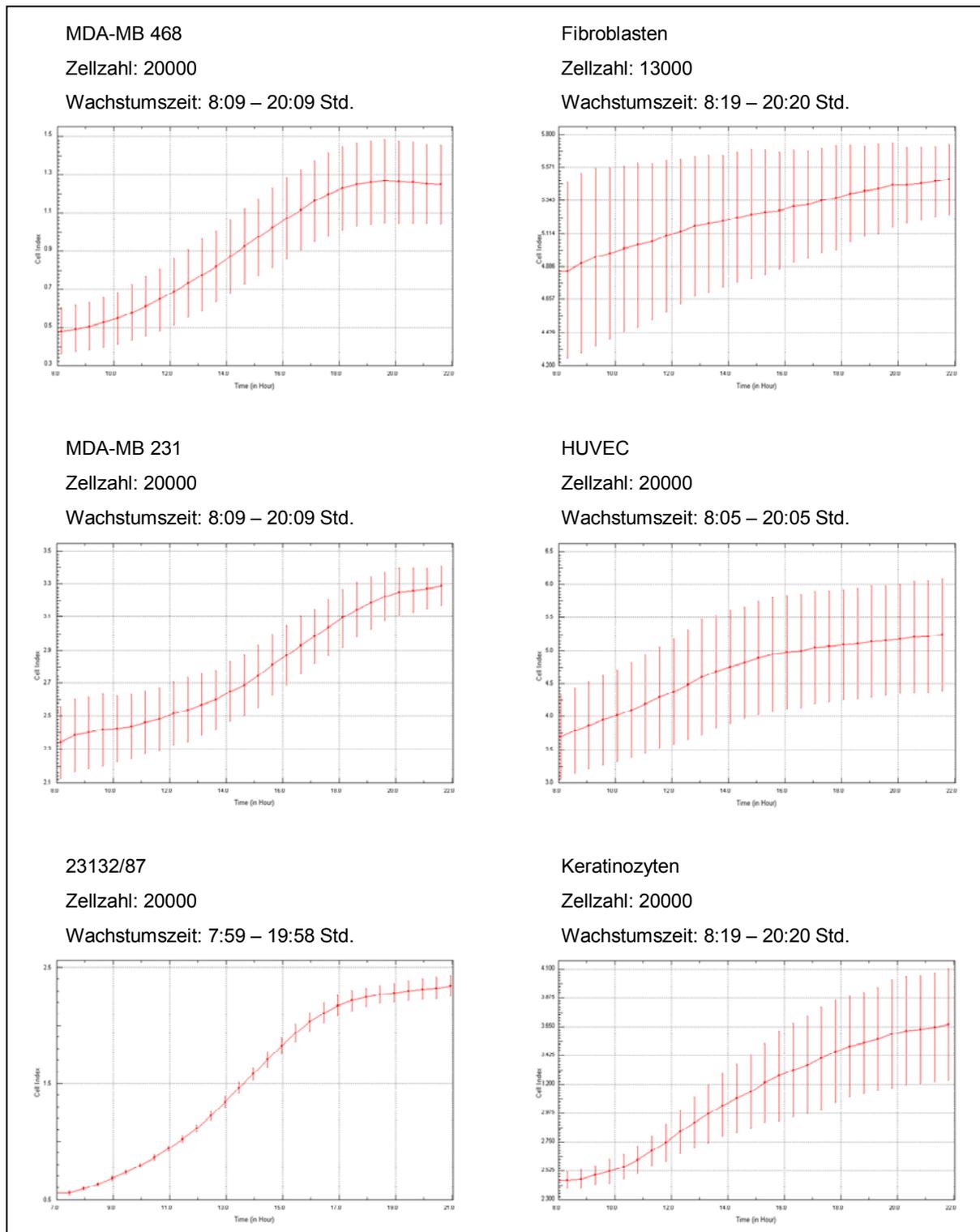


Abb. 34: Wachstumsverhalten adhären wachsender Zellen.

Das Wachstumsverhalten der Zellen wurde mit dem xCELLigence-System analysiert. Gezeigt sind die Wachstumskurven für den Zeitraum von 8 - 20 Std. eines repräsentativen Experiments. Der Cell Index spiegelt die Adhärenzfläche der Zellen wider. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Duplikate bzw. Triplikate.

Abb. 35 zeigt die Verdopplungszeit der verschiedenen Zellen berechnet aus den Wachstumskurven von Abb. 34.

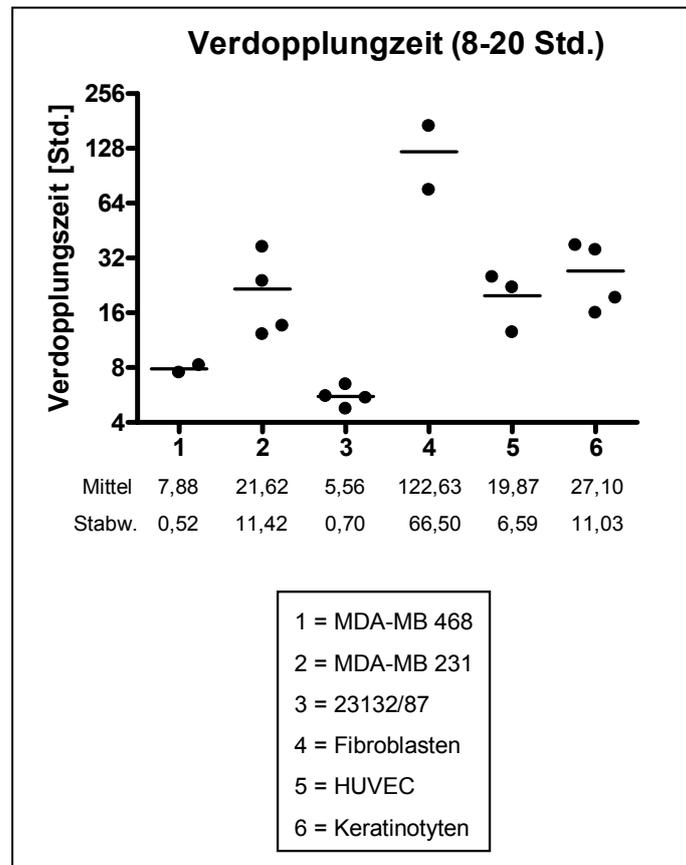


Abb. 35: Berechnung der Verdopplungszeit adhärent wachsender Zellen mit dem xCELLigence-System.

Die Verdopplungszeiten der Zellen für den Zeitraum 8 - 20 Std. wurden mit der RTCA-Software aufgrund der Wachstumskurven aus Abb. 34 berechnet. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung in Std. der Duplikate bzw. Triplikate.

Der ideale Zeitpunkt für die Behandlung der Zellen mit den Substanzen wurde aus diesen Daten auf 24 Std. nach Aussaat definiert. Die optimale Zelldichte betrug für Fibroblasten $1,3 \times 10^3$, für alle übrigen Zellen 2×10^4 Zellen je Vertiefung.

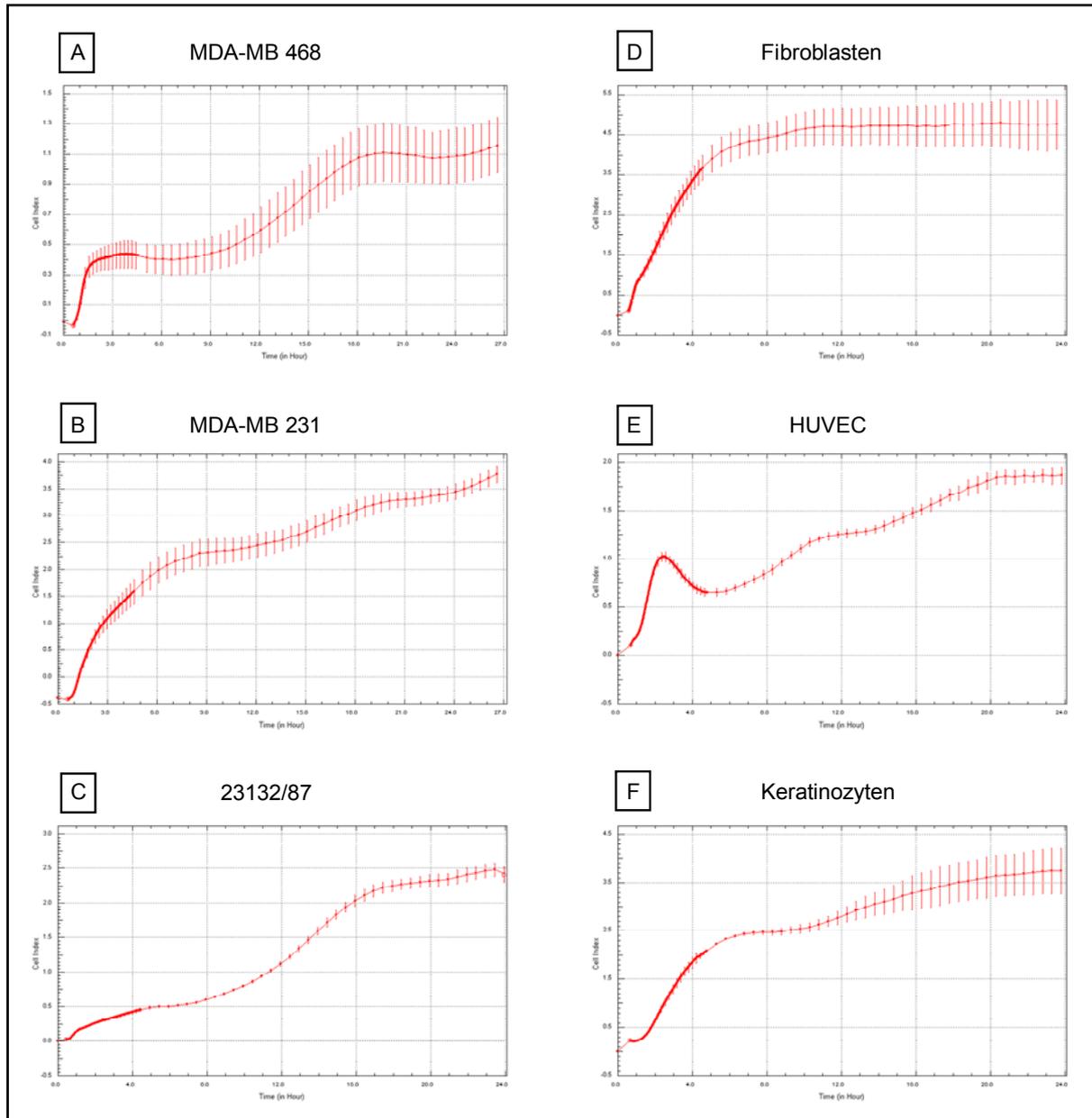


Abb. 36: 24-Std.-Wachstumskurven adhärent wachsender Zellen.

Gezeigt sind die Wachstumskurven der Zellen für den Zeitraum von 0 - 24 Std. eines repräsentativen Experimentes. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Duplikate bzw. Triplikate.

Die benignen Zellen Fibroblasten Abb. 36 D, HUVEC Abb. 36 E und Keratinozyten Abb. 36 F befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Übergang in eine stationäre Wachstumsphase, wie es für diese Zellen unter physiologischen Bedingungen im menschlichen Körper typisch ist. Auffallend war der Kurvenverlauf der HUVEC (Abb. 36 E) mit einem starken Anstieg der Impedanz innerhalb der ersten zwei Stunden, gefolgt von einem Absinken bis etwa vier Stunden und schließlich einem erneuten Anstieg. Unter dem Mikroskop konnte in den ersten zwei Stunden nach Aussaat eine schnelle Adhärenz und großflächige Ausbreitung der Zellen beobachtet werden. Danach kontrahierten die Zellen auf „Normalgröße“ und fingen an zu proliferieren.

Die Tumorzellen zeigten über 48 Std. hinweg eine kontinuierliche Proliferation ohne Größenunterschiede. (Abb. 36 A - C).

4.2 Definition und Überprüfung möglicher Probleme mit den ausgewählten Vitalitätstests

Zur Beurteilung der Zellvitalität bzw. der Toxizität der verschiedenen Testsubstanzen wurden verschiedene sog. Vitalitätstests bzw. Zytotoxizitätstests eingesetzt. Diese waren im Einzelnen: CellTiter-Glo[®] Lumineszenz Vitalitätstest, WST-8 Proliferationstest, Kristallvioletttest, Resazurintest und Adhärenzmessung mit dem xCELLigence-System. Jeder dieser Tests hatte verschiedene Vorteile aber auch Nachteile. Vor allem musste beachtet werden, dass die eingesetzten Testsubstanzen möglicherweise mit den Nachweisreagenzien direkt interagieren können.

4.2.1 Problem der Hintergrundmessung bei farbigen Substanzen im WST-8-Test

Zwei der hier verwendeten Substanzen, Rhodamin 123 und 2,4-Dinitrophenol sind orangefarbene Substanzen. Daher musste davon ausgegangen werden, dass diese mit dem ebenfalls orangefarbenen Reaktionsprodukt Formazan interferieren und das Messergebnis verfälschen können. In einem Vorversuch wurde für diese beiden Substanzen Hintergrundmessungen (entsprechende Rhodamin- bzw. 2,4-DNP-Lösung in reinem Zellkulturmedium) durchgeführt. Es zeigte sich, dass Rhodamin 123 (Abb. 37 A) in der höchsten Konzentrationsstufe ein deutlich schwächeres Hintergrundsignal lieferte als 2,4-DNP (Abb. 37 B) unabhängig vom Zellkulturmedium. Für Rhodamin 123 ist das Hintergrundsignal ab einer Konzentration $< 2,5 \mu\text{M}$ vernachlässigbar und für 2,4-DNP ab einer Konzentration $< 25 \mu\text{M}$. Bei der Anwendung des WST-8-Testes ist daher die Interferenz von farbigen Substanzen mit dem WST-8-Reagenz zu beachten und entsprechende Hintergrundkontrollen mitzuführen, die dann von den Messwerten subtrahiert werden müssen.

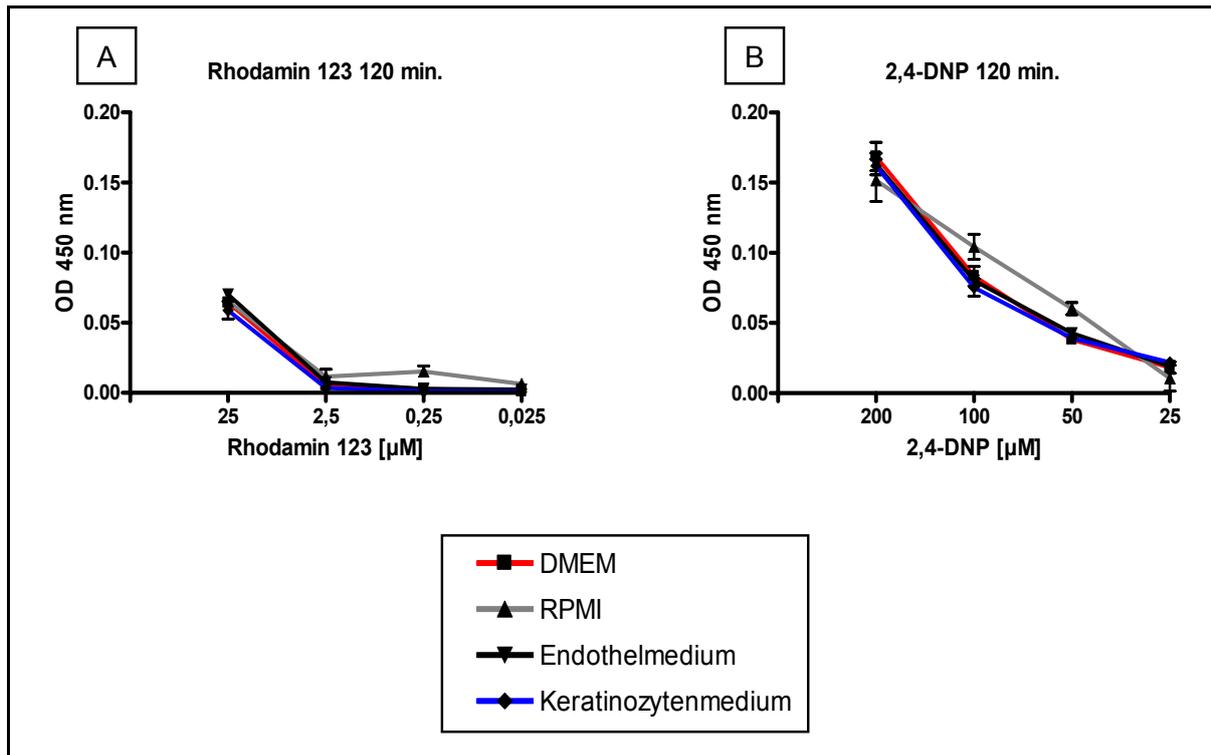


Abb. 37: Hintergrundmessung von farbigen Substanzen im WST-8-Test.

Messung des Hintergrundsignals von Rhodamin 123 (Abb. 37 A) und 2,4-DNP (Abb. 37 B) in verschiedenen Zellkulturmedien 120 min. nach Zugabe des WST-8-Reagenzes. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate, $n = 3$.

4.2.2 Problem der Hintergrundmessung bei farbigen Substanzen im Resazurin-Test

Für die beiden farbigen Substanzen Rhodamin 123 und 2,4-DNP wurden auch im Resazurin-Test Hintergrundkontrollen mitgeführt, da auch hier der Verdacht der Interferenz der beiden Substanzen mit dem pinkfarbenen Reaktionsprodukt Resorufin bestand. Sowohl für Rhodamin 123 (Abb. 38 A) als auch für 2,4-DNP (Abb. 38 B) war das Hintergrundsignal zu vernachlässigen, wie in Abb. 38 A bzw. 38 B an einem repräsentativen Experiment für jede Zelllinie dargestellt ist.

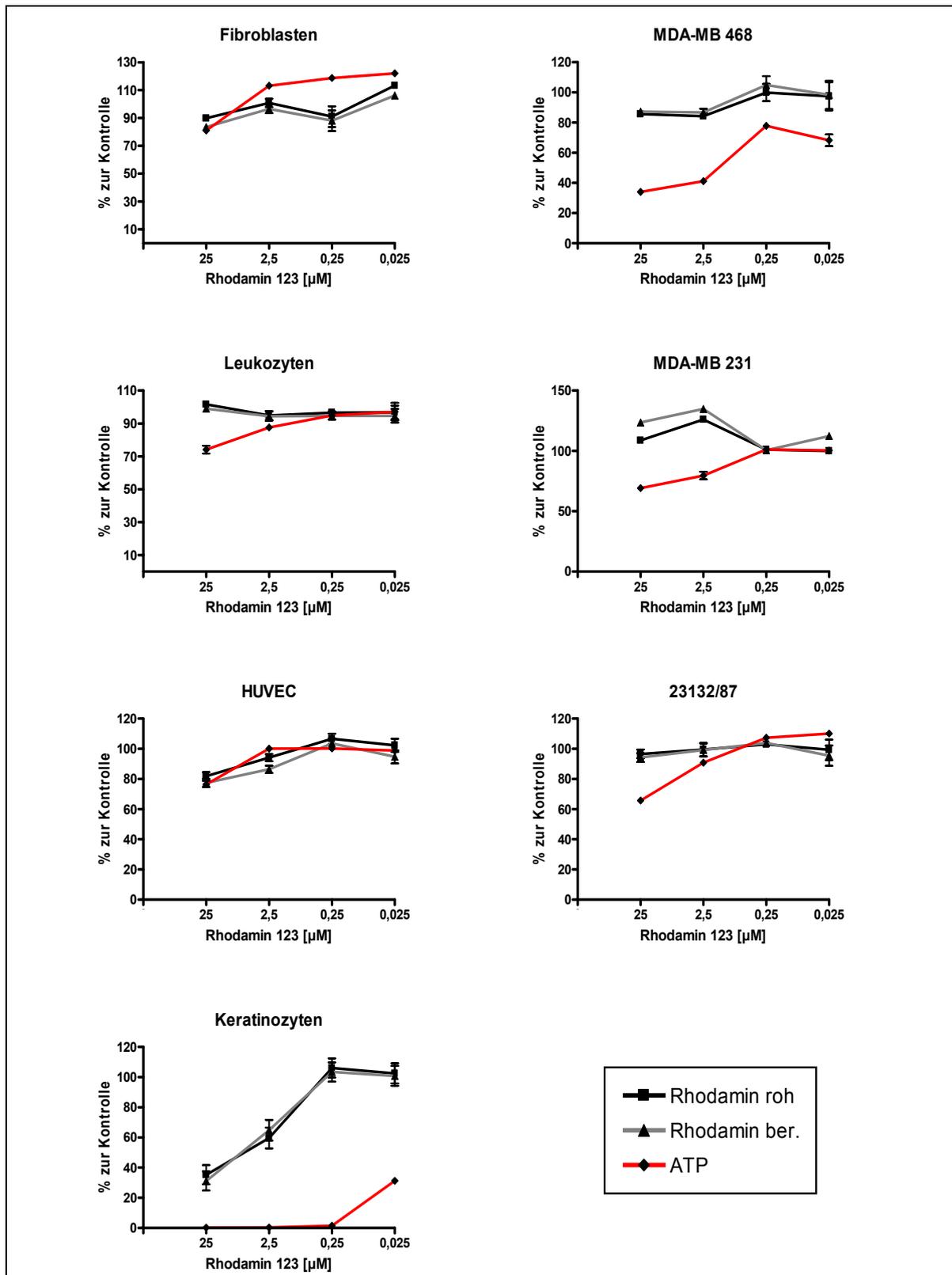


Abb. 38 A: Bestimmung des Hintergrundsignals von Rhodamin 123 im Resazurintest.

Messung der Zellvitalität mittels Resazurintest 24 Std. nach Inkubation mit Rhodamin 123. Die Vitalität wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Für jede Zelllinie ist ein repräsentatives Experiment dargestellt. Zum Vergleich ist der ATP-Gehalt angegeben. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate eines Experiments. Rhodamin 123 lieferte kein nennenswertes Hintergrundsignal.

roh = Hintergrund wurde nicht berücksichtigt. ber. = Hintergrundwert wurde subtrahiert.

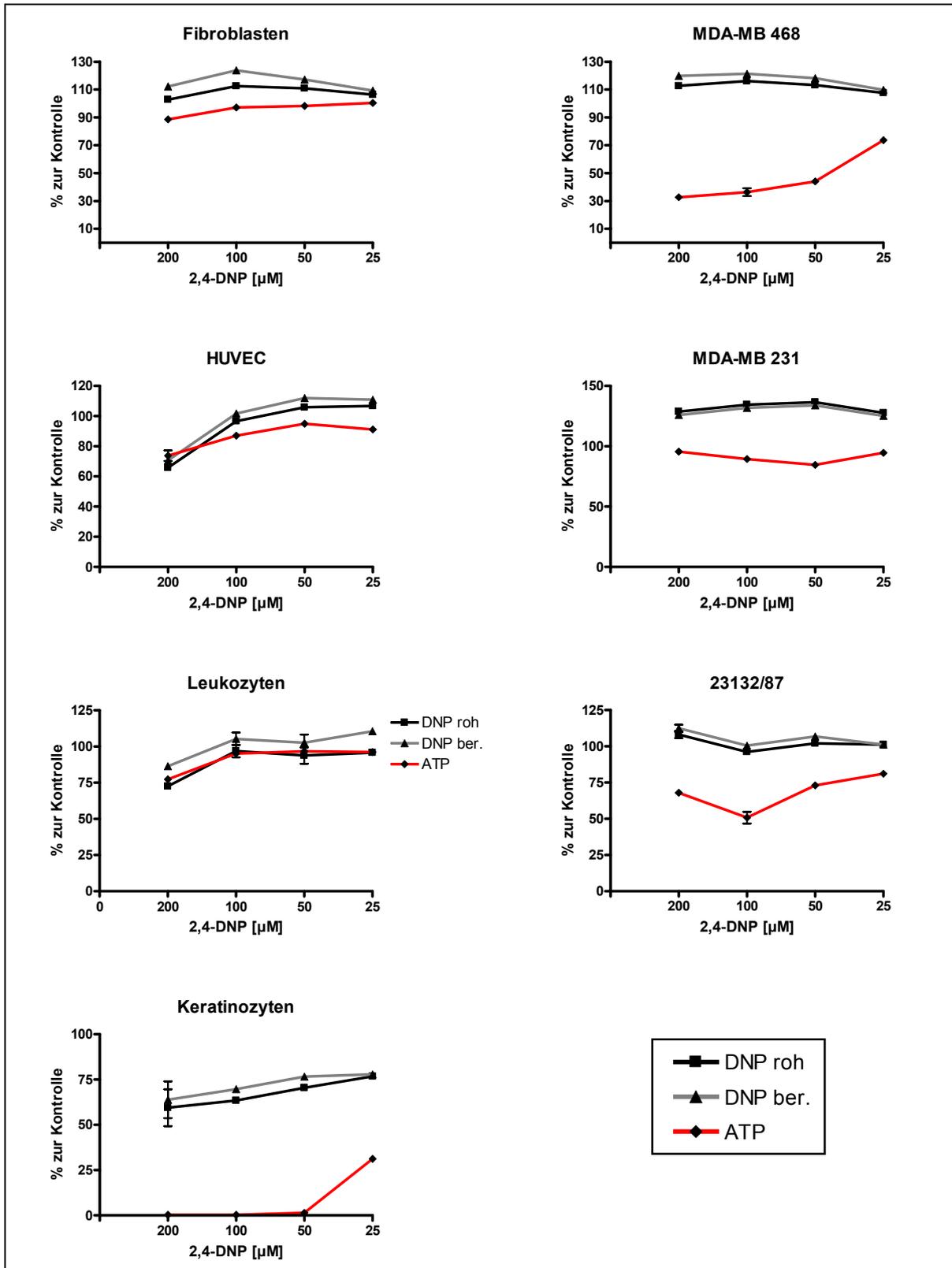


Abb. 38 B: Bestimmung des Hintergrundsignals von 2,4-DNP im Resazurintest.

Messung der Zellvitalität mittels Resazurintest 24 Std. nach Inkubation mit 2,4-Dinitrophenol. Die Vitalität wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Für jede Zelllinie ist ein repräsentatives Experiment dargestellt. Zum Vergleich ist der ATP-Gehalt angegeben. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate eines Experiments. 2,4-DNP lieferte kein nennenswertes Hintergrundsignal.

roh = Hintergrund wurde nicht berücksichtigt. ber. = Hintergrundwert wurde subtrahiert.

4.2.3 Vergleichbarkeit verschiedener Vitalitätstests

Ein Ziel dieser Arbeit war es verschiedene Vitalitätstests bezüglich ihrer Aussagefähigkeit über die Vitalität der Zellen nach Behandlung mit einer zytotoxischen Substanz miteinander zu vergleichen. Diese Untersuchungen wurden mit drei Tumorzelllinien und drei benignen primären Zellarten an zwei ausgewählten Substanzen, 2,4-Dinitrophenol als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien und Perifosin als Inhibitor der Kinase Akt, durchgeführt. Folgende Tests wurden miteinander verglichen: CellTiter-Glo[®] Lumineszenz Vitalitätstest, WST-8 Proliferationstest, Kristallvioletttest, Resazurintest und Adhärenzmessung mit dem xCELLigence-System. Die gemessenen Rohdaten wurden auf die entsprechende Lösungsmittelkontrolle normiert und die sich daraus ergebenden Prozentwerte als Dosis-Wirkungskurve dargestellt. Die Vitalität wurde auf der Ordinate gegen die getesteten Substanzkonzentrationen auf der Abszisse aufgetragen (Abb. 39). Die verschiedenen Tests wurden parallel jeweils mit Zellen einer Passage durchgeführt und dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

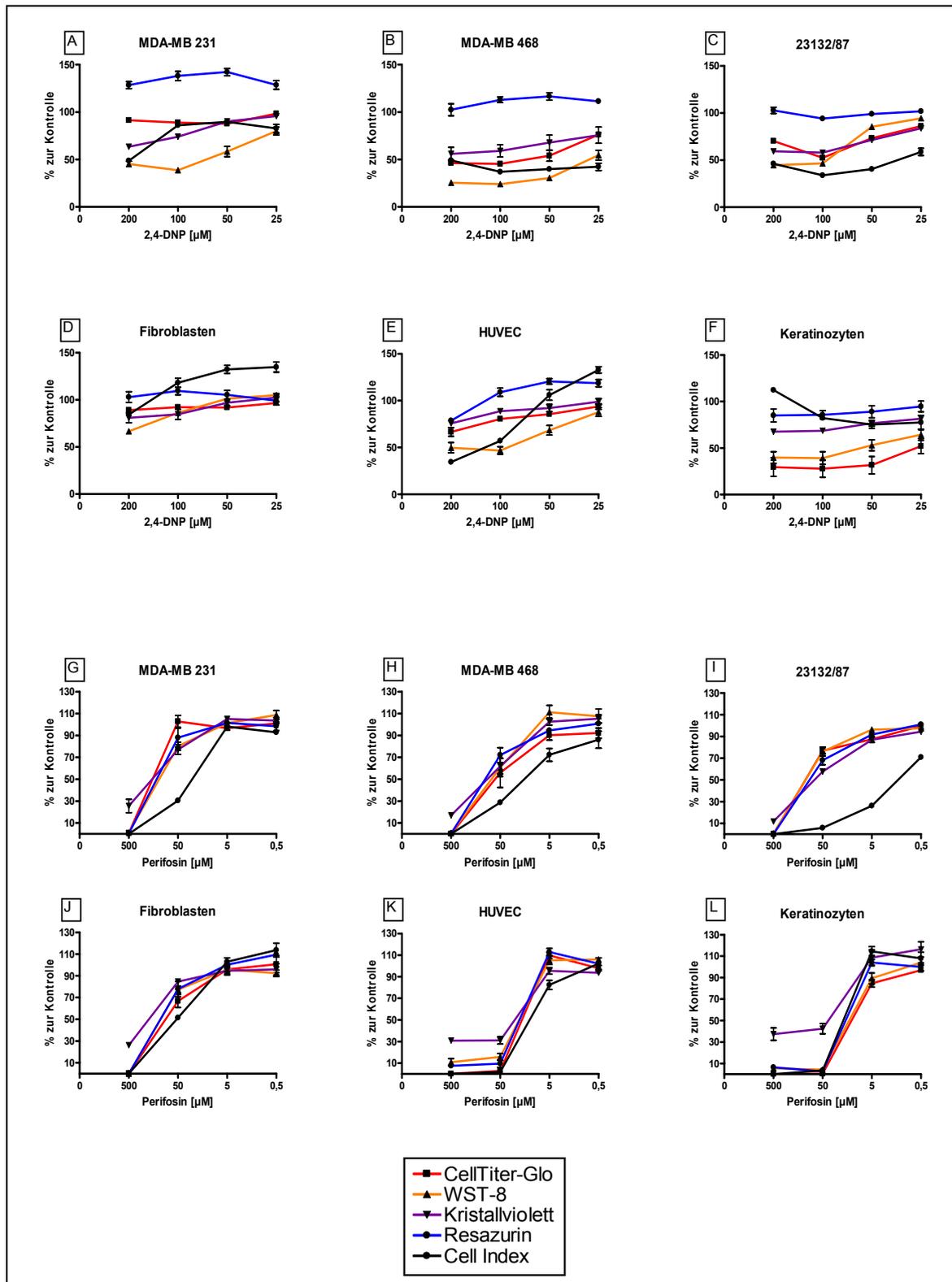


Abb. 39: Vergleich verschiedener Tests zur Bestimmung der Zellvitalität.

Mit fünf verschiedenen Testverfahren wurde die Vitalität der Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit 2,4-DNP bzw. Perifosin bestimmt. Mit CellTiter-Glo® wurde der ATP-Gehalt der Zellen bestimmt. WST-8 und Resazurin geben die metabolische Aktivität wider. Der Kristallvioletttest färbt Nucleoproteine adhärenter Zellen und gibt die relative Zellzahl wider. Der „Cell Index“ ist ein Maß für den Zellstatus und ergibt sich aus der gemessenen Impedanz. Die Vitalität ist in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate, n = 3.

Für Perifosin zeigten alle Vitalitätstests den typischen Kurvenverlauf einer Dosis-Wirkungsbeziehung. Bei der Magenkarzinomlinie 23132/87 wich die Impedanzmessung mit dem xCELLigence-System („Cell Index“) von den anderen Kurvenverläufen deutlich ab, zeigte aber einen dosisabhängigen Verlauf (Abb. 39 C). Der Kristallvioletttest zeigte bei HUVEC (Abb. 39 E) und Keratinozyten (Abb. 39 F) in den beiden höchsten Konzentrationsstufen (500 μ M und 50 μ M) eine 30 - 40 %ige Vitalität an. Der Zellindex hingegen zeigte keine Vitalität an. Beide Tests basieren auf der Adhärenz der Zellen. Eine mögliche Erklärung für den höheren Vitalitätsnachweis im Kristallvioletttest könnte sein, dass hier beim Abnehmen des Zellkulturüberstandes vor der Methanolfixierung nicht alle toten Zellen entfernt wurden, so dass Zelltrümmer anschließend mitgefärbt wurden und eine falsch-positive Vitalität detektiert wurde.

Die Verläufe der Dosis-Wirkungskurven für 2,4-DNP waren bei allen Zelllinien, außer bei Fibroblasten (Abb. 39 J), deutlich inhomogener und zeigten auch nicht den typischen Kurvenverlauf wie es für Perifosin der Fall war. Zudem erfasste der gewählte Konzentrationsbereich nicht das gesamte Vitalitätsspektrum von 0 % bis 100 % Vitalität. MDA-MB 231 (Abb. 39 G), MDA-MB 468 (Abb. 39 H) und HUVEC (Abb. 39 K) zeigten beim Resazurintest sogar eine gesteigerte metabolische Aktivität, der WST-8-Test hingegen zeigte einen deutlich verminderten Metabolismus an. Auch bei den Keratinozyten zeigten die beiden metabolischen Tests Resazurin und WST-8 eine deutliche Diskrepanz (Abb. 39 L). Für die auf Adhärenz basierenden Tests Kristallviolett und Impedanzmessung waren die Kurvenverläufe bei den meisten Zelllinien zwar parallel, in ihren Absolutwerten bzgl. Vitalität aber abweichend. Bei den HUVEC ergab sich zwischen diesen beiden Tests die größte Diskrepanz. Bei 200 μ M zeigte die Impedanz etwa 34 % Vitalität an, der Kristallvioletttest jedoch ca. 75 %. Bei der geringsten Substanzkonzentration (25 μ M) zeigte der Kristallvioletttest eine 100 %ige Vitalität, die Impedanz lag aber deutlich über derjenigen der Kontrollzellen. Außer bei den Keratinozyten bestand eine einigermaßen gute Korrelation zwischen dem Kristallvioletttest und dem ATP-Gehalt der Zellen.

Die Abweichung des Adhärenzverhaltens im Kristallvioletttest und bei der Impedanzmessung könnte auf die unterschiedliche Beschaffenheit der Mikrotiterplatten zurückzuführen sein.

Die beiden verwendeten Substanzen greifen jeweils in verschiedene Signalwege der Zelle ein, was den unterschiedlichen Verlauf der Dosis-Wirkungskurven erklären könnte. 2,4-DNP wirkt als Entkoppler des elektrochemischen Gradienten an der Mitochondrienmembran, interferiert also mit dem Intermediärstoffwechsel der Zelle. Der gewählte Konzentrationsbereich für Dinitrophenol scheint nicht primär zytotoxisch zu sein, stört aber den Stoffwechsel ganz erheblich. Die Diskrepanz zwischen den beiden metabolischen Tests Resazurin und WST-8 ist eventuell auf die unterschiedliche Wirkung von 2,4-DNP auf die den Tests zu Grunde liegenden Enzymsysteme zurückzuführen. Dinitrophenol scheint das Enzym Diaphorase, welches Resazurin in Resorufin umsetzt, abhängig von der Zelllinie, sogar zu aktivieren. Das Phospholipidanalogen Perifosin inhibiert die auch als „Master“-Kinase bezeichnete Kinase „Akt“, welche zahlreiche Zielstrukturen hat, die das Zellwachstum fördern. Sie hemmt proapoptotische Proteine, stimuliert den Zellzyklus und die Angiogenese. Auch Nährstoffaufnahme und Metabolismus werden durch Akt reguliert. Die aktivierte Kinase stimuliert die Aufnahme von Glucose und Aminosäuren und steigert die Glykolyserate (Carnero 2010; Downward 2004). Die eindeutigeren Dosis-Wirkungskurven bei Perifosin sind möglicherweise durch die gleichzeitige Blockade der vielen nicht-redundanten Zielstrukturen zu erklären.

4.2.4 Bestimmung der relativen Zellzahl mit dem Kristallvioletttest

Wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben, wird mit dem Kristallvioletttest die relative Zellzahl bestimmt. Bei der Durchführung des Tests fiel auf, dass die gemessenen OD-Werte der Zellen in reinem Zellkulturmedium innerhalb einer Zelllinie von Experiment zu Experiment sehr verschieden waren, obwohl immer die gleiche Zellzahl ausgesät wurde. Zur Beurteilung der Variabilität des Kristallvioletttests zwischen den einzelnen Experimenten wurden die Messdaten aus allen durchgeführten Experimenten für Zellen in reinem Zellkulturmedium zusammengestellt (Abb. 40).

Der Kristallvioletttest zeigte eine breite Streuung der Werte zwischen den einzelnen Experimenten, wie an den Minimal- (Min) bzw. Maximalwerten (Max) zu sehen ist. Die Schwankung zwischen den einzelnen Experimenten war bei den Fibroblasten am größten mit einem Faktor von 9,77 zwischen dem kleinsten und größten gemessenen OD-Wert. Die Triplikate innerhalb eines Experimentes waren meistens sehr homogen.

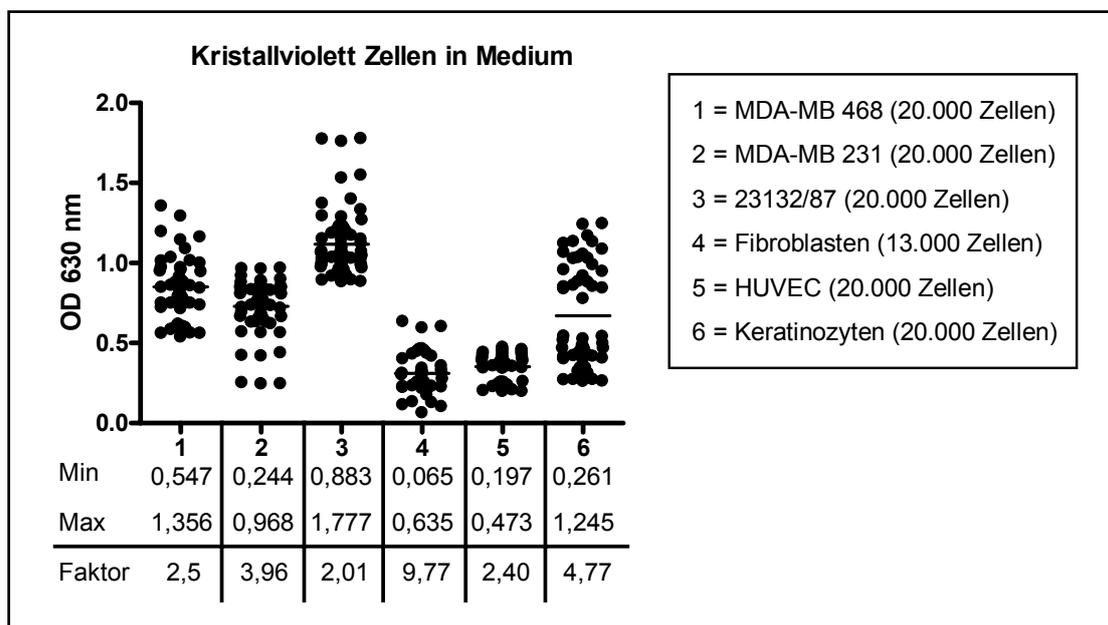


Abb. 40: OD-Werte Kristallvioletttest von Zellen in reinem Zellkulturmedium.

Die Messwerte entsprechen den Mediumkontrollen aus allen durchgeführten Experimenten. Gezeigt sind Mittelwert und Einzelwerte aus allen durchgeführten Experimenten. Der Faktor gibt die Stärke der Schwankung zwischen kleinstem und größtem gemessenen OD-Wert an. Min = kleinster detektierter OD-Wert. Max = größter detektierter OD-Wert.

4.3 Ermittlung des Dosisbereiches der Testsubstanzen

Für die Ermittlung des geeigneten Dosisbereiches der Testsubstanzen für alle sieben zu untersuchenden Zellarten, wurden zunächst nur die beiden Brustkrebslinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231, sowie die benignen Zellarten HUVEC und Keratinozyten als Modell verwendet. Für jede Substanz wurden vier verschiedene Konzentrationen getestet (Tabelle 16) und diese als Dosis-Wirkungskurven dargestellt.

Tab. 16: Verdünnungsreihe der getesteten Substanzen.

Substanz	Verdünnungsreihe (Endkonzentration in Zellkultur)
2-DG	500 – 100 – 20 – 4 mM
3-BrPA	2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,3125 mM
Iodoacetat	25 – 12,5 – 6,25 – 3,125 µM
Natriumfluorid	10 – 5 – 2,5 – 1,25 mM
Oxamat	100 – 20 – 4 – 0,8 mM
Oxythiamin	100 – 20 – 4 – 0,8 mM
Rotenon	10 – 0,1 – 0,001 – 0,00001 µM
Oligomycin	50 – 25 – 12,5 – 6,25 µM
2,4-DNP	200 – 100 – 50 – 25 µM
Rhodamin 123	25 – 2,5 – 0,25 – 0,025 µM
NaDCA	100 – 20 – 4 – 0,8 mM
DON	1000 – 200 – 40 – 8 µM
Metformin	5 – 1 – 0,2 – 0,04 mM
Perifosin	500 – 50 – 5 – 0,5 µM
Sorafenib	100 – 10 – 1 – 0,1 µM

Anhand der Dosis-Wirkungskurven wurde für jede Testsubstanz eine bestimmte Konzentration gewählt, bei der die deutlichsten Unterschiede zwischen benignen und malignen Zellen festgestellt wurden. Aufgrund der in den Testvergleichen ermittelten Reproduzierbarkeit und besten Durchführbarkeit (einfache Handhabung) wurde zur Auswertung der Effektstärke der Substanz auf Tumorzellen und normale, gesunde Zellen der Nachweis des intrazellulären ATP-Gehaltes gewählt. Die Abbildungen 41 - 43 zeigen die Dosiswirkungskurven für die vier gewählten Modellzelltypen.

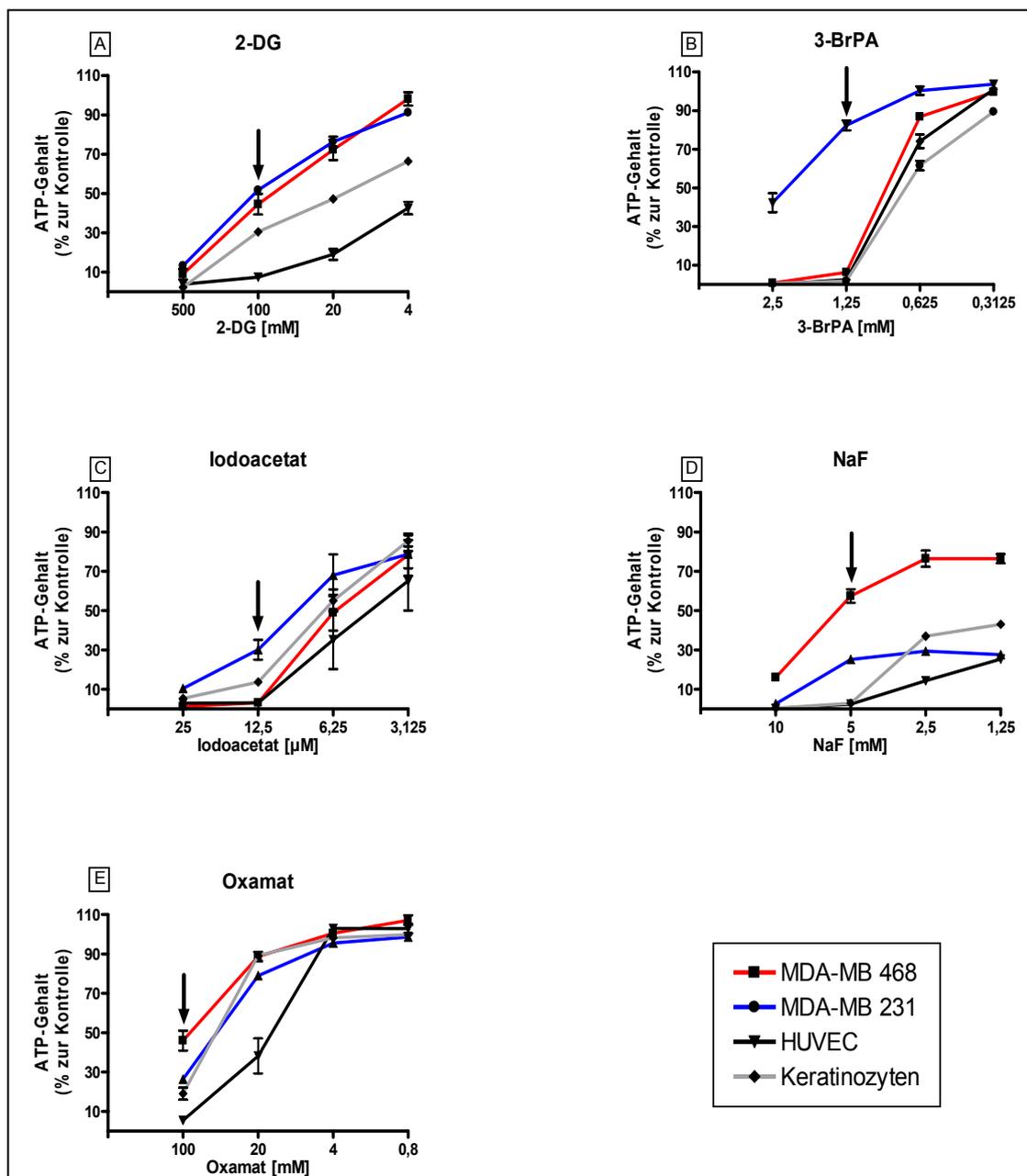


Abb. 41: Dosis-Wirkungskurven für Inhibitoren der Glykolyse.

Die Vitalität der Zellen wurde nach 24 stündiger Inkubation mit Glykolyseinhibitoren anhand des ATP-Gehaltes (CellTiter-Glo®-Test) bestimmt. Der relative ATP-Gehalt wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Der Pfeil zeigt die ausgewählte Konzentration für die weiteren Experimente. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate, n = 3, für 3-BrPA n = 2.

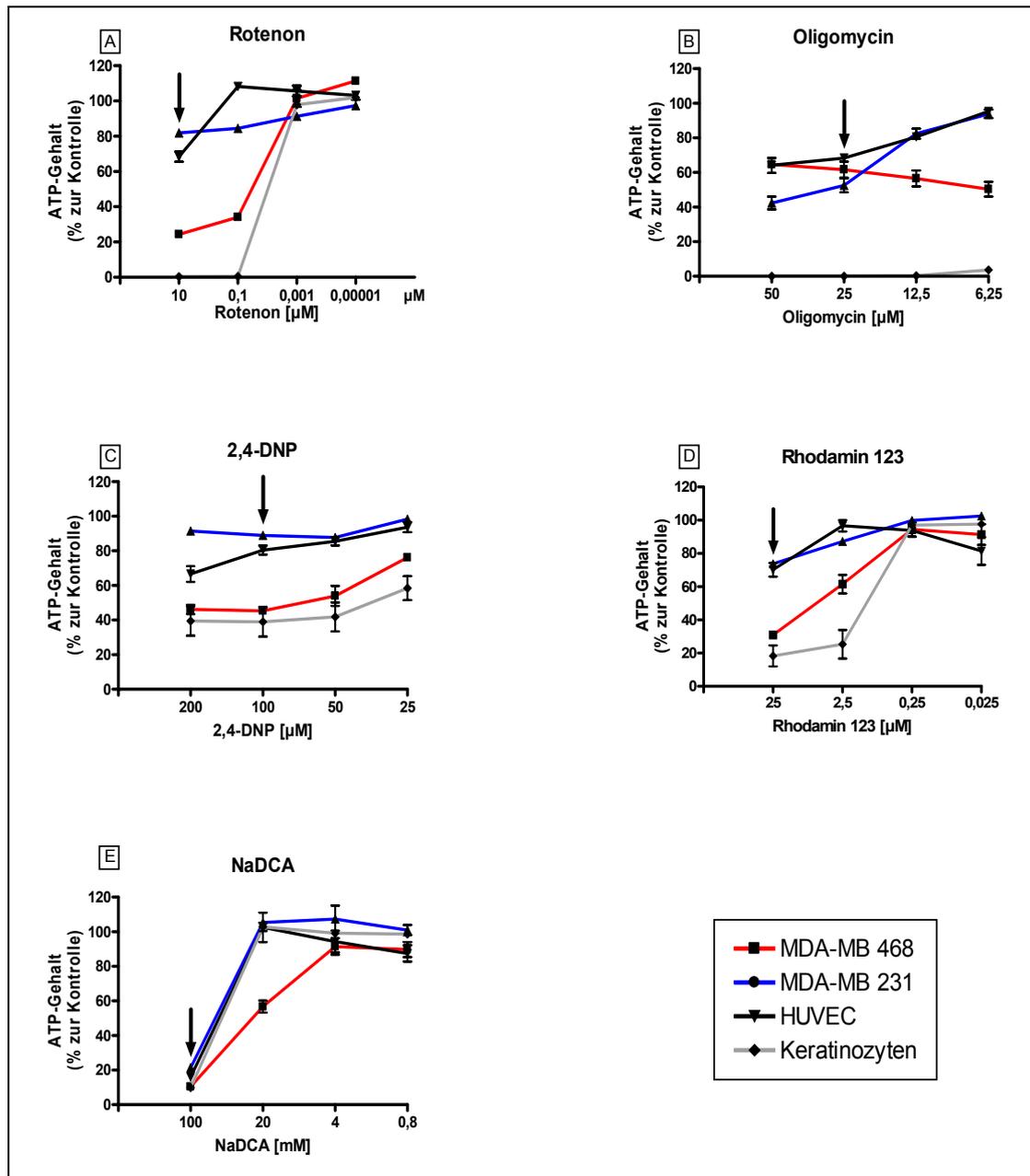


Abb. 42: Dosis-Wirkungskurven für Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen.

Die Vitalität der Zellen wurde nach 24 stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen anhand des ATP-Gehaltes (CellTiter-Glo®-Test) bestimmt. Der relative ATP-Gehalt wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Der Pfeil zeigt die ausgewählte Konzentration für die weiteren Experimente. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate, $n = 3$.

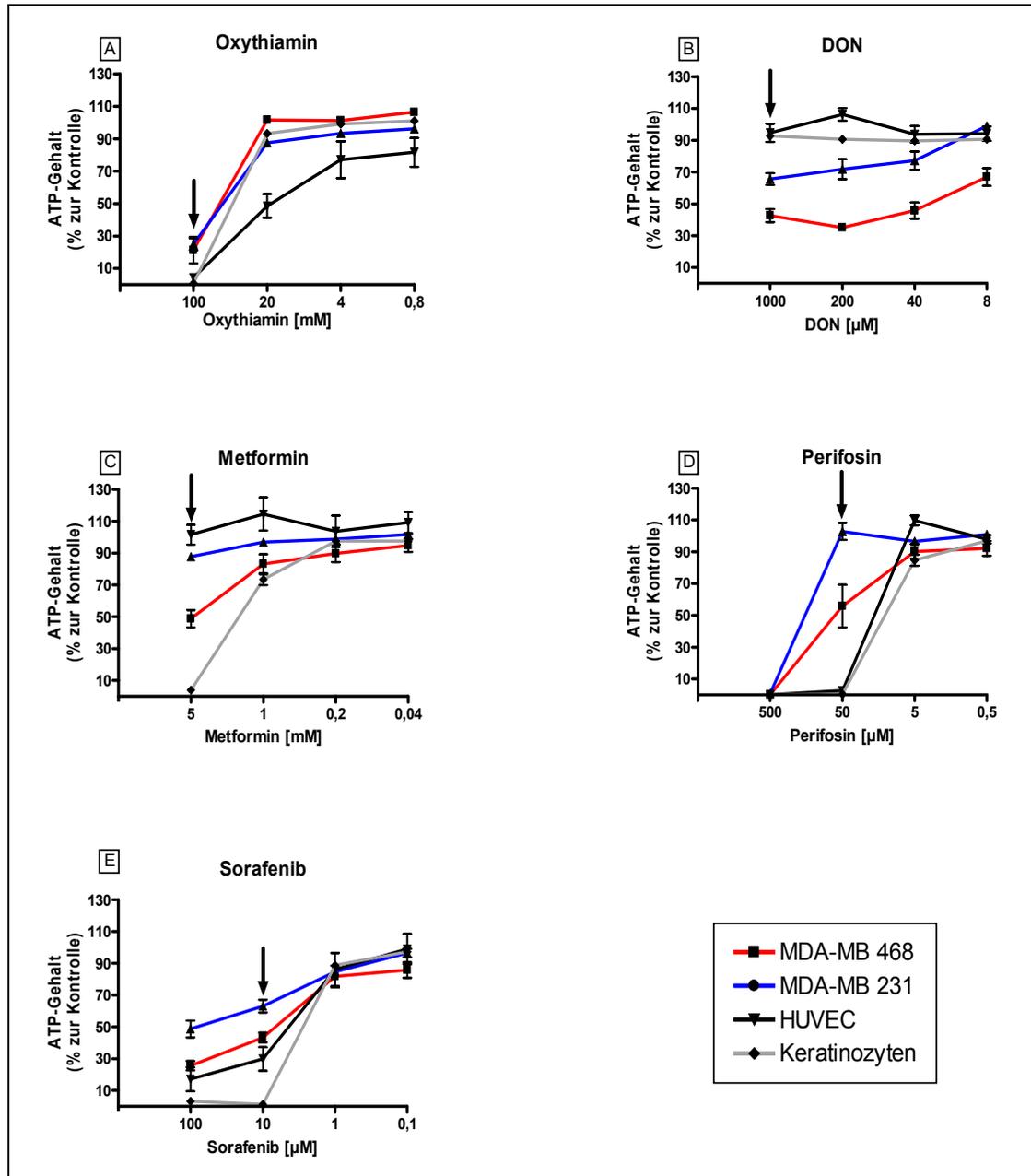


Abb. 43: Dosis-Wirkungskurven für Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen.

Die Vitalität der Zellen wurde nach 24 stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen anhand des ATP-Gehaltes (CellTiter-Glo®-Test) bestimmt. Der relative ATP-Gehalt wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Der Pfeil zeigt die ausgewählte Konzentration für die weiteren Experimente. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate, n = 3.

4.4 ATP-Gehalt in malignen und benignen Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen

4.4.1 Glykolyseinhibitoren

Abb. 44 zeigt den relativen ATP-Gehalt der Zellen für Inhibitoren, welche an verschiedenen Stellen der Glykolyse angreifen. Das Glucoseanalogon **2-DG** reduzierte bei 100 mM den ATP-Gehalt auf etwa 50 % in den beiden Brustkrebszelllinien und auf 26 % in 23132/87. Auch in den benignen Zellen, vor allem in HUVEC, führte die gewählte Testkonzentration von 2-DG zu einer drastischen Reduktion des ATP-Gehaltes (Abb. 44 A).

Der Hexokinaseinhibitor **3-BrPA**, der auf der gleichen Ebene der Glykolyse wie 2-DG angreift, zeigte einen sehr deutlichen Effekt auf den ATP-Gehalt der Zellen. In allen Zellen, bis auf die Magenkarzinomzellen 23132/87 und in die Brustkrebszellen MDA-MB 231 wurde der ATP-Gehalt nach Behandlung mit 1,25 mM 3-BrPA auf unter 10 % reduziert. Auffällig war die stark unterschiedliche Wirkung von 3-BrPA innerhalb einer Tumorentität zwischen den beiden Brustkrebslinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231 (Abb. 44 B).

Iodoacetat, der Inhibitor des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat, zeigte ein ähnliches Wirkprofil wie 3-BrPA. Bei der gewählten Konzentration von 12,5 μ M betrug der ATP-Gehalt in allen Zellen, außer MDA-MB 231 und 23132/87 maximal 10 %. MDA-MB 231 und 23132/87 waren gegenüber Iodoacetat deutlich sensitiver als gegenüber 3-BrPA (Abb. 44 C).

Nach Behandlung mit 5 mM des Enolaseinhibitors **NaF** war der ATP-Gehalt von allen benignen Zellen, außer Leukozyten, praktisch gleich null, wohingegen die Tumorzellen noch mindestens 25 % ATP-Gehalt aufwiesen. Bei den Tumorzellen war der intrazelluläre ATP-Gehalt in MDA-MB 231 am stärksten reduziert. Auch hier war zwischen den beiden Brustkrebszelllinien ein deutlicher Unterschied in der inhibitorischen Wirkung zu sehen (Abb. 44 D).

Für **Oxamat** konnte ebenfalls keine tumorspezifische Wirkung festgestellt werden. In Tumorzellen war der ATP-Gehalt nach Behandlung mit 100 mM des LDH-Inhibitors um 50 % oder mehr vermindert. In benignen Zellen (HUVEC) sogar um bis zu 95 %. Leukozyten erwiesen sich auch hier als die resistentesten benignen Zellen (Abb. 44 E).

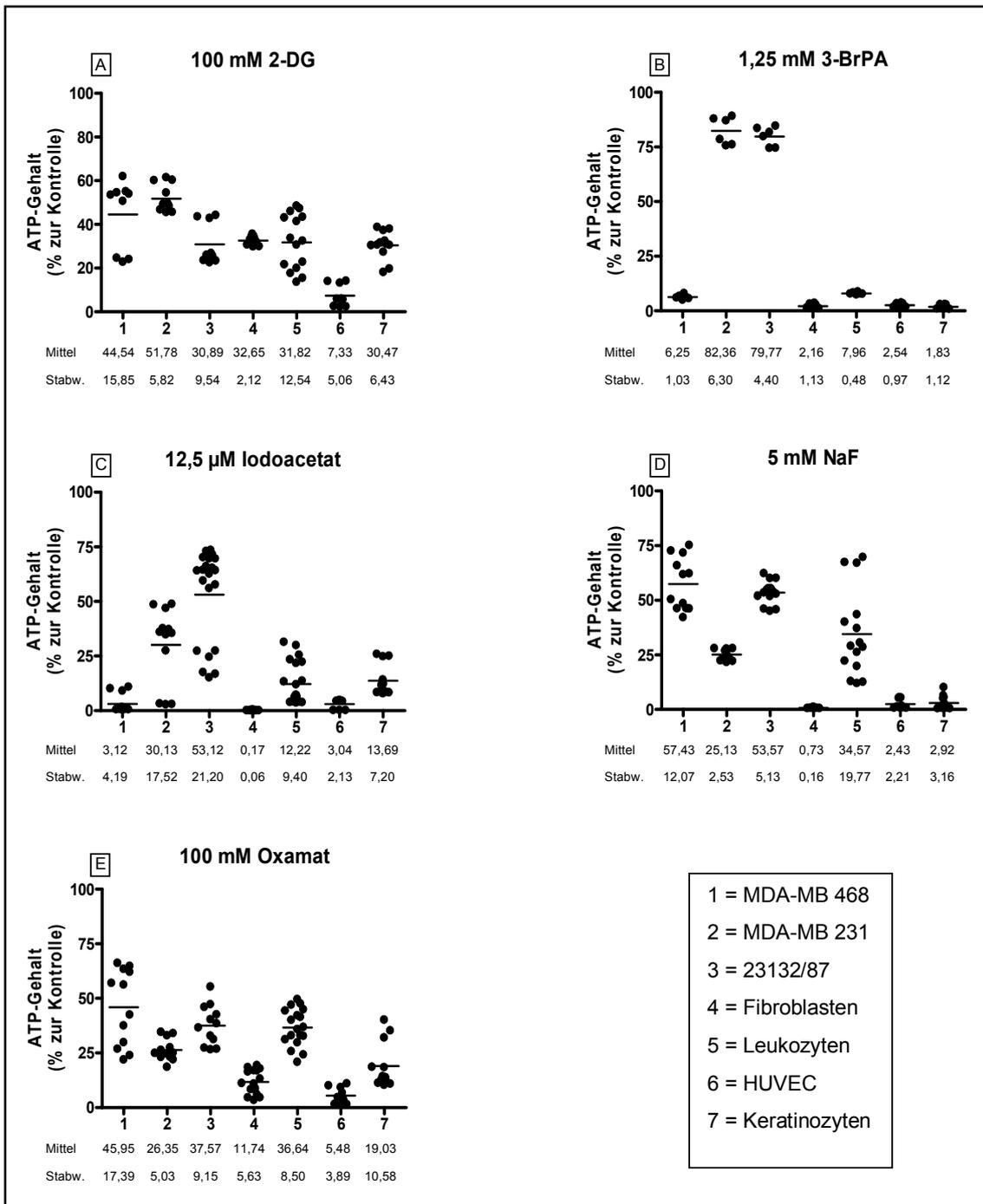


Abb. 44: Einfluss von Glykolyseinhibitoren auf den ATP-Gehalt maligner und benigner Zellen. Der ATP-Gehalt der Zellen wurde nach 24 stündiger Inkubation mit den Substanzen mit dem CellTiter-Glo®-Test bestimmt. Der relative ATP-Gehalt wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Gezeigt sind Mittelwert und Einzelwerte. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate, $n \geq 3$, für 3-BrPA $n = 2$.

4.4.2 Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen

Abb. 45 zeigt den relativen ATP-Gehalt der Zellen für Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen. Die Blockade des Komplex I in Mitochondrien durch **Rotenon** hatte für Keratinozyten den stärksten Effekt und führte zu einer vollständigen ATP-Depletion. 10 μM dieses Inhibitors reduzierten den ATP-Gehalt in MDA-MB 468 auf 24 %. Alle anderen getesteten Zellen zeigten nur eine geringe Reaktion auf diese Substanz (Abb. 45 A).

Oligomycin führte in Keratinozyten und Leukozyten zu einer kompletten ATP-Depletion. In Fibroblasten sank der ATP-Gehalt auf 28 %. 25 μM des ATP-Synthase-Inhibitors bewirkte in Tumorzellen eine Verminderung des ATP-Gehaltes auf etwa 50 - 60 %. Auffallend war die relativ geringe Hemmwirkung auf Endothelzellen (Abb. 45 B). Anscheinend sind diese Zellen in der Lage ihren Energiebedarf komplett über die Glykolyse aufrechtzuerhalten.

Die Behandlung der Zellen mit 100 μM des Entkopplers **2,4-DNP** führte nur in zwei Tumorzelllinien (MDA-MB 468 und 23132/87) zu einer deutlich Reduktion des ATP-Gehaltes. Der Effekt auf Keratinozyten war bei den einzelnen Experimenten stark gegensätzlich. In fünf von neun durchgeführten Experimenten führte die Behandlung mit 2,4-DNP zu einer kompletten ATP-Depletion, in den anderen vier nur zu einer minimalen Reduktion des ATP-Gehaltes. Anscheinend hängt die Wirkung des Entkopplers stark von der jeweiligen Passage, vom Zellalter oder auch der Charge ab. Trotz der großen Anzahl wiederholter Experimente ergab sich für diese Zellen keine eindeutige Aussage (Abb. 45 C).

Für **Rhodamin 123**, ebenfalls ein Entkoppler, ergab sich ein ähnliches Wirkprofil wie für 2,4-DNP. In MDA-MB 468 wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt nach Behandlung mit 25 μM der Substanz auf 31 % abgesenkt. Die übrigen Zellen reagierten mit einer ATP-Depletion zwischen 26 % und 40 %. Die Reaktion von Keratinozyten auf diesen Entkoppler war je nach Passage grundverschieden, mit der Tendenz in Richtung kompletter ATP-Depletion bei sechs von acht Experimenten (Abb. 45 D).

100 mM **NaDCA** bewirkte bei fast allen Zellen eine Verminderung des ATP-Gehaltes um 80 % oder mehr, bei Leukozyten und der Magenkarzinomlinie 23132/87 lediglich nur um 59 % bzw. 53 %. In einem von vier Experimenten der Magenkarzinomzellen lag der ATP-reduzierende Effekt allerdings bei etwa 87 % (Abb. 45 E).

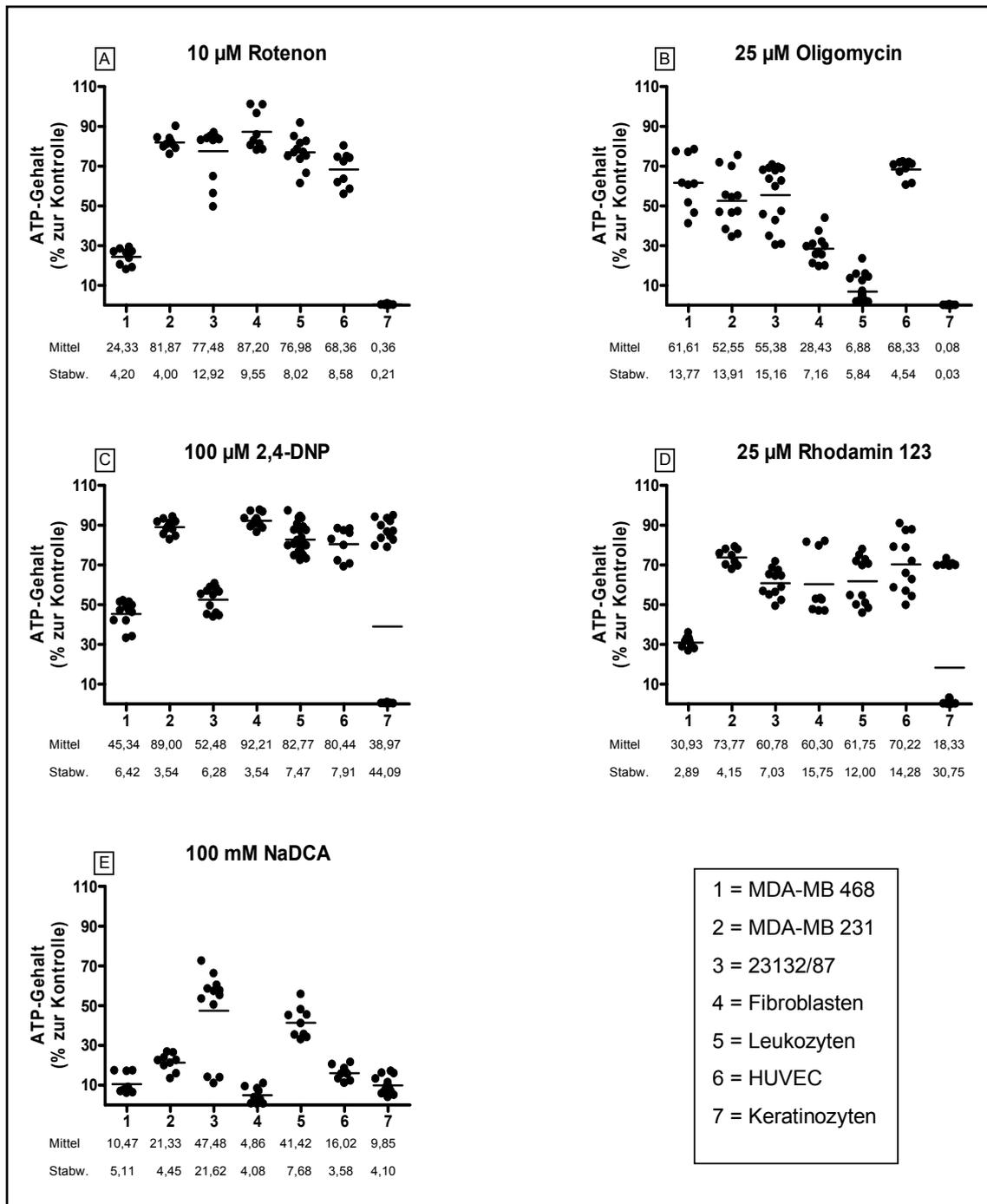


Abb. 45: Einfluss von Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen, auf den ATP-Gehalt maligner und benigner Zellen.

Der ATP-Gehalt der Zellen wurde nach 24 stündiger Inkubation mit den Substanzen mit dem CellTiter-Glo[®]-Test bestimmt. Der relative ATP-Gehalt wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Gezeigt sind Mittelwert und Einzelwerte. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate, $n \geq 3$.

4.4.3 Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen

Abb. 46 zeigt den relativen ATP-Gehalt der Zellen für Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen. Der Transketolase-Inhibitor **Oxythiamin** reduzierte bei der gewählten Konzentration von 100 mM den ATP-Gehalt in benignen Zellen auf nahezu null, wobei die Ergebnisse für Leukozyten inkonsistent waren. Die hier eingesetzten Tumorzellen scheinen *in vitro* weitaus robuster gegenüber dieser – in der Klinik schon teilweise als Anti-Tumor-Therapeutikum getesteten – Substanz zu sein. Nur bei der Brustkrebszelllinie MDA-MB 468 war der ATP-Gehalt in zwei von drei Experimenten auf unter 13 % gesunken (Abb. 46 A).

Das Glutaminanalogon **DON** zeigte bei einer Konzentration von 1 mM tendenziell eine tumorspezifische Wirkung. Der ATP-Gehalt war hier auf 42 - 62 % reduziert. In Fibroblasten wurde in einem von vier Experimenten der ATP-Gehalt auf etwa 40 % vermindert, im Mittel lag der ATP-Gehalt aber bei 70 %. Leukozyten und HUVEC zeigten keine Reduktion des ATP-Gehalts bzw. teilweise sogar eine Steigerung unter diesen Bedingungen (Abb. 46 B).

Bei den Tumorzellen wurde nur bei der Brustkrebszelllinie MDA-MB 468 durch 5 mM **Metformin** eine deutliche ATP-Depletion erreicht. In Keratinozyten kam es zu einer kompletten ATP-Depletion, alle anderen Zellarten zeigten praktisch kein Ansprechen auf diese Substanz. HUVEC Zellen zeigten sogar eine leicht erhöhte ATP-Produktion (Abb. 46 C).

Die Behandlung mit 50 µM **Perifosin**, einem Inhibitor der Akt-Kinase, führte in Endothelzellen und Keratinozyten zu einer vollständigen ATP-Depletion. Für die Brustkrebszelllinie MDA-MB 468 waren die Ergebnisse sehr inhomogen. Bei allen anderen Zellen zeigte sich nur eine geringe Wirkung (Abb. 46 D).

In den getesteten Tumorzelllinien führten 10 µM des Multikinaseinhibitors **Sorafenib** zu einer 40 - 60 %igen Reduktion des ATP-Gehalts in diesen Zellen. Bei den benignen Zellen ergaben sich gegensätzliche Effekte. Fibroblasten und Leukozyten waren relativ resistent gegenüber Sorafenib, HUVEC und Keratinozyten jedoch äußerst sensitiv (Abb. 46 E).

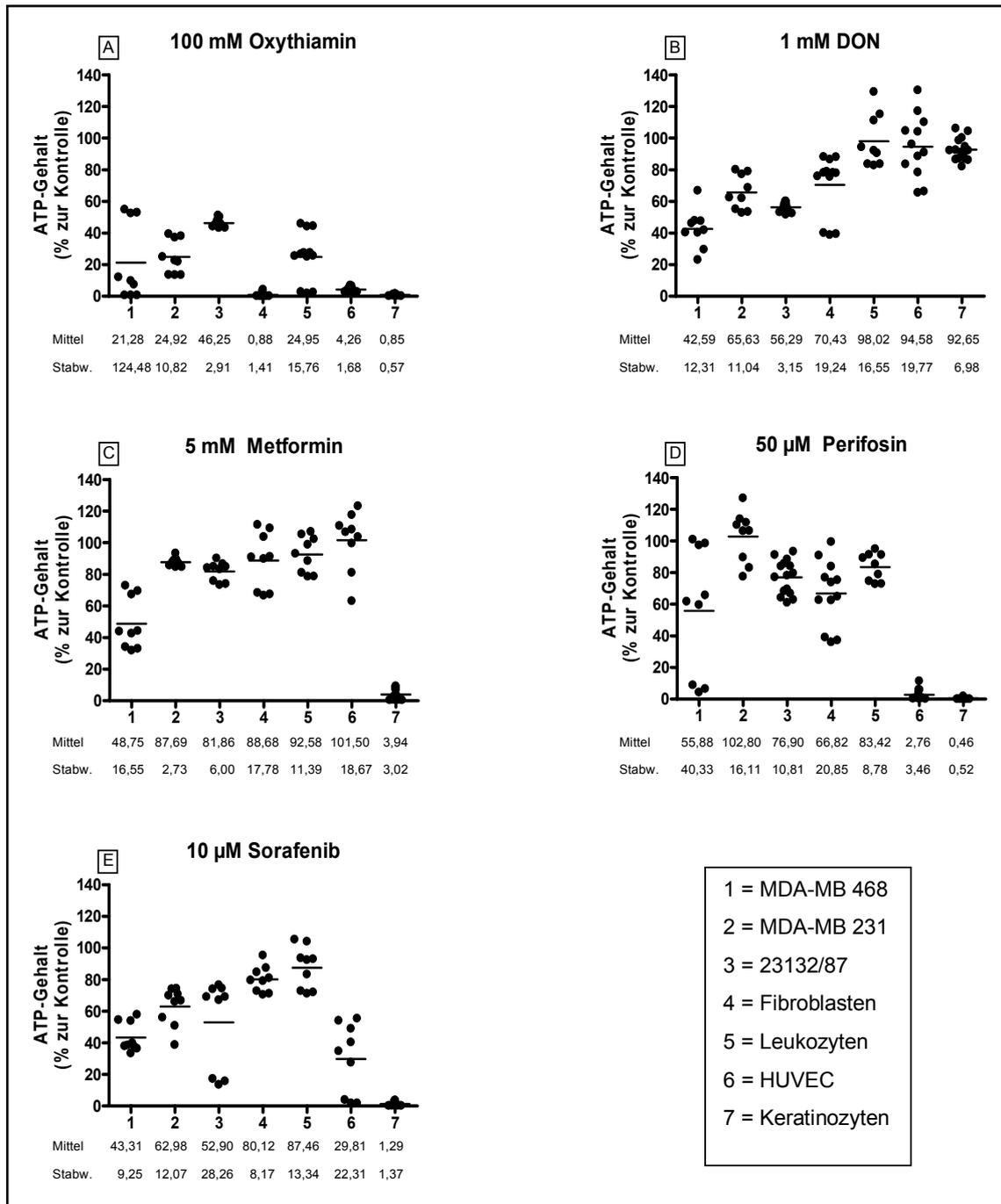


Abb. 46: Einfluss von Substanzen die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen, auf den ATP-Gehalt maligner und benigner Zellen.

Der ATP-Gehalt der Zellen wurde nach 24 stündiger Inkubation mit den Substanzen mit dem CellTiter-Glo®-Test bestimmt. Der relative ATP-Gehalt wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Gezeigt sind Mittelwert und Einzelwerte. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate, $n \geq 3$.

4.4.4 Vergleich der beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231

Die beobachtete Wirkung einiger Substanzen war innerhalb der Entität Brustkrebs an zwei verschiedenen Zelllinien z. T. sehr unterschiedlich. Daher wurden die beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231 direkt miteinander verglichen, um signifikante Unterschiede herauszuarbeiten. Die meisten aggressiven Krebszellen sind durch einen glykolytischen Phänotyp charakterisiert und weisen eine gesteigerte Milchsäureproduktion auf. Daher sollten diese Zellen stärker auf Glykolyseinhibitoren ansprechen. Als Maß für den metabolischen Typ der Zelle (starke Milchsäuregärung) kann die Abgabe von L-Laktat (bei definierten Zellzahlen) in das Zellkulturmedium gesehen werden. Abb. 47 zeigt die Milchsäureproduktion der beiden Zelllinien bei jeweils 2×10^5 Zellen/ml. Aufgrund des nur geringen Unterschiedes war keine Aussage bzgl. einer möglichen unterschiedlichen Rate der Milchsäuregärung in den beiden Zelllinien möglich.

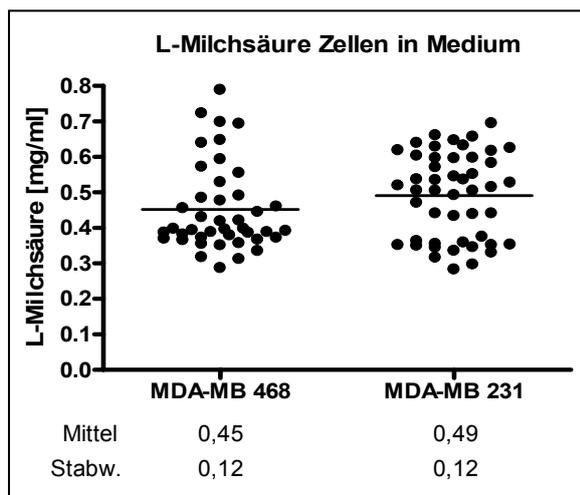


Abb. 47: Milchsäureproduktion von Brustkrebszelllinien.

Im Zellkulturüberstand wurde die Menge produzierter Milchsäure der beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231 nach 48 Std. Kultur (je 2×10^5 Zellen/ml) bestimmt. Gezeigt sind Mittelwert und Einzelwerte aus allen durchgeführten Experimenten. Mittelwert und Standardabweichung aus allen durchgeführten Experimenten sind angegeben. Der Unterschied in der Produktion von Milchsäure war nicht signifikant (t-Test, GraphPad Prism).

In Tabelle 17 ist der relative ATP-Gehalt der Zellen nach Behandlung mit den verschiedenen Testsubstanzen dargestellt. Für das Glucoseanalogon **2-DG** zeigte sich kein Unterschied in der Wirkung. Für den Hexokinaseinhibitor **3-BrPA**, welcher zwar auf der gleichen Ebene der Glykolyse angreift wie 2-DG aber einen anderen Wirkmechanismus besitzt, waren MDA-MB 468 deutlich sensitiver. **Iodoacetat** bewirkte in MDA-MB 468 eine nahezu vollständige ATP-Depletion, in MDA-MB 231 war der ATP-Gehalt auf 30 % abgesenkt. **NaF** und **Oxamat**, zwei Substanzen, die in späten Schritten der Glykolyse eingreifen, führten in MDA-MB 468 zu einer ATP-Reduktion um 43 % bzw. 54 %. MDA-MB 231 waren deutlich sensitiver gegenüber diesen beiden Inhibitoren, ihr ATP-Gehalt wurde um ca. 75 % vermindert.

Für Inhibitoren, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen, waren MDA - MB 468-Zellen signifikant sensitiver. Durch Blockade des Komplex I in den Mitochondrien durch **Rotenon** wurde der ATP-Gehalt in MDA-MB 468 auf 24 % gesenkt. MDA-MB 231 waren gegenüber diesem Inhibitor deutlich resistenter und konnten ihren ATP-Spiegel (im Mittel 82 %) wahrscheinlich kompensatorisch über die Glykolyse aufrechterhalten. **Oligomycin** bewirkte in beiden Zelllinien eine ähnlich starke ATP-Depletion. Auf die beiden entkoppelnden Substanzen **2,4-DNP** und **Rhodamin 123** reagierten MDA-MB 468 signifikant sensitiver. **NaDCA** führte in beiden Brustkrebszelllinien zu stark verminderten ATP-Spiegeln, in MDA-MB 468 war dieser aber signifikant niedriger. Durch die Blockade der Transketolase im Pentosephosphatweg mit **Oxythiamin** wurde in beiden Zelllinien der ATP-Gehalt etwa gleich stark vermindert. Substanzen wie **DON**, **Metformin**, **Perifosin** und **Sorafenib** bewirkten in MDA-MB 468 eine signifikant stärkere ATP-Reduktion, wobei die Daten für Perifosin sehr inhomogen waren. Im Gesamten betrachtet reagierten MDA-MB 468 sensitiver auf die getesteten Substanzen.

Tab. 17: Einfluss der Testsubstanzen auf den ATP-Gehalt in den beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231.

Substanz	MDA-MB 468	MDA-MB 231	p-Wert
100 mM 2-DG	44,54 ± 15,85	51,78 ± 5,82	0,9717
1,25 mM 3-BrPA	6,25 ± 1,03	82,36 ± 6,30	0,0022
12,5 µM Iodoacetat	3,12 ± 4,19	30,13 ± 17,52	0,0003
5 mM NaF	57,43 ± 12,07	25,13 ± 2,53	<0,0001
100 mM Oxamat	45,95 ± 17,39	26,35 ± 5,03	0,0086
10 µM Rotenon	24,33 ± 4,20	81,87 ± 4,0	<0,0001
25 µM Oligomycin	61,61 ± 13,77	52,55 ± 13,91	0,1452
100 µM 2,4-DNP	45,34 ± 6,42	89,00 ± 3,54	<0,0001
25 µM Rhodamin 123	30,93 ± 2,89	73,77 ± 4,15	<0,0001
100 mM NaDCA	10,47 ± 5,11	21,33 ± 4,45	0,0012
100 mM Oxythiamin	21,28 ± 24,48	24,95 ± 10,82	0,2581
1 mM DON	42,59 ± 12,31	65,63 ± 11,04	0,0008
5 mM Metformin	48,75 ± 16,55	87,69 ± 2,73	<0,0001
50 µM Perifosin	55,88 ± 40,33	102,8 ± 16,11	0,004
10 µM Sorafenib	43,31 ± 9,26	62,98 ± 12,07	0,0028

Der ATP-Gehalt der beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231 wurde nach 24 stündiger Inkubation mit den Substanzen mit dem CellTiter-Glo®-Test bestimmt. Der relative ATP-Gehalt wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate, n ≥ 3., für BrPA n = 2.

4.5 Berechnung von Hemmkonzentrationen (*Inhibitory Concentration, IC*)

4.5.1 Berechnung von Hemmkonzentrationen mit verschiedenen Methoden

Die mittlere Hemmkonzentration IC₅₀ wurde mit drei verschiedenen Methoden berechnet. Diese waren: nichtlineare Regression und lineare Interpolation mit dem Software-Programm GraphPad Prism 4 sowie mit linearer Interpolation mit dem Software-Programm Microsoft Excel. Bei einigen Substanzen konnte GraphPad Prism 4 für den gewählten Konzentrationsbereich mit der nichtlinearen Regression keine IC₅₀ berechnen. Daher wurde versucht mittels nichtlinearer Interpolation durch GraphPad Prism 4 und linearer Regression mit Excel andere Hemmkonzentrationen (IC₁₀, IC₂₅, IC₇₅) zu bestimmen. Wenn die Hemmkonzentration auch durch Interpolation nicht zu bestimmen war, wurde der IC-Wert anhand der Dosis-Wirkungskurve abgeschätzt.

Tabelle 18 zeigt exemplarisch die mit den verschiedenen Methoden berechneten IC-Konzentrationen für MDA-MB 231, die anhand des ATP-Gehaltes berechnet wurden. Da überprüft werden sollte, ob die nichtlineare Interpolation mit Graph Pad Prism (2) und die lineare Interpolation mit Microsoft Excel (3) für die Bestimmung von Hemmkonzentrationen vergleichbare Ergebnisse liefern, wurde die prozentuale Abweichung zwischen diesen beiden Methoden berechnet.

Tab. 18: Berechnung von Hemmkonzentrationen mit verschiedenen Methoden

Substanz [Konzentration]	IC	nichtlineare Regression Prism (1)	nichtlineare Interpolation Prism (2)	lineare Interpolation Excel (3)	Abwei- chung (2) / (3)
2-DG [mM]	50	87,32	87,30	118,44	26 %
3-BrPA [mM]	50	2,23	2,23	2,26	1 %
Iodoacetat [μ M]	50	8,22	8,22	9,22	11 %
NaF [mM]	75	a)	2,30	5,03	54 %
Oxamat [mM]	50	49,26	49,20	64,07	77 %
Rotenon [μ M]	10	a)	0,00687	0,02	66 %
Oligomycin [μ M]	50	34,33	34,36	31,24	9 %
2,4-DNP [μ M]	10	a)	148,59	140,28	6 %
Rhodamin 123 [μ M]	25	a)	20,61	22,95	10 %
NaDCA [mM]	50	a)	56,54 ^{b)}	72,70	22 %
Oxythiamin [mM]	50	55,38	55,34	67,97	19 %
DON [μ M]	25	a)	191,43	104,74	45 %
Metformin [mM]	10	a)	3,38 ^{b)}	4,0	16 %
Perifosin [μ M]	50	254,4	254,68	283,05	10 %
Sorafenib [μ M]	50	66,62	66,68	91,49	27 %

Angegeben ist die Hemmkonzentration (*Inhibitory concentration*, IC) von MDA-MB 231 für die jeweiligen Substanzen. Die IC wurde anhand des ATP-Gehaltes mit drei verschiedenen Methoden berechnet. a) das Programm GraphPad Prism konnte die IC 50 nicht berechnen. b) IC wurde anhand der Dosis-Wirkungskurve abgeschätzt, da keine Interpolation möglich war.

4.5.2 Berechnung verschiedener Hemmkonzentrationen der getesteten Substanzen für alle Zelllinien

Für die Berechnung der IC50-Werte waren die Ergebnisse der nichtlinearen Regressionsanalyse und der nichtlinearen Interpolation, wie erwartet, nahezu identisch. Dagegen wichen die Ergebnisse der nichtlinearen Interpolation mit Graph Pad Prism und der linearen Regression mit Microsoft Excel teilweise sehr stark (um bis zu 77 %) voneinander ab. Da die durch Regressionsanalyse und nichtlineare Interpolation mit dem Software-Programm Graph Pad Prism 4 ermittelten Hemmkonzentrationen sehr ähnlich waren, wurden für alle getesteten Zellen die Hemmkonzentrationen der verschiedenen Substanzen durch nichtlineare Interpolation mit Graph Pad Prism basierend auf dem ATP-Gehalt bestimmt (Tab. 19).

Tab. 19: Hemmkonzentrationen der getesteten Substanzen

Inhibitor	Konzentration	IC	MDA-MB 468	MDA-MB 231	23132/87	Fibroblasten	Leukozyten	HUVEC	Keratinocyten
2-DG	mM	50	67,76	87,30	29,65	34,43	20,37	12,59	15,28
		75							
3-BrPA	mM	50	0,83	2,23	1,50	0,74	0,49	0,73	0,68
		75							
Iodoacetat	µM	50	5,66	8,22	12,85	nb	5,36	4,33	6,58
		75							
NaF	mM	25	2,31	2,30	1,53	1,27	2,72	1,30	2,54
		50	4,81		3,61	1,97			
		75	8,58 ^{a)}		8,51	6,67			
Oxamat	mM	50	88,92	49,20	75,33	15,67	59,70	18,54	51,88
		10	1,83	6,87	70,00	2810 ^{a)}	20,00	800 ^{a)}	2,21
Rotenon	nM	50	0,05						0,0066
	µM	25	6,22 ^{a)}	34,36	35,68 ^{a)}	11,05	8,30	22,44	nb
2,4-Dinitrophenol	mM	10	103,04	148,59	42,76	156,68	159,96	128,82	38,11
		25							
		50							
Rhodamin 123	µM	25	1,14	20,61	8,71	7,08	9,12	17,30	0,66
		50	6,43						1,33
NaDCA	mM	50	23,55	56,54 ^{a)}	99,08	47,75	96,61	53,09 ^{a)}	75,34
		50	82,04	55,34	89,54	29,31	48,08	13,80	35,40
DON	µM	10	53,70	8,26	nb	9,46	nb	nb	11,67
		25		191,43		390,84			
		50							
Metformin	mM	10	0,36	3,38 ^{a)}	0,62	4,06	nb	nb	0,63
Perifosin	µM	50	56,23	254,68	81,66	68,39	78,89	28,44	8,85
		50	8,93	66,68	32,00	25,47	41,11	5,18	2,11

Tab. 19: Berechnung der Hemmkonzentration der getesteten Substanzen. Angeben ist die inhibitorische Konzentration (IC) für die jeweiligen Substanzen. Die IC wurde anhand des ATP-Gehaltes durch nichtlineare Interpolation mit GraphPad Prism berechnet. a) IC wurde anhand der Dosis-Wirkungskurve abgeschätzt, da keine Interpolation möglich war. nb: IC war nicht bestimmbar.

4.6 Quantifizierung der Milchsäureproduktion von malignen und benignen Zellen im Zellkulturüberstand nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen

Eine Besonderheit des Tumorstoffwechsels ist die gesteigerte Glykolyserate mit folgender Milchsäuregärung, die mit einer erhöhten Produktion von Milchsäure (Laktat) einhergeht. Die gesteigerte Laktatbildung stellt einen prognostisch ungünstigen Faktor dar.

Abb. 48 zeigt die Milchsäureproduktion von jeweils 10.000 unbehandelten Zellen nach 48 Std. Kultur in Medium. Hierbei fiel auf, dass die Milchsäureproduktion der beiden benignen Zelltypen Fibroblasten und Keratinozyten signifikant höher war als die der Magenkarzinomzellelinie 23132/87, welche die höchste Milchsäurebildung unter den malignen Zellen aufwies. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass beide Zelltypen an das hypoxische Milieu ihres Ursprunggewebes, aus dem sie isoliert wurden, adaptiert sind und dieser Stoffwechselphänotyp auch unter normoxischen Kulturbedingungen beibehalten wird. Leukozyten aus dem sehr sauerstoffreichen Blut produzieren im Gegensatz hierzu relativ wenig Milchsäure.

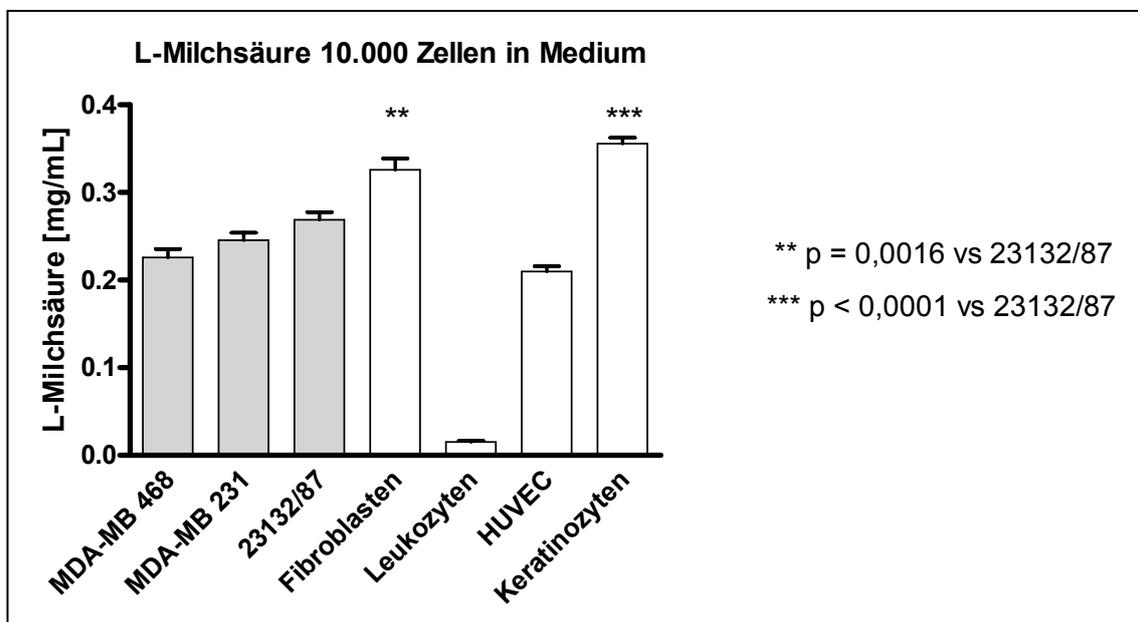


Abb. 48: Milchsäureproduktion von malignen und benignen Zellen.

Im Zellkulturüberstand wurde die Menge produzierter Milchsäure nach 48 Std. Kultur bestimmt und auf 10.000 Zellen umgerechnet. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung aus allen durchgeführten Experimenten. Der Unterschied in der Produktion von Milchsäure zwischen der Magenkarzinomlinie 23132/87 und Fibroblasten bzw. Keratinozyten war signifikant (t-Test, GraphPad Prism 4).

4.6.1 Glykolyseinhibitoren

Durch 100 mM **2-DG** wurden sowohl Tumorzellen als auch die benignen glykolytischen Zellen in ihrer Milchsäureproduktion gehemmt (Abb. 49 A). Der Hexokinaseinhibitor **3-BrPA** zeigte keine selektive Hemmung der Milchsäureproduktion der glykolytischen Zellen. Die Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 und die Magenkarzinomzelllinie 23132/87 wurden durch 1,25 mM 3-BrPA nur wenig in ihrer Milchsäureproduktion gehemmt (Abb. 49 B). In den Magenkarzinomzellen 23132/87 wurde die Glykolyse durch 12,5 µM **Iodoacetat** nur wenig gehemmt (Abb. 49 C). Eine 30 - 40 %ige Reduktion der Milchsäureproduktion in malignen und benignen Zellen wurde durch die Behandlung der Zellen mit 5 mM des Enolaseinhibitors **NaF** (Abb. 49 D) ebenso wie durch die Inhibition der LDH durch 100 mM **Oxamat** erreicht (Abb. 49 E). Leukozyten zeigten bei allen Glykolyseinhibitoren die geringste Veränderung der Milchsäureproduktion, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, was eventuell an der niedrigen allgemeinen Glykolyserate liegt.

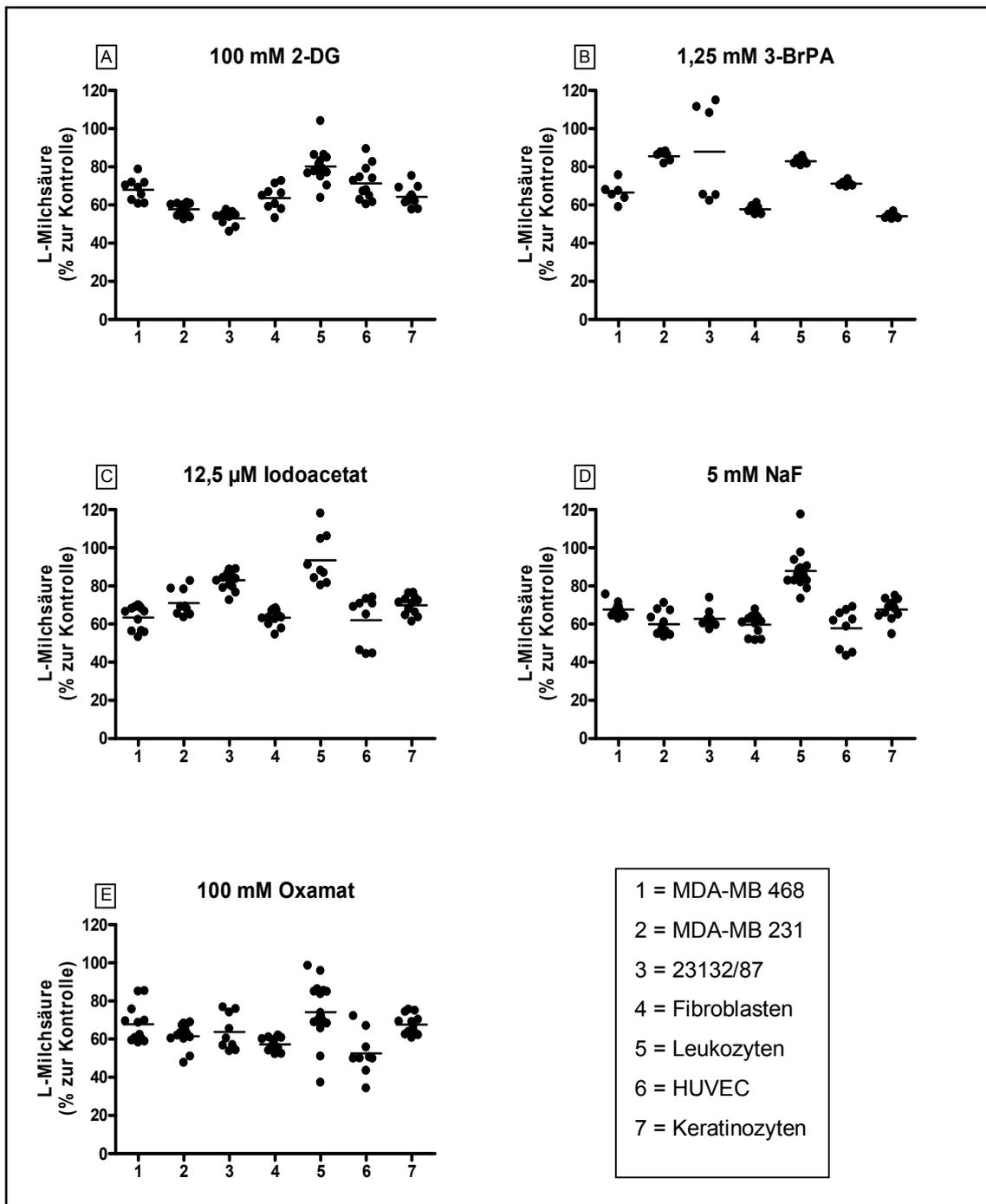


Abb. 49: Einfluss von Glykolyseinhibitoren auf die Milchsäureproduktion maligner und benigner Zellen.

Im Zellkulturüberstand wurde die Menge produzierter Milchsäure maligner und benigner Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit den Glykolyseinhibitoren bestimmt. Die relative Menge produzierter Milchsäure wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte und Einzelwerte von mindestens drei Dreifachbestimmungen ($n \geq 3$), für 3-BrPA $n = 2$.

4.6.2 Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen

Auf Substanzen, welche die mitochondriale Atmung beeinflussen reagierten alle Tumorzellen mit einer gesteigerten Milchsäureproduktion. Daraus lässt sich schließen, dass die Mitochondrien dieser Tumorzellen noch funktionsfähig sind und Tumorzellen einen Ausfall der oxidativen Phosphorylierung sehr gut kompensieren können. Die Tumorzellen sind also in der Lage ihre Energie sowohl über die oxidative Phosphorylierung als auch über die Glykolyse zu gewinnen. Auch benigne Zellen zeigten nach Behandlung mit dem Komplex I-Inhibitor **Rotenon** (Abb. 50 A) und den beiden Entkopplern **2,4-DNP** (Abb. 50 C) und **Rhodamin 123** (Abb. 50 D) eine deutlich gesteigerte Glykolyserate. In Keratinozyten war die Produktion von Milchsäure nach Behandlung mit 2,4-DNP nahezu unverändert, im Vergleich zur Kontrolle (Abb 50 C). Die Hemmung der ATP-Synthase durch 25 μ M **Oligomycin** bewirkte in gesunden Zellen keine Steigerung der Milchsäureproduktion, sehr wohl aber in allen Tumorzellen (Abb. 50 B). Die Inhibition der PDK durch **NaDCA** sollte laut Literatur die Oxidation von Glucose in Tumorzellen stimulieren und somit eine verringerte Milchsäureproduktion bewirken (Bonnet et al. 2007). In MDA-MB 231 und 23132/87 wurde die Milchsäureproduktion durch 100 mM NaDCA am stärksten gehemmt. Auch in den beiden glykolytischen benignen Zelltypen Fibroblasten und Keratinozyten war die Produktion von Milchsäure erniedrigt. Ebenso war in den nicht-glykolytischen HUVEC die Milchsäureproduktion deutlich vermindert, wohingegen Leukozyten nicht beeinflusst waren (Abb. 50 E).

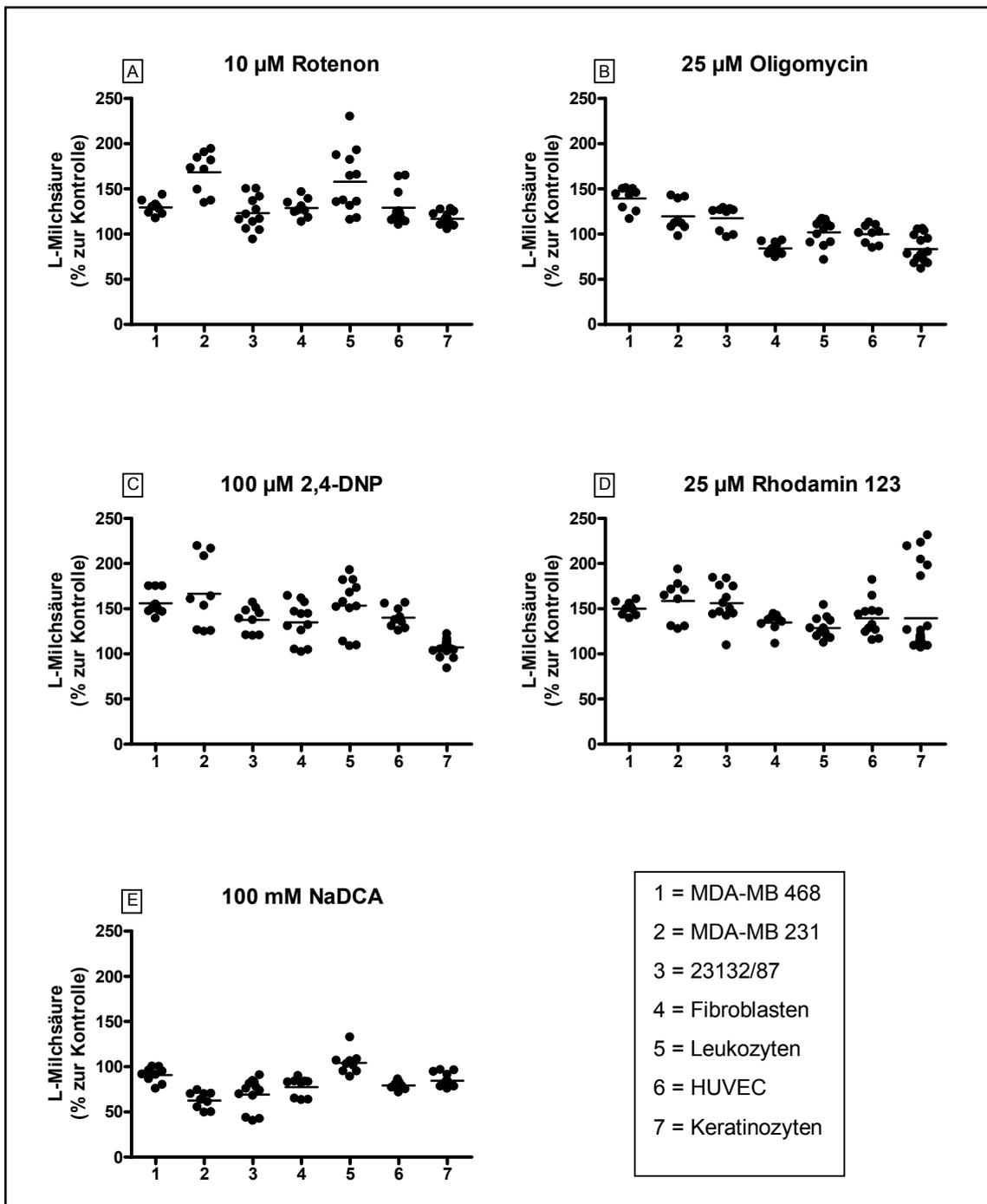


Abb. 50: Einfluss von Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen, auf die Milchsäureproduktion maligner und benigner Zellen.

Im Zellkulturüberstand wurde die Menge produzierter Milchsäure maligner und benigner Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit den Substanzen bestimmt. Die relative Menge produzierter Milchsäure wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte und Einzelwerte von mindestens drei Dreifachbestimmungen ($n \geq 3$).

4.6.3 Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen

Der Transketolaseinhibitor **Oxythiamin** führte bei den Tumorzellen nur in den Magenkarzinomzellen zu einer deutlichen Hemmung der Milchsäureproduktion. Möglicherweise ist die Energiegewinnung über den Pentosephosphatweg in diesen Zellen sehr ausgeprägt und kann nicht durch eine gesteigerte Glykolyse kompensiert werden (Abb. 51 A). Für das Glutaminanalagon **DON** deutete sich eine selektive Hemmung der Milchsäureproduktion in Tumorzellen an (Abb. 51 B). Das Antidiabetikum **Metformin** führte in allen Zellen zu einer deutlich gesteigerten Glykolyserate, wobei der Effekt in Tumorzellen am stärksten war (Abb. 51 C). **Perifosin** führte in Keratinozyten zur stärksten Hemmung der Glykolyse. Auf die Milchsäureproduktion in Tumorzellen hatte der Akt-Inhibitor keinen nennenswerten Einfluss (Abb. 51 D).

Sorafenib bewirkte in allen Tumorzelllinien eine Steigerung der Milchsäureproduktion. In Leukozyten war die Steigerung der Milchsäurebildung nach Behandlung mit Sorafenib am stärksten ausgeprägt. In den anderen getesteten benignen Zellen war die Produktion der Milchsäure durch Sorafenib kaum verändert (Abb. 51 E).

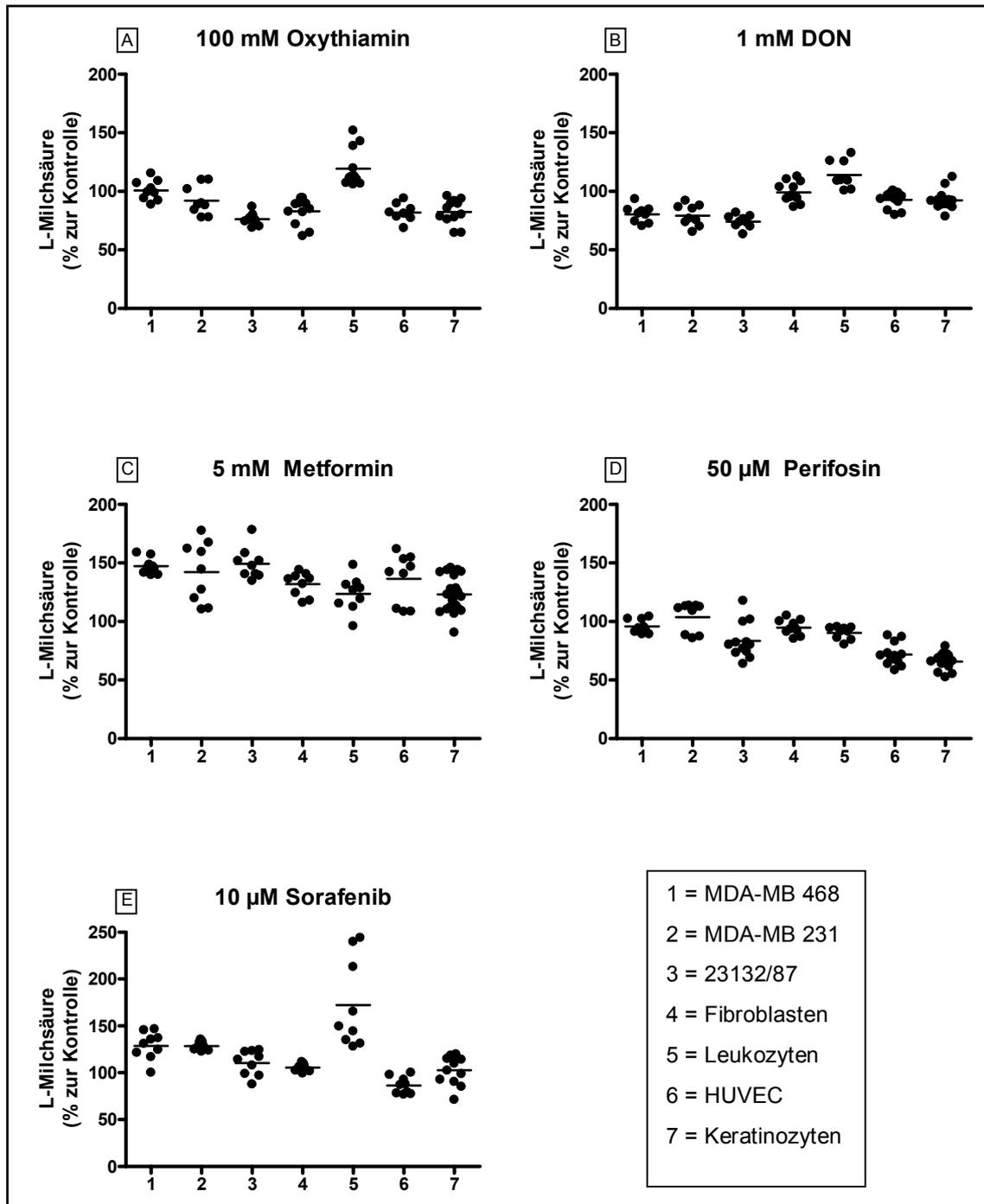


Abb. 51: Einfluss von Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsel von Tumorzellen eingreifen, auf die Milchsäureproduktion maligner und benigner Zellen.

Im Zellkulturüberstand wurde die Menge produzierter Milchsäure maligner und benigner Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit den Substanzen bestimmt. Die relative Menge produzierter Milchsäure wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte und Einzelwerte von mindestens drei Dreifachbestimmungen ($n \geq 3$).

4.7 Einfluss der Kombination von Substanzen auf ATP-Gehalt und Milchsäureproduktion maligner und benigner Zellen

Die Einzelbehandlung von Tumorzellen mit Glykolyseinhibitoren und Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen, ergab keine tumorselektive Wirkung. Sehr hohe Substanzkonzentrationen waren notwendig, um den ATP-Gehalt in Tumorzellen drastisch zu senken. Diese hohen Konzentrationen waren für die benignen Zellen deutlich toxischer. Daher war die Überlegung durch die kombinierte Manipulation zweier Stoffwechselwege mit niedrig dosierten Substanzen einen tumorselektiven Effekt zu erzielen und dies bei geringerer Toxizität gegenüber benignen Zellen. Die Tumorzellen wurden daher gleichzeitig mit Substanzen der Gruppe 1 (Glykolyseinhibitoren) in Kombination mit Substanzen der Gruppe 2 (Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen) behandelt.

Substanz 1:

Angriffspunkt der ersten Substanz war der mitochondriale Stoffwechsel. Hierfür wurden Substanzen mit gegensätzlichen Wirkungsweisen auf die Mitochondrien ausgewählt.

1. **NaDCA**, ein Pyruvatanalogon und Inhibitor der Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK), bewirkt eine gesteigerte Aktivität der Pyruvatdehydrogenase (PDH). Durch die PDH wird der mitochondriale Pyruvatverbrauch gesteigert wodurch weniger Substrat für die Glykolyse zur Verfügung steht. In den untersuchten Zellen zeigte sich hier in der Tat eine verminderte Milchsäureproduktion.
2. **Rotenon** als Entkoppler des elektrochemischen Gradienten unterbindet die oxidative Energiegewinnung und steigerte die Milchsäureproduktion in allen untersuchten Zellen. Dadurch wird eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber Glykolyseinhibitoren, z. B. 2-DG erwartet.

Substanz 2:

Die zweite Substanz blockierte die Glykolyse entweder gleich zu Beginn (**2-DG**) oder gegen Ende (**Oxamat**) oder den Pentosephosphatweg (PPW) (**Oxythiamin**).

Die einzusetzende Konzentration des zweiten Inhibitors wurde individuell für jede Zellart anhand vorangegangener Experimente abgeschätzt. Tabelle 20 zeigt die

Konzentrationen der verwendeten Substanzen. NaDCA bzw. Rotenon wurden jeweils mit 2-DG, mit Oxamat und mit Oxythiamin kombiniert. Die Zellen wurden für 24 Std. mit den einzelnen Substanzen oder der Kombination zweier Substanzen inkubiert. Anschließend wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt und Milchsäure im Zellkulturüberstand bestimmt.

Die Konzentrationen wurden zellspezifisch so gewählt, dass durch die alleinige Behandlung mit Substanz 1 der ATP-Gehalt der Zellen nicht unter 70 % im Vergleich zur Kontrolle fiel und für Substanz 2 auf etwa 50 %.

Tab. 20: Kombinationen verschiedener Substanzen.

Zellart	Konz. 2-DG	Konz. Oxamat	Konz. Oxythiamin	Konz. NaDCA	Konz. Rotenon
MDA-MB 468	50 mM	50 mM	50 mM	10 mM	0,001 µM
MDA-MB 231	100 mM	50 mM	50 mM	25 mM	0,001 µM
23132/87	20 mM	50 mM	100 mM	40 mM	0,1 µM
Fibroblasten	40 mM	10 mM	40 mM	25 mM	0,1 µM
Leukozyten	20 mM	50 mM	40 mM	40 mM	0,1 µM
HUVEC	4 mM	10 mM	20 mM	25 mM	0,1 µM
Keratinocyten	10 mM	50 mM	50 mM	25 mM	0,01 µM

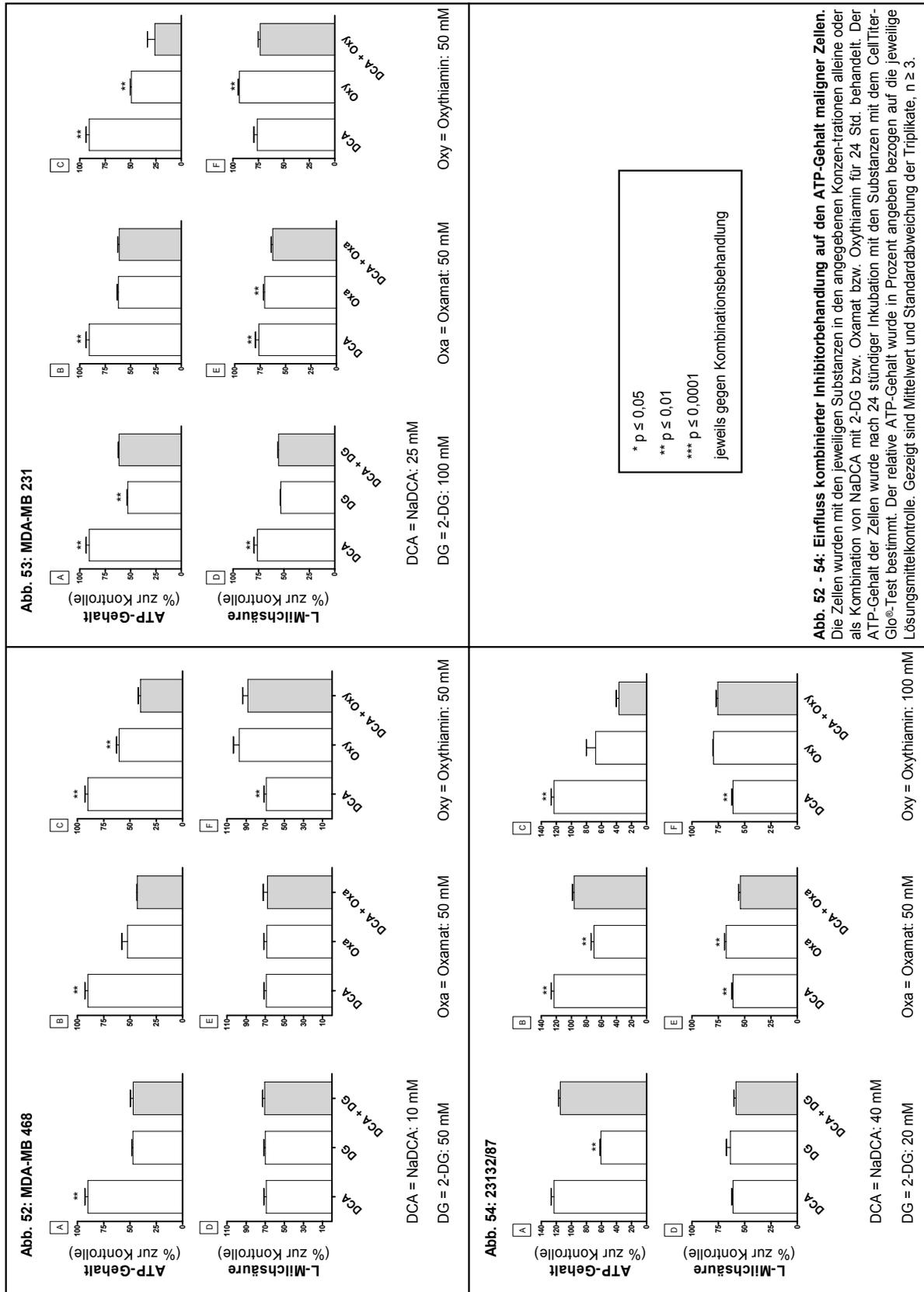
Aufgeführt sind die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen spezifisch für die jeweilige Zelllinie. Kombiniert wurde NaDCA mit 2-DG bzw. Oxamat bzw. Oxythiamin und Rotenon mit 2-DG bzw. Oxamat bzw. Oxythiamin.

4.7.1 Kombinationen mit NaDCA

Für MDA-MB 468 ergab sich für die Kombination NaDCA/2-DG kein kumulativer Effekt bzgl. des ATP-Gehaltes (Abb. 52 A). Bei Oxamat (Abb. 52 B) und Oxythiamin (Abb. 52 C) führte die Kombination mit NaDCA zu einem niedrigeren ATP-Gehalt gegenüber der Einzelbehandlung, der aber nur für Oxythiamin statistisch signifikant war. NaDCA reduzierte in diesen Zellen die Milchsäureproduktion um etwa 30 %. Die kombinierte Behandlung von NaDCA mit Oxythiamin führte zu einer signifikant höheren Milchsäurebildung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit NaDCA (Abb. 52 F).

Bei MDA-MB 231 bewirkte NaDCA einen antagonistischen Effekt zu 2-DG. Der ATP-Gehalt der Kombination 25 mM NaDCA/100 mM 2-DG war signifikant höher als nach als nach alleiniger Behandlung mit 100 mM 2-DG (Abb. 53 A). Die Menge an produzierter Milchsäure wurde durch die kombinierte Behandlung nicht weiter reduziert als durch alleinige 2-DG-Behandlung (Abb. 53 D). NaDCA in Kombination mit Oxamat ergab auf ATP-Niveau keinen Synergismus (Abb. 53 B), jedoch für die Milchsäureproduktion, welche geringer ausfiel als mit Oxamat alleine (Abb. 53 E). Für NaDCA/Oxythiamin ergab sich ein deutlich kumulativer Effekt auf den ATP-Gehalt (Abb. 53 C). Bei dieser Kombination war der Gehalt an Milchsäure im Zellkulturüberstand signifikant geringer als nach alleiniger Behandlung mit Oxythiamin (Abb. 53 F).

In der Magenkarzinomlinie 23132/87 bewirkte NaDCA eine Aufhebung der Wirkung der beiden Glykolysehemmer 2-DG (Abb. 54 A) und Oxamat (Abb. 54 B). Der ATP-Gehalt war nach Inkubation mit der jeweiligen Einzelsubstanz signifikant geringer als nach kombinierter Behandlung. Für die Milchsäurebildung hingegen ergab sich ein synergistischer Effekt. Durch NaDCA/Oxamat war diese signifikant geringer gegenüber der Einzelbehandlung (Abb. 54 E). Lediglich bei 100 mM Oxythiamin kam es durch NaDCA zu einem kumulativen, jedoch nicht signifikanten Effekt auf ATP-Niveau (Abb. 54 C). Oxythiamin hob die hemmende Wirkung von NaDCA auf die Milchsäureproduktion auf (Abb. 54 F).

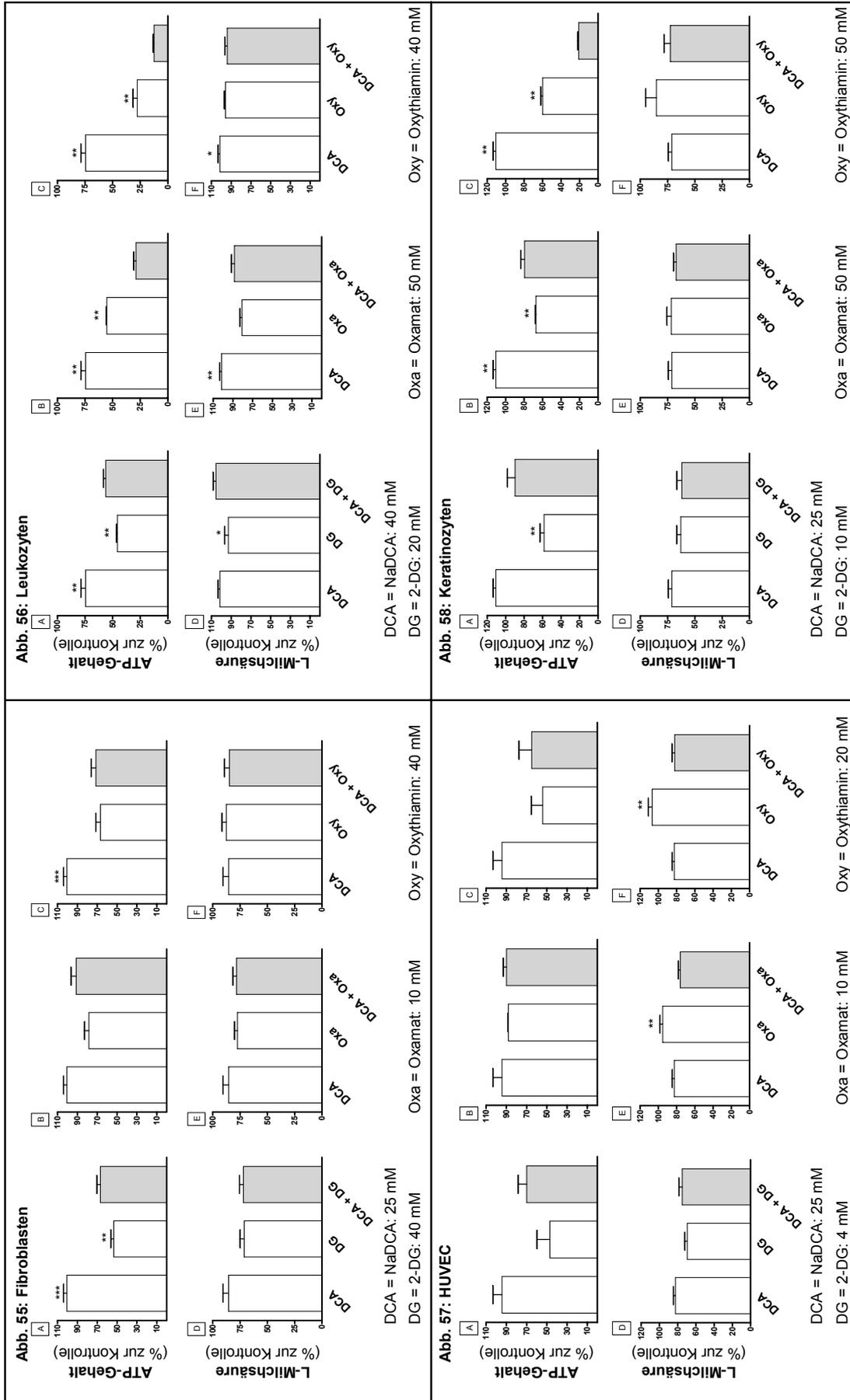


Auch in Fibroblasten kam es durch NaDCA zu einem antagonistischen Effekt bzgl. des ATP-Gehaltes gegenüber den Glykolyse- bzw. PPW-Inhibitoren, der jedoch nur für 2-DG (Abb. 55 A) signifikant war. Auf die Bildung von Milchsäure hatte die kombinierte Behandlung im Vergleich zur Einzelbehandlung keinen Einfluss (Abb. 55 D - F).

Bei Leukozyten kam es durch die Kombinationen von NaDCA/Oxamat und NaDCA/Oxythiamin zu einer signifikanten Reduktion des ATP-Gehaltes (Abb. 56 B und C) im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung. Auch die Bildung an Milchsäure (Abb. 56 E und F) war durch die kombinierte Behandlung signifikant geringer gegenüber der alleinigen Inkubation mit NaDCA. Überraschend war der antagonistische Effekt von NaDCA gegenüber 2-DG auf den ATP-Gehalt (Abb. 56 A) und die Milchsäurebildung (Abb. 56 D).

Für HUVEC konnte auf ATP-Niveau überwiegend nur ein tendenzieller jedoch nicht signifikanter Antagonismus von NaDCA und 2-DG im Vergleich zur Einzelbehandlung beobachtet werden (Abb. 57 A - C). Statistisch signifikant waren nur die Kombinationen NaDCA/Oxamat (Abb. 57 E) und NaDCA/Oxythiamin (Abb. 57 F) bzgl. der Milchsäureproduktion gegenüber der Behandlung mit Oxamat bzw. Oxythiamin alleine.

In Keratinozyten war ebenfalls die Tendenz zu beobachten, dass NaDCA die Wirkung von 2-DG (Abb. 58 A) und Oxamat (Abb. 58 B) auf ATP-Niveau antagonisierte. Nur durch Oxythiamin kam es zu einer kumulativen ATP-Reduktion (Abb. 58 C). Auf die Bildung von Milchsäure hatten die kombinierten Behandlung keine Auswirkungen (Abb 58 D - F).

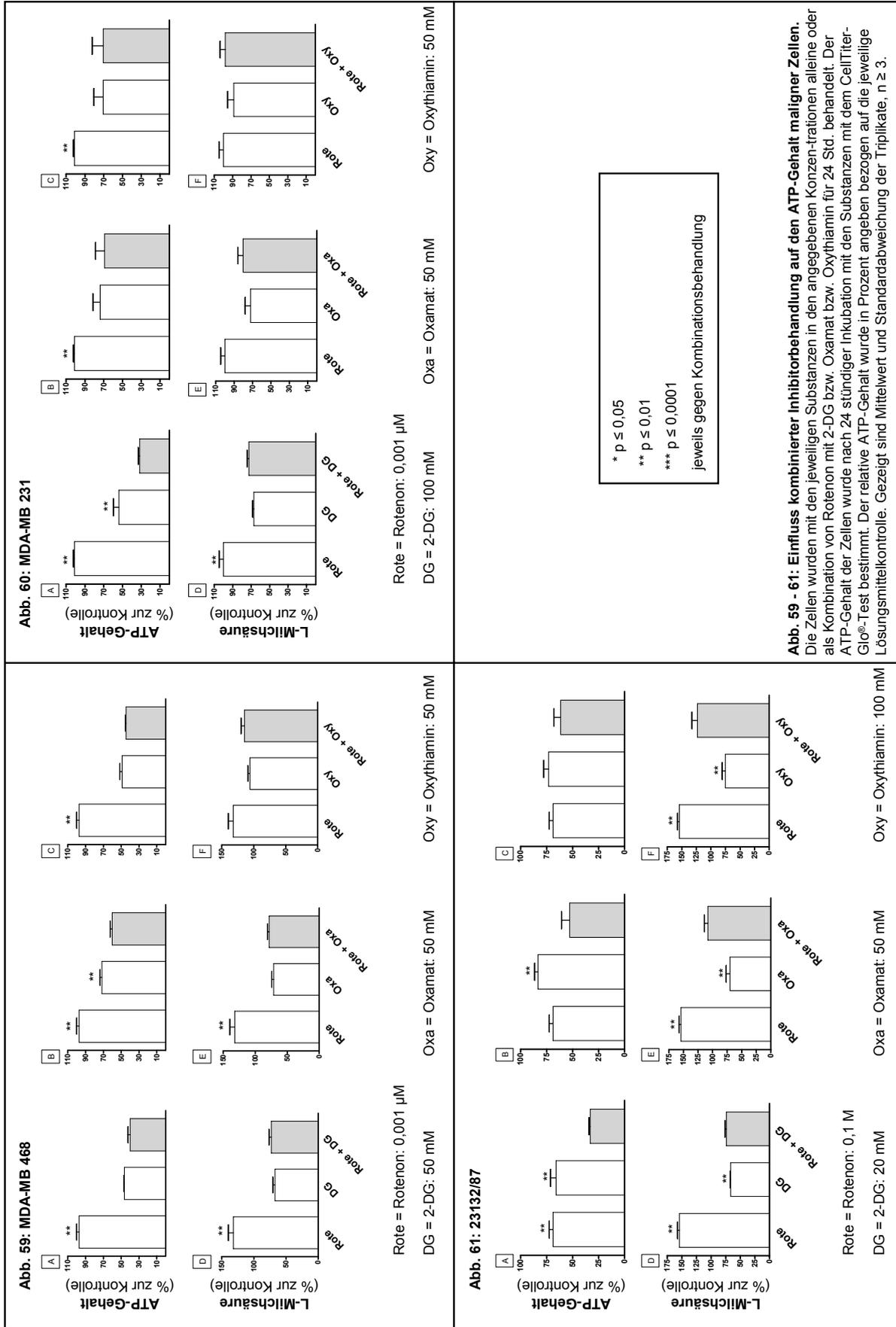


4.7.2 Kombinationen mit Rotenon

MDA-MB 468 zeigten durch die kombinierte Behandlung mit Rotenon/2-DG (Abb. 59 A) bzw. Rotenon/Oxythiamin (Abb. 59 C) keinen Synergismus bzgl. einer Verminderung des ATP-Gehalts. Die gesteigerte Milchsäurebildung durch die Behandlung mit Rotenon wurde durch die zusätzliche Inkubation mit 2-DG (Abb. 59 D) bzw. Oxamat (Abb. 59 E) signifikant vermindert. Der ATP-Gehalt der Zellen war durch Rotenon/Oxamat signifikant erniedrigt gegenüber der jeweiligen Einzelbehandlung (Abb. 59 B), lag aber immer noch bei 60 %.

Bei MDA-MB 231 führte die Entkopplung durch Rotenon nur in Kombination mit 100 mM 2-DG zu einer signifikanten Reduktion des ATP-Gehaltes auf 32 % (Abb. 60 A). Ebenso war die Milchsäureproduktion signifikant vermindert (Abb. 60 E).

Bei der Magenkarzinomlinie 23132/87 konnte durch Rotenon/2-DG ein synergistischer Effekt beobachtet werden und führte zu einer signifikanten ATP-Verminderung (Abb. 61 A). Auch die Bildung an Milchsäure war hierbei drastisch verringert (Abb. 61 D). Interessant war die Beobachtung, dass Rotenon/Oxamat zu keiner verstärkten ATP-Reduktion als durch alleinige Inkubation mit Rotenon führte. Jedoch steigerte Rotenon die Sensitivität gegenüber Oxamat (Abb. 61 B). Die Reduktion der Milchsäurebildung durch Oxamat (Abb. 61 E) und Oxythiamin (Abb. 61 F) wurde durch Rotenon aufgehoben.



In fast allen benignen Zellen wurde durch die Behandlung mit Rotenon eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Glykolyse- bzw. PPW-Inhibitoren beobachtet.

40 mM 2-DG führten in Kombination mit Rotenon in Fibroblasten zu einer nahezu vollständigen ATP-Depletion (Abb. 62 A). Auch in Kombination mit Oxamat (Abb. 62 B) bzw. Oxythiamin (Abb. 62 C) war die Verminderung des ATP-Gehaltes um etwa 40 % ebenfalls signifikant im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung. Die reduzierte Milchsäureproduktion nach Inkubation mit 2-DG wurde durch Rotenon tendenziell gesteigert (Abb. 62 D). In Kombination mit Oxamat bzw. Oxythiamin war die wieder angestiegene Bildung an Milchsäure signifikant (Abb. 62 E und F).

Leukozyten reagierten mit einer sehr deutlichen ATP-Reduktion durch die kombinierte Behandlung von Rotenon und den Glykolyeinhibitoren 2-DG (Abb. 63 A) und Oxamat (Abb. 63 B). Für Oxythiamin konnte kein synergistischer Effekt beobachtet werden (Abb. 63 C). Rotenon schien auch hier der hemmenden Wirkung der Glykolyse- bzw. PPW-Inhibitoren auf die Milchsäureproduktion tendenziell entgegenzuwirken (Abb. 63 D - F).

HUVEC waren ebenfalls anfälliger für 2-DG, Oxamat und Oxythiamin wenn die oxidative Phosphorylierung durch Rotenon ausgeschaltet war. Alle Kombinationen zeigten eine signifikante Minderung des ATP-Gehaltes (Abb. 64 A - C). Für 2-DG war der Effekt am deutlichsten (Abb. 64 A). Unter der kombinierten Behandlung produzierten die Zellen mehr Milchsäure als unter Einzelbehandlung mit 2-DG (Abb. 64 D) bzw. Oxamat (Abb. 64 E) bzw. Oxythiamin (Abb. 64 F).

Bei den Keratinozyten führte die Inhibition der mitochondrialen Atmung durch Rotenon abhängig von der Passage der Zellen zu gegensätzlichen Effekten. In einem von vier durchgeführten Experimenten führte die Behandlung mit 0,01 μ M Rotenon zu einer 90 %igen ATP-Depletion, in einem zu einer etwa 50 %igen Verminderung des ATP-Gehaltes. In zwei Experimenten war der ATP-Gehalt nur um etwa 4 - 9 % reduziert. Dieses große Varianz wurde auch bei den Versuchen beobachtet, in denen die Zellen mit Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung, als Einzelsubstanz behandelt wurden (s. Abschnitt 4.4.2). Durch Rotenon kam es bei den vier unabhängig durchgeführten Experimenten zwar immer zu einer vollständigen ATP-Depletion (Abb. 45 A), bei den Experimenten mit 2,4-DNP (Abb. 45 C) lag der ATP-Gehalt entweder bei etwa 80 % (in vier von neun Experimenten) oder 0 % und für Rhodamin 123 (Abb. 45 D) entweder etwa 70 % oder bei 0 %. Daher ist anzunehmen, dass die totale ATP-Depletion bei den vier Rotenon-

Versuchen ein Zufallsergebnis war. In allen Experimenten zeigte sich in der Kombination von Rotenon mit Glykolyse- bzw. PPW-Inhibitoren ein Synergismus und führte zu einer verstärkten ATP-Reduktion. Signifikant war dieser für die Kombination Rotenon/2-DG (Abb. 65 A) und Rotenon/Oxamat (Abb. 65 B). Für die Milchsäurebildung konnte kein synergistischer Effekt beobachtet werden (Abb. 65 D - F).

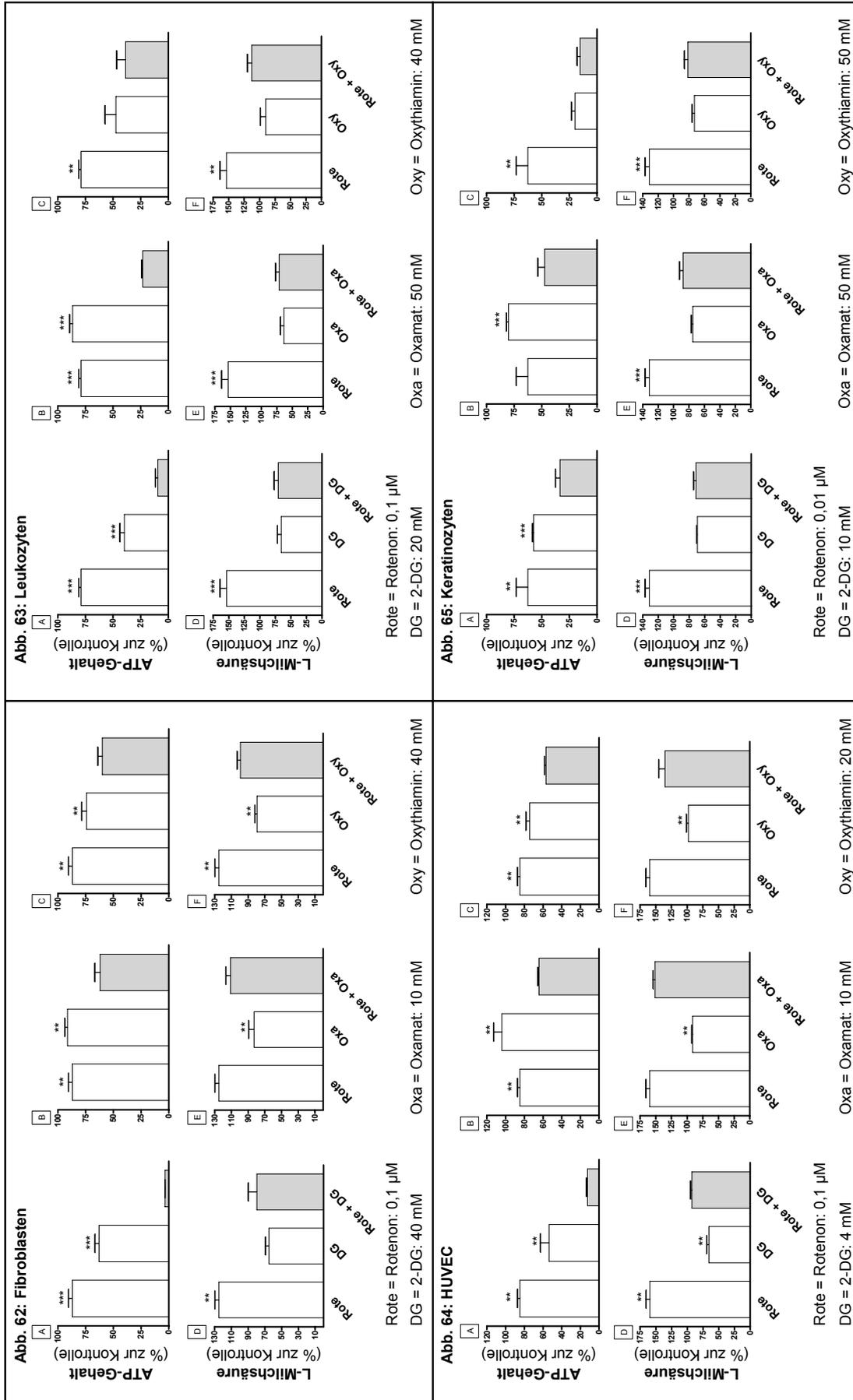


Abb. 62 - 66: Einfluss kombinierter Inhibitorbehandlung auf den ATP-Gehalt benignen Zellen. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen alleine oder als Kombination von Rotenon mit 2-DG bzw. Oxamat bzw. Oxythiamin für 24 Std. behandelt. Der ATP-Gehalt der Zellen wurde nach 24 stündiger Inkubation mit dem CellTiter-Glo®-Test bestimmt. Der relative ATP-Gehalt wurde in Prozent angegeben bezogen auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der Triplikate, n ≥ 3.
* p ≤ 0,05 ** p ≤ 0,01 *** p ≤ 0,0001 jeweils gegen Kombinationsbehandlung

4.8 Charakterisierung der verwendeten malignen und benignen Zellen

4.8.1 Quantifizierung der Glucoseaufnahme

Eine hohe Glykolyserate und die damit verbundene hohe Zuckeraufnahme ist keineswegs ein tumorspezifisches Merkmal. Alle Zellen mit einem hohen Energiebedarf nutzen sowohl die Glykolyse als auch die mitochondriale Atmung, um ATP zu generieren (Tennant et al. 2009).

Zur Charakterisierung des Stoffwechselprofils der getesteten malignen und benignen Zellen wurde die Glucoseaufnahme mittels FACS-Analyse quantifiziert. Für die Untersuchung der *in vitro*-Glucoseaufnahme in Tumorzellen und benignen Zellen wurden diese für 60 min. mit 0,05 mM des Glucosenalogons 2-NBDG inkubiert. Die aufgenommene Menge wurde im Durchflusszytometer quantifiziert. In Abb. 66 ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen dargestellt. Da es sich bei Leukozyten um eine heterogene Zellpopulation handelt wurde die Glucoseaufnahme jeweils separat für monozytäre Zellen und T-Zellen anhand eines definierten Auswertefensters analysiert.

Die einzelnen Tumorzelllinien unterschieden sich deutlich in ihrer Glucoseaufnahme, wobei die Magenkarzinomlinie die stärkste, MDA-MB 231 die geringste Fluoreszenzintensität aufwies. Ein signifikanter Unterschied war auch zwischen den beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231 festzustellen. Bei den benignen Zellen ergab sich ein sehr heterogenes Muster in der Zuckeraufnahme. Die Aufnahme von 2-NBDG war in Keratinozyten am geringsten und unterschied sich signifikant zu den Tumorzellen. In Fibroblasten und HUVEC war die Aufnahme sehr ähnlich. Die Glucoseaufnahme in Lymphozyten war im Mittel geringer als die in Monozyten, was mit den Daten aus der Literatur übereinstimmt (Maratou et al. 2007). Zusammenfassend zeigte sich kein eindeutiger Trend der malignen Zellen zu einer verstärkten Glucoseaufnahme im Vergleich zu den benignen Zellen. Werden als benigne Zellen nur HUVEC und Keratinozyten herangezogen, so zeigte sich eine deutlich höhere Zuckeraufnahme in Tumorzellen.

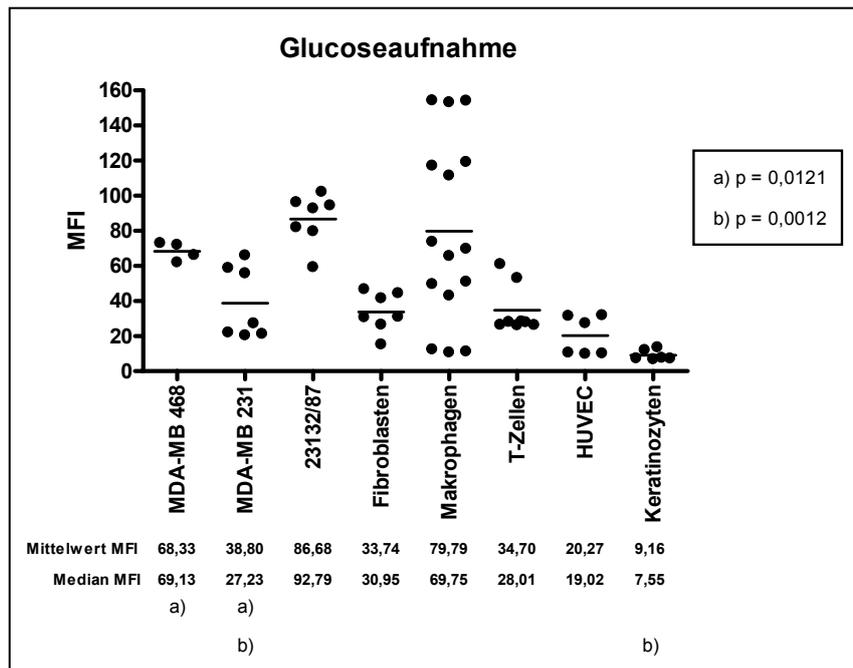


Abb. 66: Glucoseaufnahme maligner und benigner Zellen.

Die Zellen wurden für 60 min. mit dem fluoreszierenden Glucoseanalogon 2-NBDG inkubiert. Im Durchflusszytometer wurde die aufgenommene Menge quantifiziert. Gezeigt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) und die Einzelwerte von mindestens zwei Doppelbestimmungen ($n \geq 2$).

4.8.2 Immunhistochemische Charakterisierung

Wie in der Einleitung beschrieben, weisen Tumorzellen einige Besonderheiten in der Expression von Enzymen, Transportproteinen und Regulatoren des Stoffwechsels auf. Eine Auswahl dieser Proteine wurde immunhistochemisch in den verwendeten Tumorzellen und auch in benignen Zellen untersucht.

Immunhistochemischer Nachweis der Pyruvatkinasevariante M2-PK

In Abb. 67 ist die Färbung für M2-PK gezeigt. Sowohl Tumorzellen (Abb. 67 A-C) als auch alle normalen Zellen (Abb. 67 D-E) wiesen eine starke zytoplasmatische Färbung für M2-PK auf. Innerhalb der Leukozytenpopulation (Abb. 67 E) zeigten Lymphozyten (\rightarrow) und Monozyten (\rightarrow) eine zytoplasmatische Färbung. Die M2-PK-negativen Zellen waren wahrscheinlich T-Zellen.

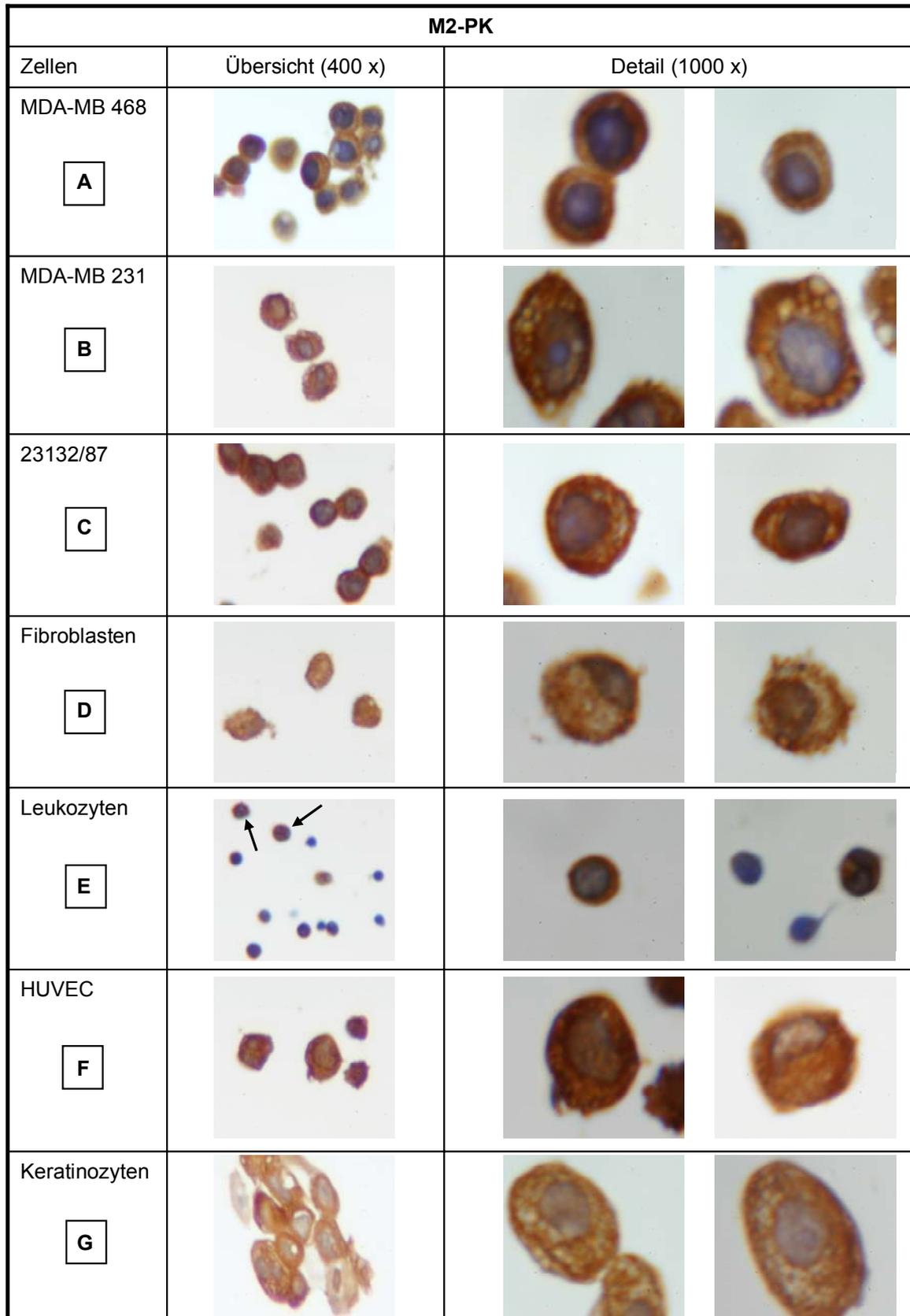


Abb. 67: Immunhistochemischer Nachweis von M2-PK in malignen und benignen Zellen.

Die Zellen wurden unter normoxischen Sauerstoffbedingungen kultiviert, geerntet und anschließend mit Formalin fixiert. Das Zellsediment wurde mit flüssiger Agarose vermischt und zum Aushärten in eine geeignete Form pipettiert. Der Agarosepfropf wurde der Routineeinbettung zugeführt. Es wurden Schnitte von 20 µm Dicke angefertigt und gefärbt.

Immunhistochemischer Nachweis von pAkt

Die beiden Brustkrebszelllinien zeigten eine starke nukleäre aber auch eine zytoplasmatische Färbung für pAkt (Abb. 68 A+B). Die Zellkerne der Magenkarzinomlinie wiesen ein inhomogenes Färbemuster auf. Im Zytoplasma war pAkt gleichmäßig angefärbt (Abb. 68 C). Das Zytoplasma der Fibroblasten (Abb. 68 D) färbte sich schwächer als in den Tumorzellen. Das Zytoplasma von Lymphozyten und Monozyten zeigte eine schwach positive Immunreaktion (Abb. 68 E). HUVEC wiesen eine ausgeprägte zytoplasmatische Immunreaktion für pAkt auf, die Färbung der Zellkerne war innerhalb der Zellpopulation unterschiedlich (Abb. 68 F). Einige Zellen wiesen eine sehr starke nukleäre Färbung auf (Abb. 68 F →), in anderen Zellen war der Zellkern schwächer und inhomogen angefärbt. Keratinozyten zeigten eine deutliche zytoplasmatische Immunreaktion (Abb. 68 G).

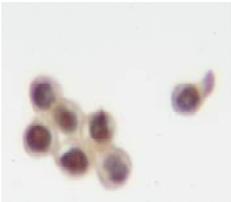
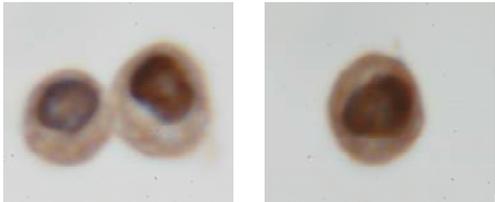
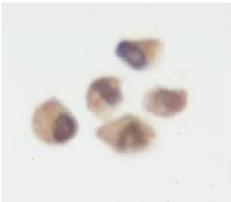
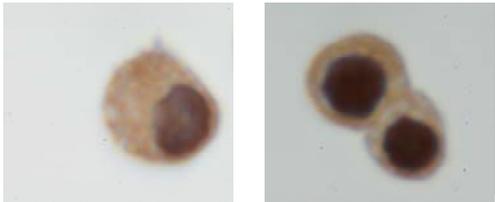
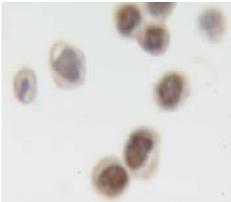
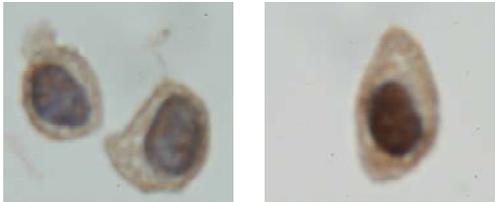
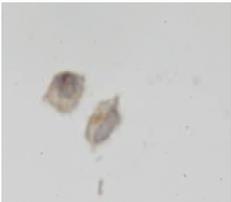
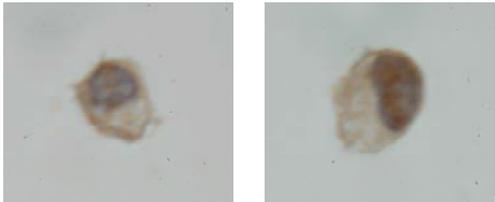
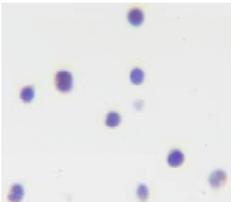
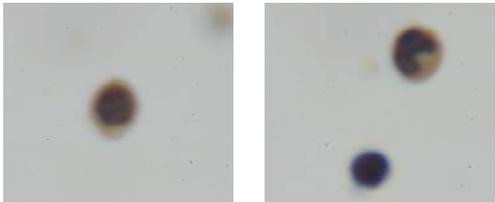
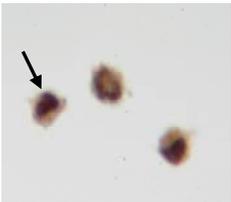
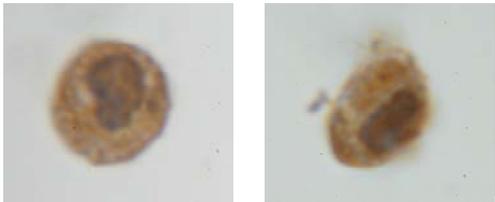
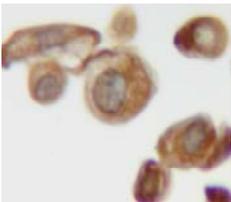
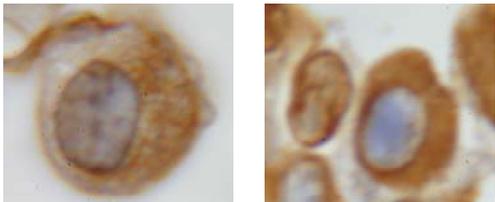
pAkt		
Zellen	Übersicht (400 x)	Detail (1000 x)
MDA-MB 468 A		
MDA-MB 231 B		
23132/87 C		
Fibroblasten D		
Leukozyten E		
HUVEC F		
Keratinocyten G		

Abb. 68: Immunhistochemischer Nachweis von pAkt in malignen und benignen Zellen.
Die Zellen wurden wie in Abb. 67 beschrieben behandelt und gefärbt.

Immunhistochemischer Nachweis von GLUT-1

Bei der Brustkrebszelllinie MDA-MB 468 war der Glucosetransporter GLUT-1 deutlich an der Zellmembran lokalisiert. Vereinzelt wurden auch Zellen mit einer zytoplasmatischen Lokalisation gefunden (Abb. 69 A). MDA-MB 231 (Abb. 69 B) und 23132/87 (Abb. 69 C) wiesen eine heterogene Immunreaktion für GLUT-1 auf, welcher sowohl zytoplasmatisch als auch membranständig detektiert wurde. In Fibroblasten konnte GLUT-1 nicht nachgewiesen werden (Abb. 69 D). Lymphozyten und Monozyten zeigten nur eine sehr schwache zytoplasmatische Immunreaktion (Abb. 69 E). In HUVEC wurde eine inhomogene und oft eine polarisierte Verteilung des Glucosetransporters im Zytoplasma detektiert (Abb. 69 F). Keratinozyten wiesen eine zytoplasmatische aber vor allem eine membranständige Färbung für GLUT-1 auf (Abb. 69 G).

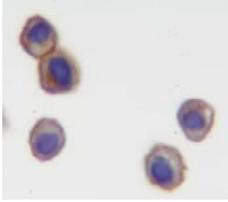
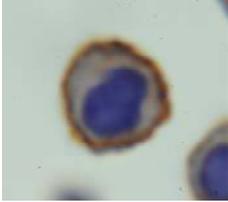
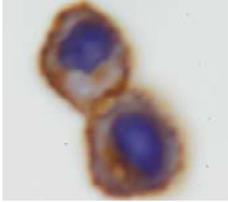
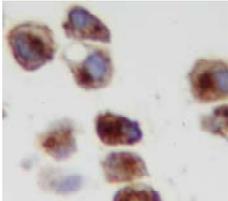
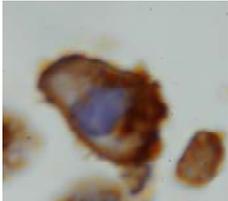
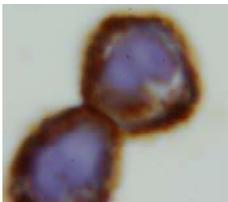
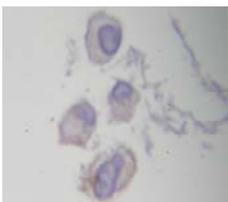
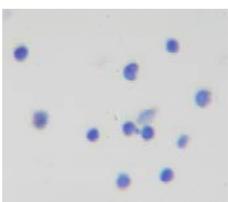
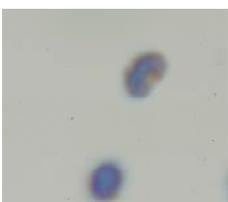
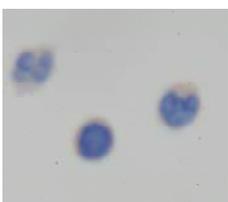
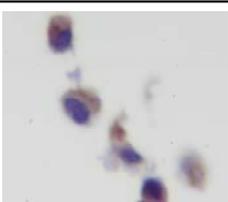
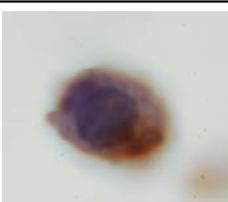
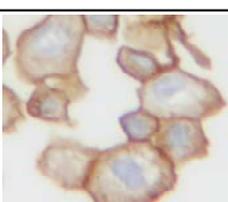
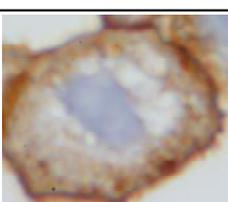
GLUT-1			
Zellen	Übersicht (400 x)	Detail (1000 x)	
MDA-MB 468 A			
MDA-MB 231 B			
23132/87 C			
Fibroblasten D			
Leukozyten E			
HUVEC F			
Keratinocyten G			

Abb. 69: Immunhistochemischer Nachweis von GLUT-1 in malignen und benignen Zellen.
Die Zellen wurden wie in Abb. 67 beschrieben behandelt und gefärbt.

Immunhistochemischer Nachweis von MCT-1

Alle Tumorzellen zeigten eine sehr starke nukleäre Immunreaktion gegen den MCT-1 Antikörper. Benigne Zellen wiesen keine nukleäre Färbung auf. In der Brustkrebslinie MDA-MB 468 (Abb. 70 A) und der Magenkarzinomlinie 23132/87 (Abb. 70 C) war der Monocarboxylattransporter 1 zytoplasmatisch, nukleär und auch membranständig lokalisiert. In MDA-MB 231 (Abb. 70 B) wurde MCT-1 im Zytoplasma und im Zellkern detektiert. Fibroblasten (Abb. 70 D) und Keratinozyten (Abb. 70 G) zeigten eine deutliche membranständige aber auch zytoplasmatische Immunreaktion. In Lymphozyten und Monozyten war das Zytoplasma schwach angefärbt (Abb. 70 E). In HUVEC war der Transporter vor allem im Zytoplasma lokalisiert, vereinzelt auch an der Zellmembran (Abb. 70 F).

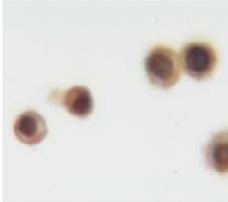
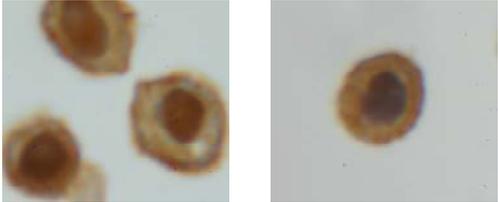
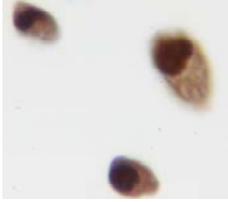
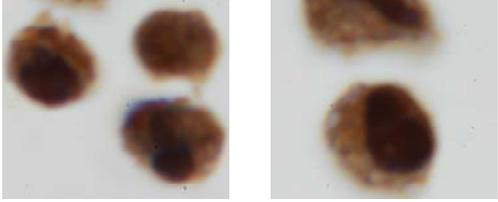
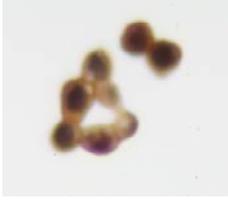
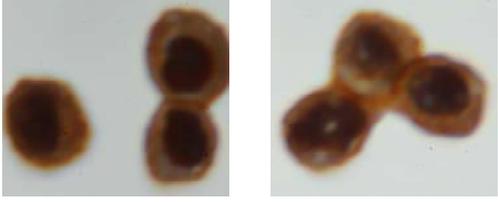
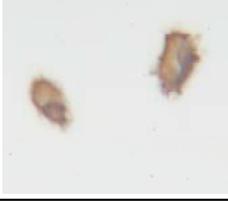
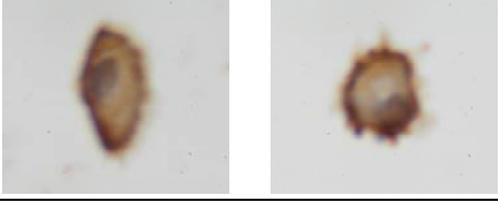
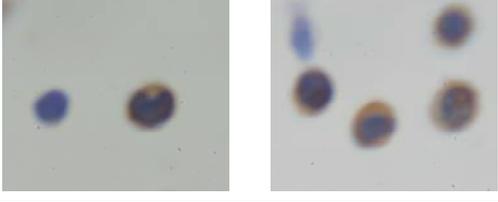
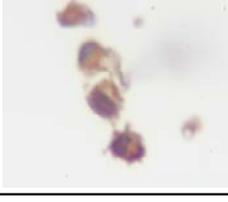
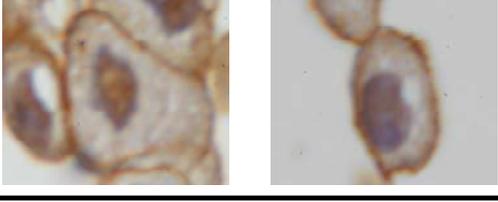
MCT-1		
Zellen	Übersicht (400 x)	Detail (1000 x)
MDA-MB 468 A		
MDA-MB 231 B		
23132/87 C		
Fibroblasten D		
Leukozyten E		
HUVEC F		
Keratinocyten G		

Abb. 70: Immunhistochemischer Nachweis von MCT-1 in malignen und benignen Zellen.
Die Zellen wurden wie in Abb. 67 beschrieben behandelt und gefärbt.

Immunhistochemischer Nachweis von HIF1- α

In allen Tumorzellen aber auch in Keratinozyten konnte eine sehr starke nukleäre Immunreaktion für HIF-1 α nachgewiesen werden. Sowohl alle drei Tumorzelllinien (Abb. 71 A-C) als auch Keratinozyten (Abb. 71 G), Lymphozyten und Monozyten (Abb. 71 E) zeigten eine ausgeprägte zytoplasmatische Färbung. Fibroblasten (Abb. 71 D) und HUVEC (Abb. 71 F) wiesen zwar eine deutliche aber im Verhältnis zu den übrigen Zellen schwächere Färbung von Zytoplasma und Zellkern auf.

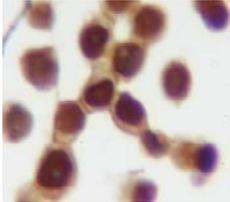
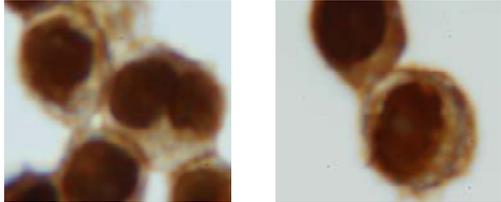
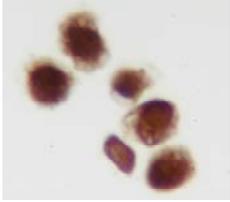
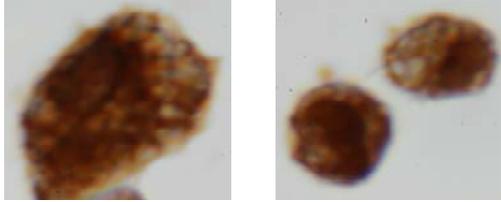
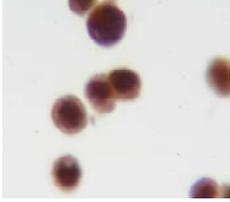
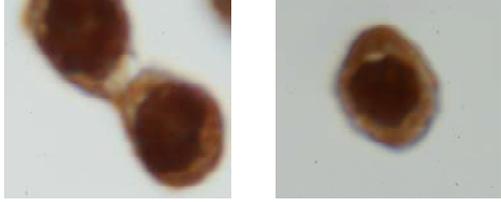
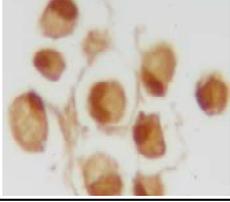
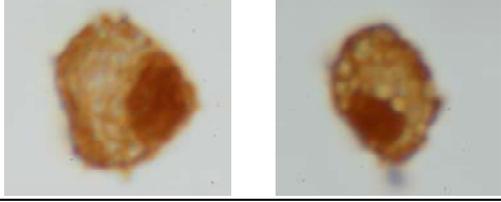
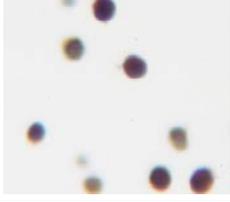
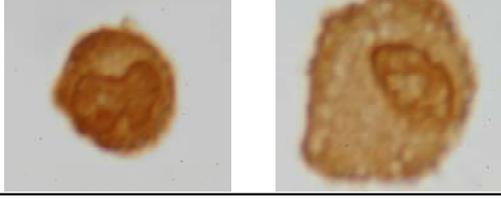
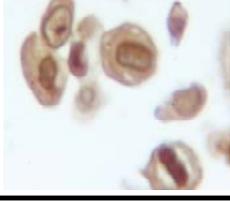
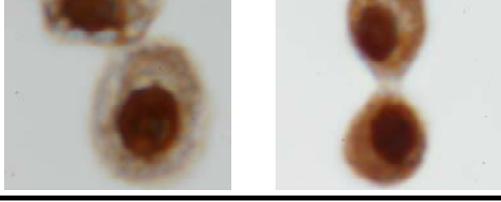
HIF-1 α		
Zellen	Übersicht (400 x)	Detail (1000 x)
MDA-MB 468 A		
MDA-MB 231 B		
23132/87 C		
Fibroblasten D		
Leukozyten E		
HUVEC F		
Keratinocyten G		

Abb. 71: Immunhistochemischer Nachweis von HIF-1 α in malignen und benignen Zellen.
Die Zellen wurden wie in Abb. 67 beschrieben behandelt und gefärbt.

4.8.3 Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren HIF, Glucosetransporter und Glyoxalasen

Für alle vorangegangenen *in vitro*-Untersuchungen wurden die Zellen unter normalen Raum-Sauerstoffbedingungen kultiviert, die sich von dem Tumormilieu im Menschen stark unterscheiden. Dies entspricht der üblichen Testung in den Literaturstellen und wurde zum Zweck der Vergleichbarkeit hier ebenso gehandhabt. Um bessere Aussagen über eine mögliche Wirkung der Testsubstanzen in der *in vivo*-Situation zu bekommen, sollten die Zelltypen auch unter hypoxischen Bedingungen analysiert werden. Daher wurde untersucht, ob sich die Expression von einigen relevanten Genen, die in den glykolytischen Stoffwechsel involviert sind, unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ändert. Dazu wurden Zellen für 24 Std. unter 20 % (Normoxie) bzw. 5 % (leichte Hypoxie) Sauerstoff kultiviert. Aus den Zellen wurde mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Analysiert wurden die Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α , die Glucosetransporter 1 - 5, sowie Glyoxalase 1 und 2. Zur Quantifizierung der Expressionsstärke wurden die untersuchten Gene auf PBDG als *housekeeping*-Gen normiert und in Prozent angegeben.

mRNA-Expression der Glucosetransporter GLUT-1 bis GLUT-5

Der Glucosetransporter GLUT-1 war unter Normoxie auf den Brustkrebszellen MDA-MB 231 nur schwach exprimiert. Bei den benignen Zellen wiesen Leukozyten die schwächste Expression auf. Durch Hypoxie wurde die GLUT-1-Expression in MDA-MB 231, Leukozyten und HUVEC deutlich hochreguliert. In Fibroblasten und Keratinozyten war die Expression unter Hypoxie vermindert (Abb 72 B).

Unter den Tumorzellen zeigte nur die Magenkarzinomlinie 23132/87 eine starke Expression des GLUT-2 bei 20 % Sauerstoff, die unter Hypoxie nur wenig geringer wurde. In Leukozyten wurde unter Sauerstoffmangel eine drastisch gesteigerte Expression dieses Glucosetransporters nachgewiesen. In HUVEC und Keratinozyten sank die Expression unter Sauerstoffmangelbedingungen (Abb. 72 C).

Die stärkste Expression des Glucosetransporters 3 fand sich unter den malignen Zellen in MDA-MB 231, die durch Sauerstoffmangel noch etwas gesteigert wurde. In Leukozyten konnte unter normoxischen Kulturbedingungen keine cDNA für GLUT-3 nachgewiesen werden, und auch in Magenkarzinomzellen fand sich nur wenig. Die

höchste Expression bei den benignen Zellen fand sich in Fibroblasten und HUVEC. Sauerstoffmangel führte in Leukozyten zur vermehrten Transkription des Glucosetransporters 3 (Abb. 72 D). Hypoxische Kulturbedingungen führten in Fibroblasten, Keratinozyten und MDA-MB 468 zu einer geringfügigen Reduktion der GLUT-3-Expression.

Alle Tumorzellen exprimierten unter Normoxie den Glucosetransporter 4. Auffallend war die starke Expression von GLUT-4 in Leukozyten sowohl bei 20 % als auch bei 5 % Sauerstoff. Hypoxie bewirkte in der Magenkarzinomlinie 23132/87 ein Absinken der Expression. In den beiden Tumorzelllinien MDA-MB 231 und 23132/87 wurde die Expression durch Sauerstoffmangel leicht gesteigert (Abb. 72 E).

Der Glucosetransporter 5 wurde vor allem auf benignen Zellen und unter diesen auf Leukozyten und Fibroblasten stark exprimiert. HUVEC zeigten nach Kultur bei 20 % Sauerstoff die schwächste Expression des Glucosetransporters 5. Durch Sauerstoffmangel wurde die Expression in HUVEC und Keratinozyten nur minimal gesteigert. In Tumorzellen fand sich bei Normoxie und Hypoxie nur eine äußerst schwache Expression (Abb. 72 F). In Abb. 73 sind die dazugehörigen Agarosegele dargestellt.

Abb. 72 A zeigt die Expressionsstärke, angegeben als arbiträre Einheiten, von PBDG unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Die Expressionsstärke war unter beiden Sauerstoffkonzentrationen sehr ähnlich.

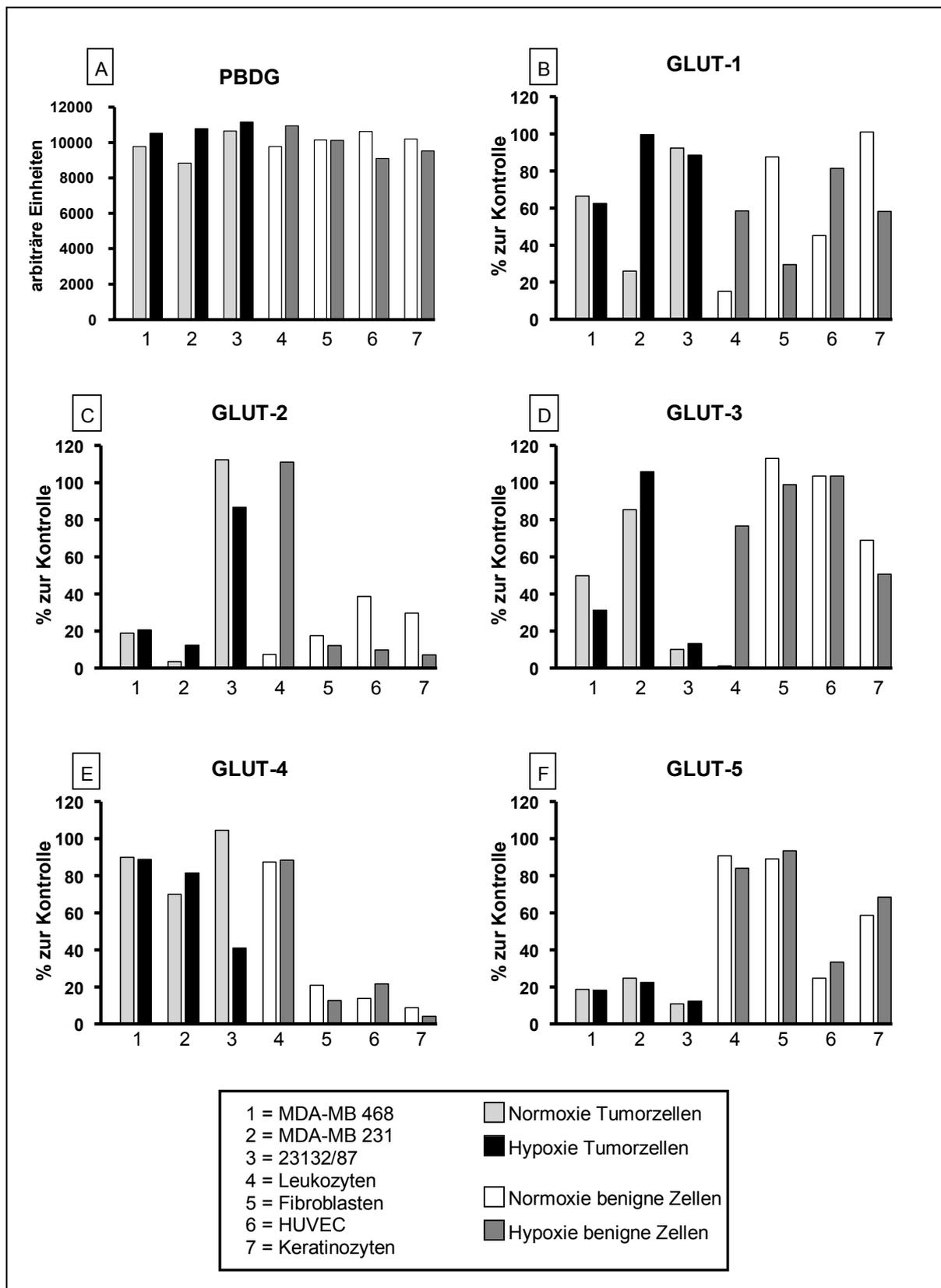


Abb. 72: mRNA-Expression von Glucosetransportern unter Normoxie und Hypoxie.

Die Zellen wurden für 24 Std. bei Normoxie (20 % O₂ hellgraue und weiße Balken) bzw. Hypoxie (5 % O₂ schwarze und dunkelgraue Balken) kultiviert, die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR wurde die Expressionsstärke der Glucosetransporter 1 - 5 untersucht. Gezeigt ist die Expressionsstärke in Prozent bezogen auf PBDG als „housekeeping gene“. Die Expression von PBDG ist in arbiträren Einheiten angegeben. n = 1.

Abb. 73 zeigt die PCR-Produkte von PBDG und den Glucosetransportern GLUT-1 bis -5 unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.

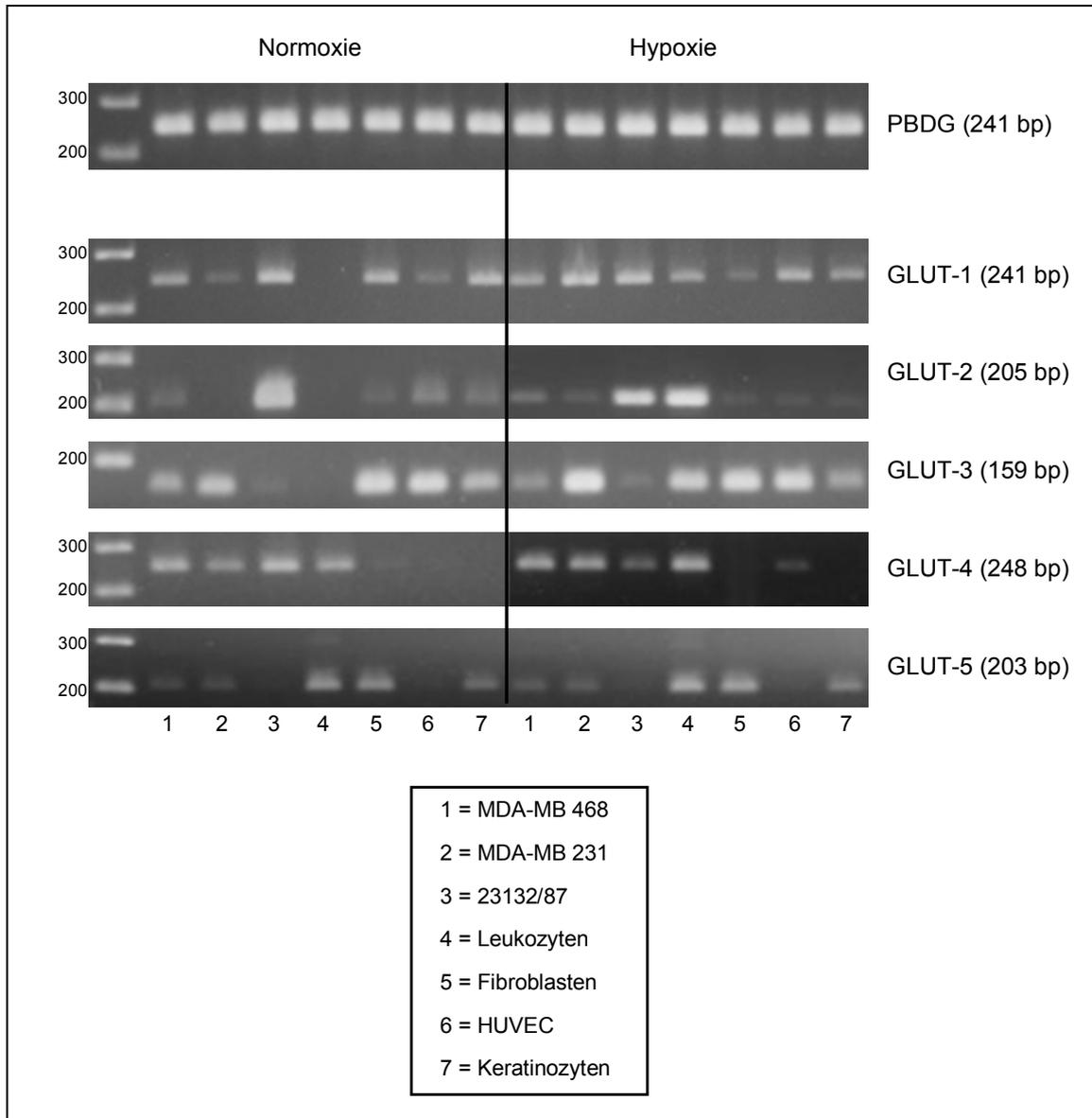


Abb. 73: PCR-Produkte von PBDG und Glucosetransporter 1 - 5.

Die Zellen wurden wie in Abb. 72 beschrieben kultiviert und die Expression von PBDG und der Glucosetransporter GLUT-1 bis -5 mittels PCR untersucht. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch analysiert.

mRNA-Expression von HIF-1 α und HIF-2 α

Unter normoxischen Kulturbedingungen zeigten benigne und maligne Zellen eine gleich starke Expression von HIF-1 α . In Leukozyten konnte HIF-1 α unter Normoxie nicht detektiert werden. Unter hypoxischen Bedingungen war die Expressionsrate für HIF-1 α in allen Zellen nahezu unverändert. In der Magenkarzinomlinie 23132/87 sank die Expression um etwa 25 %, in Leukozyten stieg sie um etwa 43 % (Abb. 74 A). HIF-2 α zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie HIF-1 α . In Leukozyten war HIF-2 α unter normoxischen Bedingungen nur schwach exprimiert. Unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen war die Expression in der Magenkarzinomlinie 23132/87 vermindert, in Leukozyten leicht gesteigert (Abb. 74 B).

mRNA-Expression von Glyoxalasen

Das Glyoxalasesystem, welches aus den beiden Enzymen Glyoxalase 1 und 2 besteht beseitigt toxische Zwischenprodukte, die durch die Glykolyse anfallen. Der Einfluss von Normoxie und Hypoxie auf die Expression dieser beiden Enzyme wurde untersucht. Glyoxalase 1 ist in malignen und benignen Zellen etwa gleich stark exprimiert. Lediglich Leukozyten zeigten eine schwächere Expression. Unter hypoxischen Kulturbedingungen war die Expression in den Brustkrebslinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231 leicht gesunken, in HUVEC leicht gesteigert (Abb. 74 C). Glyoxalase 2 war in Leukozyten und Keratinozyten am schwächsten exprimiert. Hypoxie bewirkte sowohl in malignen als auch in benignen Zellen keine nennenswerte Veränderung der Expression (Abb. 74 D). Abb. 75 zeigt die dazugehörigen Agaroselele.

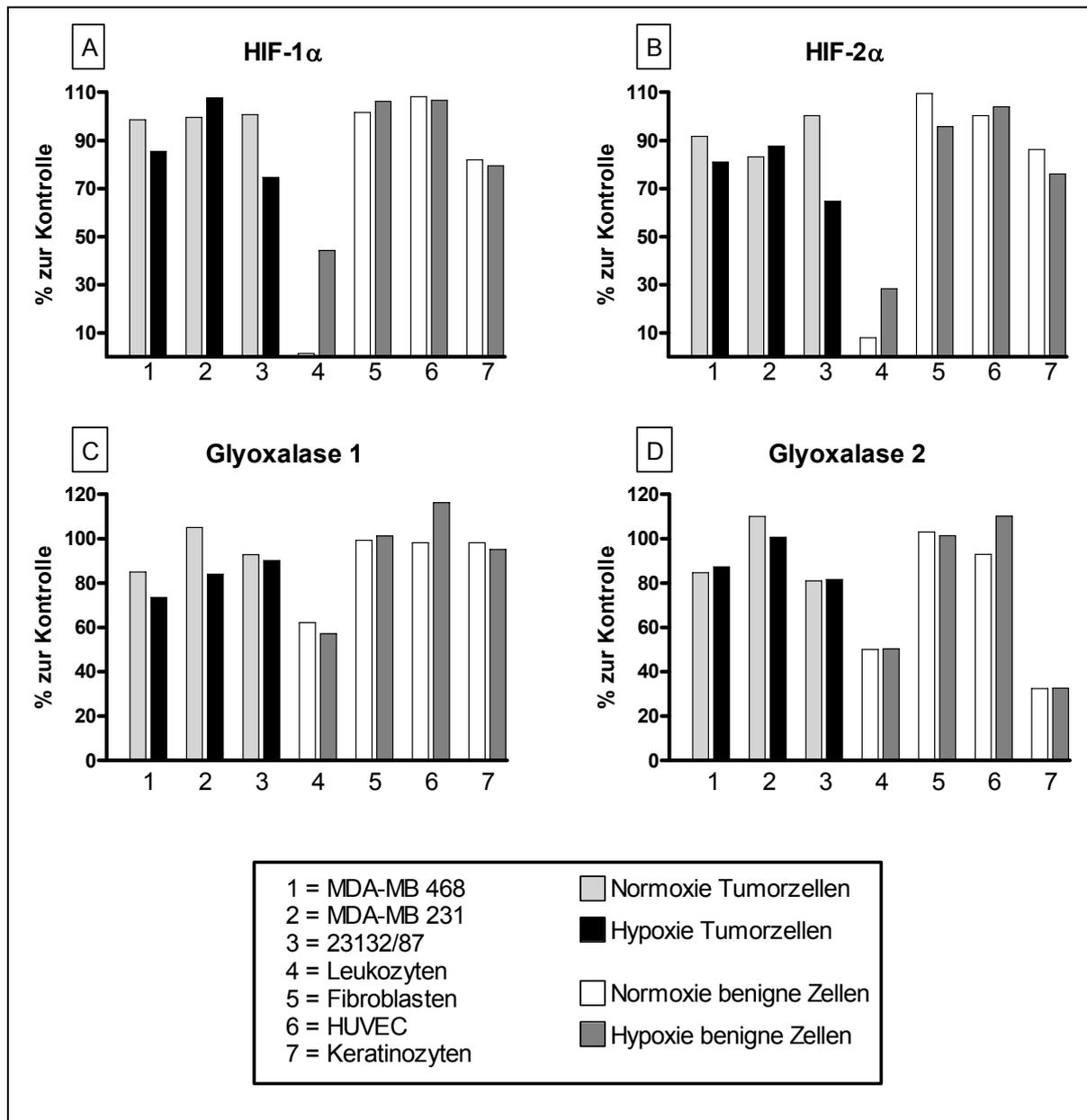


Abb. 74: mRNA-Expression von HIF-1 α , HIF-2 α , Glyoxalase 1 und 2 unter Normoxie und Hypoxie.

Die Zellen wurden wie in Abb. 72 beschrieben kultiviert, die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR wurde die Expressionsstärke von HIF-1 α , HIF-2 α , Glyoxalase 1 und 2 untersucht. Gezeigt ist die Expressionsstärke in Prozent bezogen auf PBDG (Abb. 72 A) als „housekeeping gene“. n = 1.

Abb. 75 zeigt die PCR-Produkte von PBDG, HIF-1 α , HIF-2 α , Glyoxalase 1 und 2 unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.

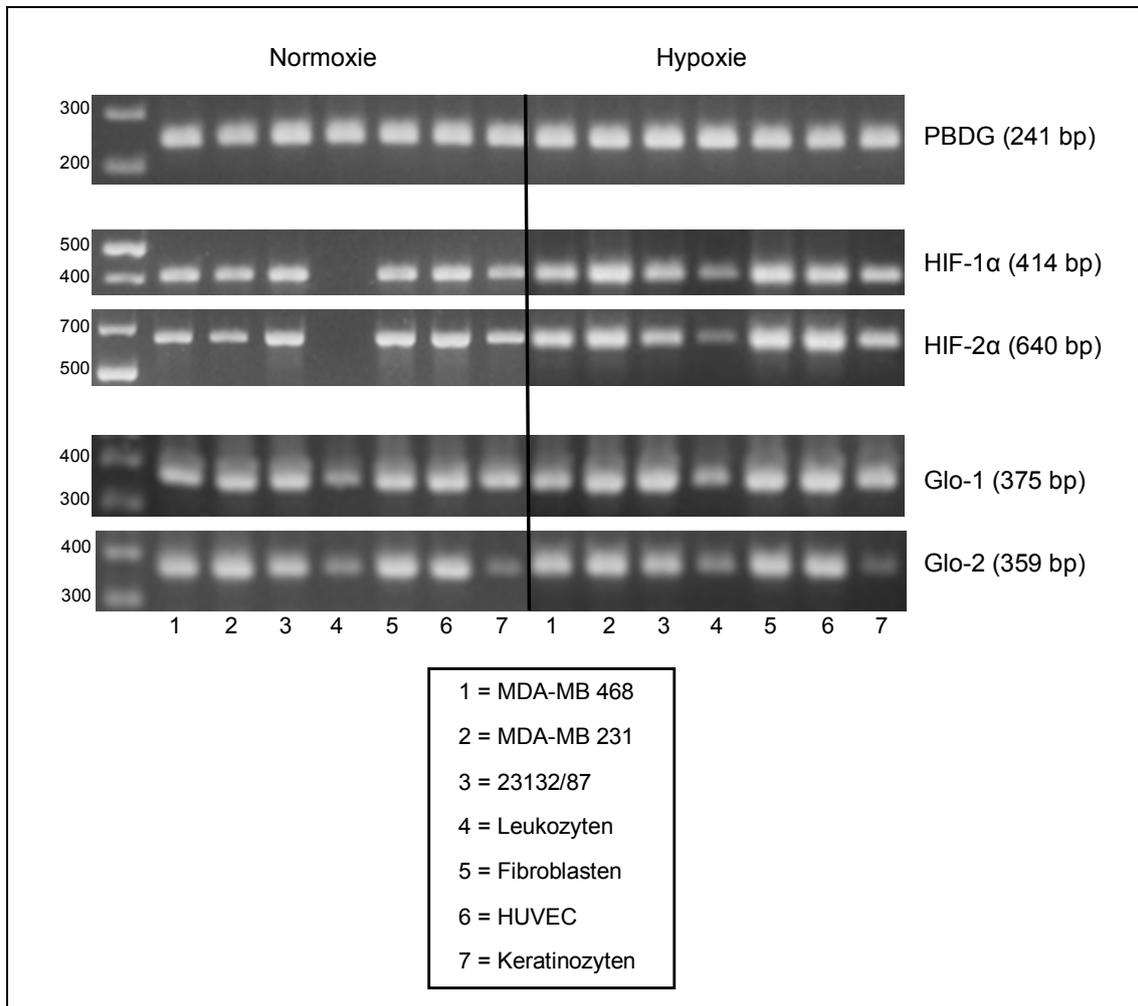


Abb. 75: PCR-Produkte von PBDG, HIF-1 α , HIF-2 α , Glyoxalase 1 und 2.

Die Zellen wurden wie in Abb. 72 beschrieben kultiviert und die Expression von PBDG, HIF-1 α , HIF-2 α , Glyoxalase 1 und 2 mittels PCR untersucht. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch analysiert.

4.8.4 Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die Protein-Expression von Laktatdehydrogenase-A und Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 bis 4

Die Proteinexpression von LDH-A und der vier PDK-Isoenzyme wurden unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen mittels Westernblotanalyse in malignen und benignen Zellen untersucht. Zur Quantifizierung der Expressionsstärke wurde jeweils auf β -Actin normiert und das Ergebnis in Prozent angegeben.

Protein-Expression von β -Actin

Die Expressionsstärke, angegeben als arbiträre Einheiten, von β -Actin unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen ist in Abb. 76 A dargestellt. In MDA-MB 231 und den Magenkarzinomzellen war die Expression unter Hypoxie vermindert. Bei den übrigen Zellen war die Expressionsstärke unter beiden Sauerstoffkonzentrationen ähnlich.

Protein-Expression von LDH-A

Bei 20 % Sauerstoffkonzentration wurde LDH-A in MDA-MB 231 und in den Magenkarzinomzellen sehr stark exprimiert. Auch in den benignen Zellen, bis auf Leukozyten, fand sich eine starke Expression. Durch Hypoxie wurde die Proteinexpression von LDH-A in MDA-MB 468, der Magenkarzinomlinie 23132/87 und in Keratinozyten leicht gesteigert. In MDA-MB 231, Leukozyten, Fibroblasten und HUVEC war die Expression durch Sauerstoffmangel leicht reduziert (Abb. 76 B).

Protein-Expression von PDK-1 bis -4

Unter Normoxie war PDK-1 bei allen vier benignen Zellen deutlich stärker exprimiert als in malignen Zellen. Durch Hypoxie wurde PDK-1 nur in der Brustkrebslinie MDA-MB 468 und in Keratinozyten hochreguliert. In den Magenkarzinomzellen 23132/87 zeigte sich keine Veränderung. In den anderen getesteten Zellen fand sich eine z. T. stark reduzierte Expression (Abb. 76 C). In MDA-MB 231 und der Magenkarzinomlinie 23132/87 fand sich eine sehr starke PDK-2-Expression. Alle benignen Zellen aber auch die Brustkrebslinie MDA-MB 468 wiesen nur eine schwache Expression auf. Durch Hypoxie konnte die Expression von PDK-2 in der Magenkarzinomlinie und in MDA-MB 468 gesteigert werden. In MDA-MB 231 wurde unter hypoxischen Bedingungen die Expression auf etwa $\frac{1}{4}$ im Vergleich zur Normoxie reduziert (Abb. 76 D). Für PDK-3 ergab sich kein spezifisches Expressionsmuster für maligne und benigne Zellen. Bei normoxischen Kulturbedingungen war die Proteinexpression in MDA-MB 468, Leukozyten und Keratinozyten am stärksten. Hypoxische Sauerstoffbedingungen steigerten die Expression von PDK-3 vor allem in MDA-MB 231 und in der Magenkarzinomlinie. In Keratinozyten ging die Expression durch Sauerstoffmangel zurück (Abb. 76 E). PDK-4 war unter normoxischen Bedingungen in den vier getesteten benignen Zellen im

Vergleich zu den drei malignen Zellen deutlich stärker exprimiert. Sauerstoffmangel bewirkte in MDA-MB 468 die größte Steigerung der Expression. Auch in Keratinozyten kam es zu einer Steigerung der Expressionsrate. In den übrigen benignen Zellen war die Proteinexpression durch Sauerstoffmangel vermindert (Abb. 76 F). Die dazugehörigen Immunblots zeigt Abb. 77.

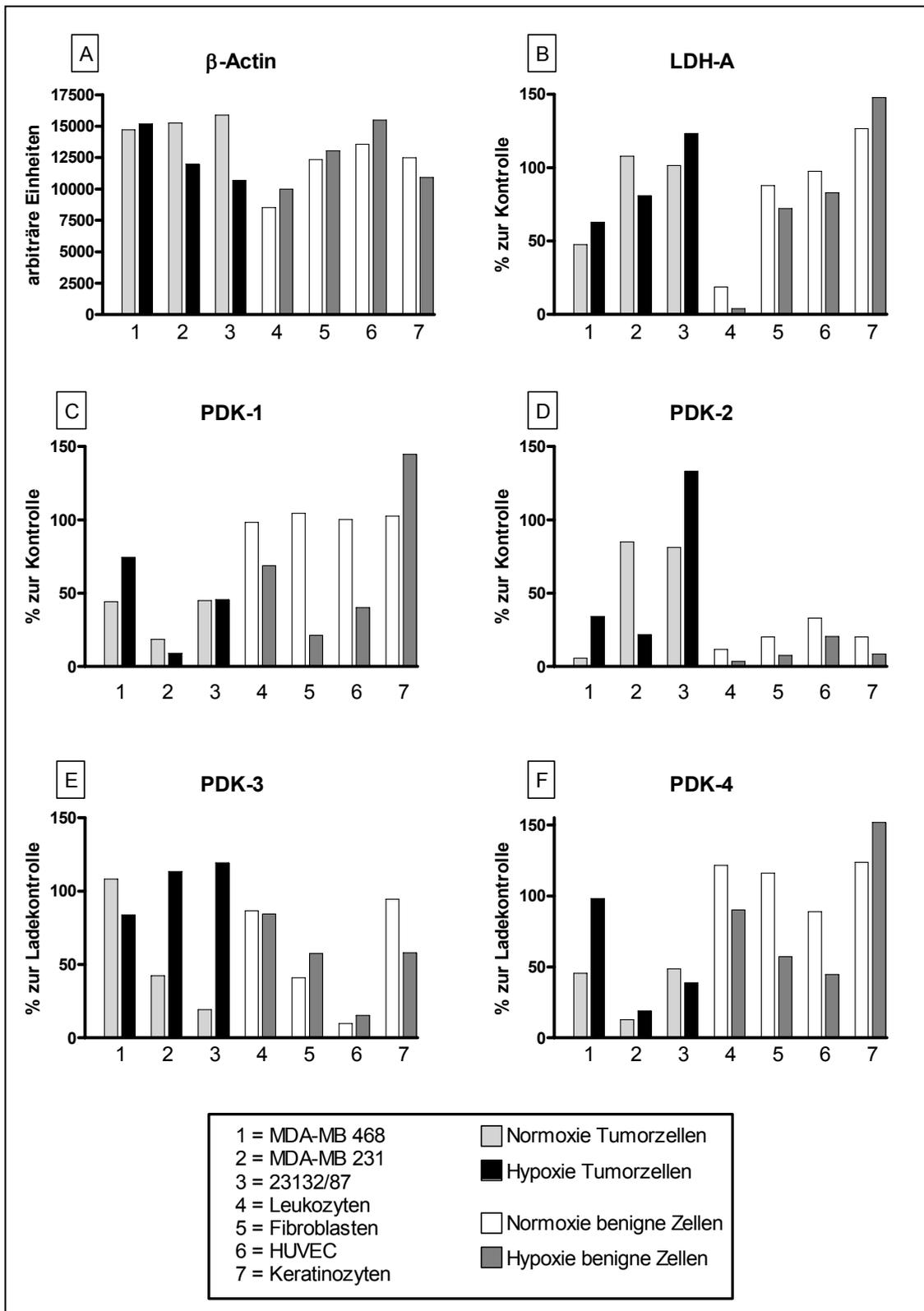


Abb. 76: Protein-Expression von LDH-A und Isoenzymen der Pyruvatdehydrogenase-Kinase unter Normoxie und Hypoxie.

Die Zellen wurden wie in Abb. 72 beschrieben kultiviert und anschließend Proteinlysate hergestellt. 30 µg Proteinlysate wurden auf ein 8 %iges Polyacrylamidgel geladen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Expression von LDH-A und den vier Isoenzymen der Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK-1 bis -4) wurde mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Gezeigt ist die Expressionsstärke in Prozent bezogen auf β-Actin als Ladekontrolle. Die Expression von β-Actin ist in arbiträren Einheiten angegeben. n = 1.

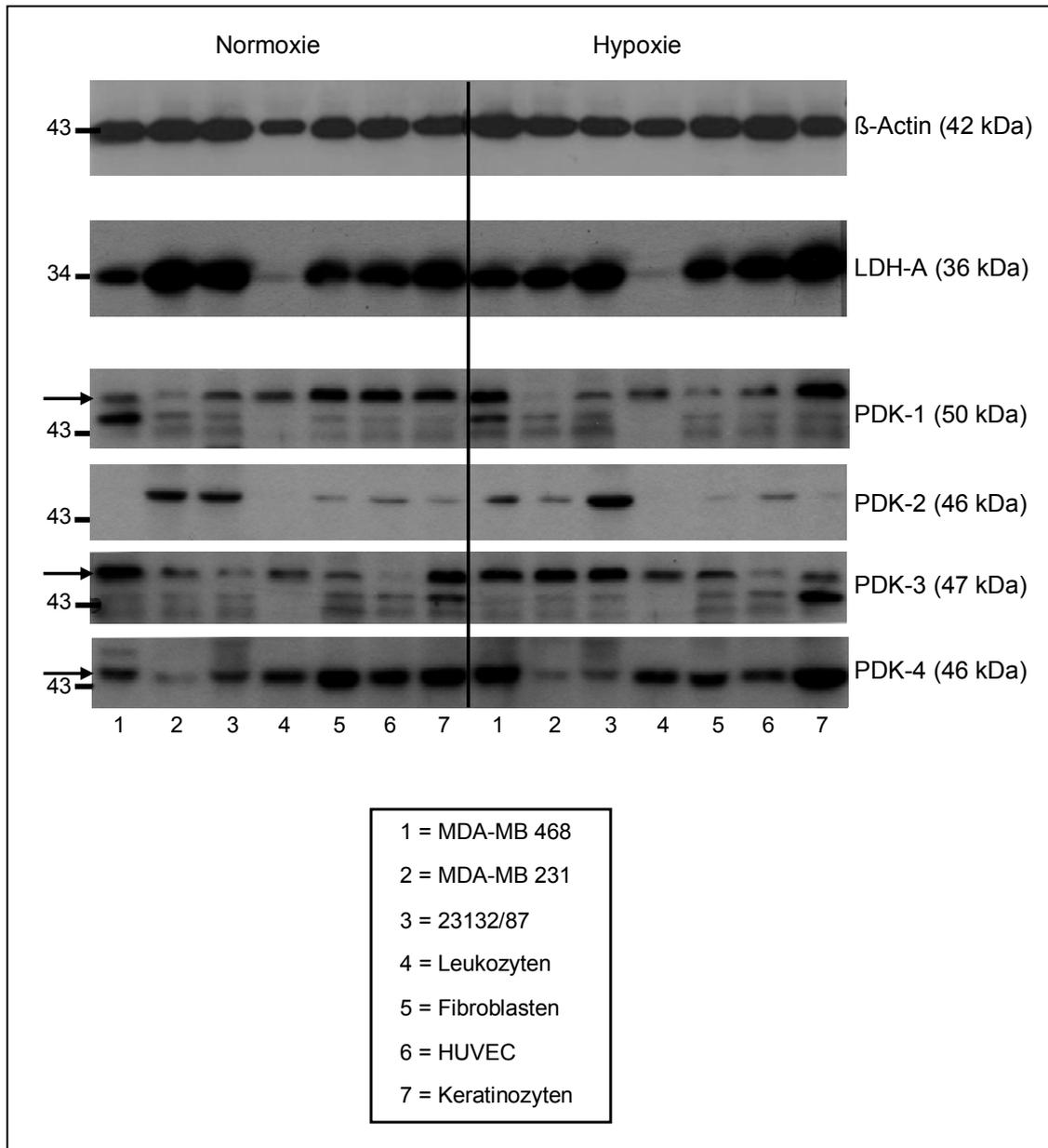


Abb. 77: Protein-Expression von LDH-A und Isoenzymen der Pyruvatdehydrogenase-Kinase unter Normoxie und Hypoxie.

Die Zellen wurden wie in Abb. 72 beschrieben kultiviert und wie in Abb. 76 beschrieben analysiert. Gezeigt sind die Immunblots der Expressionsanalyse von LDH-A und den vier Isoenzymen der Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK-1 bis -4). Die Pfeile markieren die spezifische Bande. $n = 1$. Die Blotmembran wurde „gestrippt“ und mit anti- β -Actin-Antikörper als Ladekontrolle inkubiert.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde *in vitro* zum ersten Mal ein breites Spektrum verschiedener Substanzen untersucht, die gegenwärtig intensiv als mögliche Tumorthapeutika diskutiert werden, und zwar parallel an verschiedenen malignen und benignen Zellen. Ziel war es, geeignete Kandidaten für eine zielgerichtete Therapie zu identifizieren. Die verwendeten Substanzen wurden hinsichtlich ihrer Wirkungsweise in drei Gruppen eingeteilt.

- Gruppe 1: Inhibitoren der Glykolyse
- Gruppe 2: Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen
- Gruppe 3: Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen

Im Vergleich zu normalen Zellen weisen Tumorzellen Veränderungen in verschiedenen Stoffwechselwegen auf (Moreno-Sánchez et al. 2007, Levine und Puzio-Kuter 2010). Hierbei sind vor allem eine gesteigerte Glykolyse und ein verminderter mitochondrialer Stoffwechsel die auffälligsten Merkmale, die daher Ansatzpunkte für eine zielgerichtete Tumorthherapie darstellen könnten. Auch die Kombination von Substanzen, die in den glykolytischen und mitochondrialen Stoffwechsel eingreifen, wurde untersucht, mit der Absicht diese beiden Stoffwechselwege gleichzeitig in Tumorzellen zu manipulieren und so eine höhere Effektivität zu erzielen. Als Tumorzellen wurden die Magenkarzinomlinie 23132/87 sowie die beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231 gewählt. Von den beiden Brustkrebszelllinien wird MDA-MB 231 als invasiver beschrieben (Zhang et al. 1991). Als benigne humane Kontrollzellen wurden primäre Fibroblasten aus Deziduagewebe, Leukozyten aus peripherem Blut, primäre Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) und Haut-Keratinocyten verwendet. Für die Beurteilung der Wirkung der getesteten Substanzen wurden mehrere Vitalitätstests mit verschiedenen Testprinzipien eingesetzt und in ihrer Aussagefähigkeit miteinander verglichen. Für den Vergleich der Wirkstärke der getesteten Substanzen wurden charakteristische Hemmkonzentrationen mit verschiedenen Modellen berechnet. Die Glykolyse-hemmende Eigenschaft der Substanzen wurde anhand ihrer Wirkung auf die Milchsäureproduktion beurteilt. Die Menge gebildeter Milchsäure wurde mit einem

UV-Test quantifiziert. Zur näheren Charakterisierung des Glucosestoffwechsels der hier verwendeten Zellen, wurde zum einen die Glucoseaufnahme quantifiziert und zum anderen wurden mittels Immunhistochemie charakteristische Proteine des glykolytischen Stoffwechsels dargestellt. Diese waren die Pyruvatkinase M2 (M2-PK), das Onkogen *Akt*, der Glucosetransporter GLUT-1, der Monocarboxylattransporter MCT-1 und der Hypoxie induzierbare Faktor 1 α (HIF-1 α).

In vivo weisen solide Tumore Bereiche auf, in denen ein sehr niedriger Sauerstoffgehalt herrscht (Vaupel 2004). Als Anpassung an diese hypoxischen Bedingungen sind Tumorzellen auf die Glykolyse zur ATP-Gewinnung angewiesen und reagieren mit einer gesteigerten Expression verschiedener Gene, die in den glykolytischen Stoffwechsel involviert sind, wie z. B. Glucosetransporter und Laktatdehydrogenase A (Harris 2002). Gemäß Warburgs Hypothese nutzen Tumorzellen auch unter aeroben Bedingungen bevorzugt die Glykolyse zur Energiegewinnung (Warburg und Minami 1923). In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die Sauerstoffkonzentration einen Einfluss auf die Regulation stoffwechselrelevanter Gene hat. Auf mRNA-Ebene wurden folgende Gene analysiert: Glucosetransporter 1-5, die Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α sowie die beiden Enzyme Glyoxalase 1 und 2. Auf Proteinebene wurden die Enzyme Laktatdehydrogenase-A und Pyruvatdehydrogenase-Kinasen 1-4 untersucht.

5.1 Vergleich verschiedener Vitalitätstests

Für die Beurteilung der Wirkung von potenziell zytotoxischen Substanzen wurden verschiedene kommerzielle Testsysteme eingesetzt. Mit diesen zellbasierten Tests wurde die Vitalität basierend auf den Parametern ATP-Gehalt, metabolische Aktivität und Adhärenz bestimmt. Folgende Tests wurden verwendet: CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay, Kristallvioletttest, WST-8 Cell Proliferation Assay, Vitalitätstest basierend auf Resazurin und die Echtzeitzellanalyse mit dem xCELLigence-System.

Bei der Auswertung fiel auf, dass die Vergleichbarkeit der einzelnen Vitalitätstests von der getesteten Substanz abhängig war. Die Verläufe der Dosis-Wirkungskurven der einzelnen Vitalitätstests für die Substanz Perifosin waren weitgehend homogen. Bei der Magenkarzinomlinie 23132/87 wich nur der Kurvenverlauf der Impedanzmessung deutlich von den anderen Kurven ab. Bei den Keratinozyten

zeigte der Kristallvioletttest in den beiden höchsten Konzentrationsstufen eine deutliche Abweichung von den Aussagen der anderen Testsysteme. Für 2,4-Dinitrophenol zeigten die Dosis-Wirkungskurven der einzelnen Tests z. T. sehr starke Unterschiede. Die Ergebnisse werden bei den jeweiligen Tests ausführlich diskutiert.

5.1.1 Fehlerbetrachtung

Bei der Durchführung von Experimenten in denen die Zellvitalität nach Behandlung mit potenziell zytotoxischen Substanzen bestimmt werden soll, müssen Fehlerquellen so weit wie möglich reduziert werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Folgende Punkte müssen beachtet werden:

- gleiche/ähnliche Zellpassagen bei Wiederholungsexperimenten verwenden
- Kontamination mit Mycoplasmen ausschließen
- Konstante Zellkulturbedingungen (Arbeitsabläufe, Medienzusätze) schaffen
- einzusetzende Zellzahl für Vitalitätstests in Vorversuchen ermitteln (linearer Bereich des Tests beachten)
- Interaktion der Testsubstanz mit Testsubstrat ausschließen (z. B. Autofluoreszenz der Testsubstanz)
- Filtereinstellung und Bandbreite der Filter beachten (Messung im optimalen Absorptionsbereich)
- für jeweiligen Test empfohlene Mikrotiterplatten verwenden
- gleichmäßige Verteilung der Zellen bei Aussaat in Mikrotiterplatten gewährleisten

Nur so können verlässliche und vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

5.1.2 Problem der Normierung bei Vitalitätstests

Beim Ausplattieren der Zellen in 96-Loch-Mikrotiterplatten sind Pipettierungenauigkeiten nicht auszuschließen. Weiterhin ist das Proliferationsverhalten der einzelnen Zelllinien verschieden. Daher muss für die Beurteilung der inhibitorischen Wirkung der getesteten Substanzen eine Normierung der Rohdaten erfolgen. In der Regel wird die Änderung der Vitalität der behandelten Zellen in Bezug auf die nicht

behandelten Kontrollzellen ermittelt. Soll die Wirkung von verschiedenen Inhibitoren innerhalb einer Zelllinie verglichen werden, ist es sinnvoll die Vitalität der behandelten Zellen in Prozent bezogen auf die Kontrollen (Zellen unter Zugabe des substanzspezifischen Lösungsmittels) anzugeben. Je nachdem welcher Test verwendet wurde, wurde die gemessene Absorption bzw. RLU (engl. für *Relative Light Units*) der unbehandelten Kontrollezellen als 100 % Vitalität definiert. Durch die relative Angabe der Ergebnisse konnten mögliche Fehler durch Schwankungen in der Anzahl der ausplattierten Zellen oder Änderung der Zellzahl durch Zellproliferation ausgeglichen werden.

Die Zelldichte wurde so gewählt dass eine 80 %ige Konfluenz in der Vertiefung der Mikrotiterplatte erreicht wurde. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Zellgröße, Zellkern-zu-Plasma-Relation und Grundaktivität der Zellen ist der Vergleich absoluter Zellzahlen nicht sinnvoll. Es ist weiterhin zu bedenken, dass sich die einzelnen Zelllinien in ihrer Proliferationsgeschwindigkeit unterscheiden (s. Abb. 35). Daher sollten die Rohdaten der Vitalitätstests auf die jeweils unbehandelte Kontrolle normiert werden. Sowohl im ATP-Test als auch beim WST-8- und Resazurintest wird der ATP-Gehalt bzw. die metabolische Aktivität von allen Zellen, also auch zum Messzeitpunkt gerade sterbende oder in der aktiven apoptotischen Phase befindliche Zellen, bestimmt. Tote Zellen zeigen keine metabolische Aktivität. Da Apoptose ein energieverbrauchender Prozess ist, zeigen apoptotische Zellen noch metabolische Aktivität (Cotter et al. 1990). Der Kristallvioletttest, der zwar nukleäre Proteine anfärbt und mit dem die Zellmasse bestimmt wird, detektiert nur adhärenente Zellen. Zur Quantifizierung der Gesamtzellzahl, also adhärenenter und nicht mehr adhärenenter aber möglicherweise noch lebender Zellen, nach dem Vitalitätstest kann z. B. der DNA- oder Protein-Gehalt bestimmt werden. Möglicherweise beeinträchtigt die Behandlung der Zellen mit bestimmten Substanzen das Adhärenzverhalten, aber nicht die Vitalität. Da es primäres Ziel dieser Arbeit war aus den zahlreichen Substanzen, die gegenwärtig als mögliche Tumorthapeutika diskutiert werden, die aber auf den hier eingesetzten Zellen noch nie getestet wurden, diejenigen mit tumorspezifischer Wirkung zu identifizieren und selektionieren (*screening*), wurde auf die Bestimmung der genauen Zellzahl nach Behandlung der Zellen verzichtet.

5.1.3 Beurteilung des CellTiter-Glo[®] Lumineszenz Vitalitätstests

Im Vergleich zu allen anderen hier verwendeten Vitalitätstests lieferte der ATP-Test die zuverlässigsten und reproduzierbarsten Ergebnisse. Die Werte der Replikate waren sehr homogen. Auch farbige Substanzen stellten keinen Störfaktor dar und das Hintergrundsignal war zu vernachlässigen. Weiterhin sprachen die sehr einfache Anwendung und die schnelle Durchführung für diesen Test. Die vielen Vorteile überwiegen daher den Nachteil des relativ hohen Preises. Ein möglicher Nachteil könnten die apoptotischen Zellen sein, die im Überstand vorhanden sind und deren ATP-Gehalt ebenfalls detektiert wird. Welchen Anteil die apoptotischen Zellen zum gemessenen Gesamt-ATP-Gehalt beitragen, wurde hier nicht untersucht.

Aus den oben genannten Gründen wurde die zytotoxische Wirkung (Berechnung von Hemmkonzentrationen, Erstellen der Dosis-Wirkungsfunktion) der einzelnen Substanzen auf die verschiedenen Zellen anhand des ATP-Gehaltes ermittelt und verglichen.

5.1.4 Beurteilung des Kristallvioletttests

Je nach Zelllinie variierten die gemessenen OD-Werte bei den einzelnen Experimenten in den Mediumkontrollen um den Faktor 2 für die Magenkarzinomlinie 23132/87 bis 9,8 für Fibroblasten (siehe Abb. 40 Ergebnisteil). Für Suspensionszellen, wie z. B. Leukozyten kann dieser Test nicht angewendet werden. Die gemessenen OD-Werte sind für jede adhärent wachsende Zelllinie spezifisch, so dass die Messwerte an sich für verschiedene Zelllinien nicht miteinander verglichen werden können. Die Stärke der Adhärenz variierte von Zelllinie zu Zelllinie. Die Magenkarzinomzellen adhärten sehr stark, hingegen HUVEC deutlich schwächer. Schwach adhärierende Zellen können sich beim Abnehmen des Zellkulturüberstandes, dem ersten Schritt dieses Tests, durch Sogkräfte möglicherweise ablösen, wodurch das Messergebnis verfälscht wird. Auch sich teilende Zellen verlieren ihre Adhärenz, so dass diese vitalen Zellen mit dem ersten Arbeitsschritt (Abnahme des Zellkulturüberstandes) entfernt werden und somit der Detektion entgehen. Ein weiterer großer Nachteil besteht darin, dass keine absoluten Zellzahlen bestimmt werden können. Die Erstellung einer Standardkurve, die für alle weiteren Messungen herangezogen werden kann, würde wegen der starken Schwankungen der OD-Werte von Platte zu Platte ungenaue Ergebnisse liefern. Die Variabilität von Platte zu Platte kann bis zu 25 % betragen (Gillies et al. 1986). Daher

muss auf jeder Platte eine Standardkurve mitgeführt werden. Der Kristallvioletttest eignet sich daher nur zur Bestimmung der relativen Zellzahl.

5.1.5 Beurteilung des WST-8 Proliferationstests

Zwei der in dieser Arbeit getesteten Substanzen, Rhodamin 123 und 2,4-DNP sind orangefarben, genau wie das gebildete Formazansalz, das als Messparameter für diesen Test dient. Es hat sich gezeigt, dass das Hintergrundsignal von Rhodamin 123 bzw. 2,4-DNP konzentrationsabhängig die Messung beeinträchtigt. Bei Rhodamin 123 lieferten Konzentrationen $< 2,5 \mu\text{M}$ kein nennenswertes Hintergrundsignal mehr. Bei 2,4-DNP war das Hintergrundsignal ab Konzentrationen $< 25 \mu\text{M}$ vernachlässigbar. Daher müssen für diese Substanzen Hintergrundkontrollen (entsprechende Konzentration Rhodamin- bzw. DNP-Lösung in reinem Zellkulturmedium ohne Zellen) mitgeführt und die gemessenen OD-Werte der Hintergrundkontrollen von den gemessenen Werten der Zellansätze subtrahiert werden.

Man muss bei diesem Test beachten, dass unter suboptimalen Zellkulturbedingungen (pH, Redoxäquivalente und Glucosekonzentrationen im Zellkulturmedium) die Umsetzung des Tetrazoliumsalses WST-8 durch vitale Zellen eventuell stark variieren kann aufgrund des metabolischen Status der Zellen (z. B. zelluläre Konzentration von Pyridinnukleotiden) (Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation, 4th edition 2008, Roche Diagnostics GmbH).

Im Vergleich zu anderen Tetrazoliumsalsen ist WST-8 stabiler und weniger zytotoxisch und ist daher für längere Inkubationen geeignet. Weiterhin ist die Detektionssensitivität von WST-8 höher verglichen mit anderen Tetrazoliumsalsen (Assay Kits, Cayman Chemical Company).

Aufgrund der Störanfälligkeit dieses Tests und der Interferenz mit farbigen Substanzen wurde der WST-8-Test für die Vitalitätsbestimmung hier nicht weiter eingesetzt.

5.1.6 Beurteilung des Vitalitätstests basierend auf Resazurin

Die beiden farbigen Substanzen Rhodamin 123 und 2,4-DNP lieferten in diesem Testsystem kein nennenswertes Hintergrundsignal. Es fiel auf, dass das Zeitintervall für den Farbumschlag von blau nach pink abhängig von der Zellsorte sehr unterschiedlich war. Tumorzellen reduzierten das Resazurin deutlich schneller als

benigne Zellen. Vor allem bei Leukozyten war die Inkubationszeit sehr lange (z. T. bis zu 20 Std.), um ein auswertbares Messsignal zu erhalten (Daten nicht gezeigt). Wie beim WST-8-Test kann auch hier die Reduktion des Farbstoffes durch die Zellen aufgrund suboptimaler Zellkulturbedingungen (s. o.) möglicherweise stark variieren, da an der Reaktion ebenfalls Pyridinnukleotide (NADH) beteiligt sind.

5.1.7 Beurteilung der Echtzeit-Zellanalyse mit dem xCELLigence-System

Für Perifosin zeigte die Dosis-Wirkungskurve bei den meisten Zellen einen ähnlichen Verlauf, wie bei den anderen Vitalitätstests. Nur bei der Magenkarzinomlinie 23132/87 wich der Kurvenverlauf deutlich ab. Die Abweichung scheint nicht auf einem starken Adhärenzverhalten dieser Zelllinie zu beruhen, da der ebenfalls auf Adhärenz basierende Kristallvioletttest sehr gut mit Kurvenverläufen der anderen Vitalitätstests übereinstimmte. Eventuell kommt hier eher die Konformationsänderung (Anhaftungsfläche) der adhärennten Zellen in Reaktion auf die Testsubstanzen zum Tragen. Für den Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette 2,4-Dinitrophenol zeigten die Dosiswirkungskurven des CI (engl. für *Cell Index*) einen völlig anderen Verlauf zu denen der anderen Vitalitätstests. Vor allem bei Kerationzyten war der Kurvenverlauf des CI gegensätzlich zu dem der anderen Tests. Bei der höchsten Konzentration von 2,4-DNP war der relative CI am höchsten. Möglicherweise bewirkt 2,4-DNP, dass sich die Keratinozyten stärker abflachen und die Impedanz steigt. Vistejnova et al. verglichen gängige Vitalitätstests (ATP- und MTT-Test) mit dem xCELLigence-System zur Bestimmung der Zellzahl bei verschiedenen Zelllinien (Maus-Fibroblasten, normale humane Fibroblasten und Keratinozyten sowie HaCaT). Die Impedanzmessung zur Bestimmung der Zellproliferation von murinen und humanen Fibroblasten sowie der immortalisierten Keratinozytenlinie HaCaT erwies sich als eine vergleichbare Methode mit den üblicherweise eingesetzten ATP- und MTT-Tests. Für normale humane Keratinozyten korrelierte die Impedanzmessung nicht mit der Zellzahl. Die Autoren vermuten, dass dies mit der speziellen Morphologie der Kerationozyten zusammenhängen könnte (Vistejnova et al. 2009). Urcan et al. führten Zytotoxizitätsstudien an Zahnfleischfibroblasten durch und verglichen die Impedanzmessung mit dem XTT-Test. Der XTT-Test, welcher wie der WST-8-Test auf der Umsetzung eines Tetrazoliumsalses beruht, korrelierte hier sehr gut mit den Ergebnissen des xCelligence-Systems (Urcan et al. 2010). In den hier durchgeführten Untersuchungen lieferten Impedanzmessung und WST-8-Test für

Fibroblasten ebenfalls vergleichbare Ergebnisse. Normalerweise runden sich Zellen ab und verlieren ihre Adhärenz, wenn sie zytotoxischen Substanzen ausgesetzt sind. Es ist jedoch zu bedenken, dass sich manche Zellen auch zu Zellhaufen zusammenballen und den Kontakt zur Sensorelektrode verlieren können wodurch der Zellindex sinkt. Dennoch können die Zellen metabolisch aktiv und vital sein. Zytotoxizität kann auch dazu führen, dass sich die Zellen abflachen wodurch sich die Kontaktfläche zwischen Zellen und Sensorelektroden vergrößert und damit der Zellindex steigt (Xing et al. 2006). Daher empfiehlt es sich, die Zellmorphologie auch mikroskopisch zu beobachten und die Vitalität mit einem weiteren zuverlässigen Test zu bestimmen.

5.2 Berechnung von Hemmkonzentrationen

Eine charakteristische Größe zur Beurteilung der Wirkstärke eines Inhibitors ist die mittlere Hemmkonzentration IC 50 (*inhibitory concentration*). In der vorliegenden Arbeit entspricht der IC50-Wert derjenigen Konzentration, bei welcher der ATP-Gehalt um 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert wurde. Zur Bestimmung dieses Wertes wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt und der IC50-Wert mit folgenden Methoden berechnet.

- nichtlineare Regression = 4-Parameter-Gleichung (Graph-Pad-Prism 4)
- nichtlineare Interpolation (Graph-Pad-Prism 4)
- lineare Interpolation (Microsoft Excel)

Normalerweise wird die IC50 mit Hilfe der nichtlinearen Regression bestimmt, da hierbei der sigmoidale Verlauf der Dosis-Wirkungskurve berücksichtigt wird. Bei der nichtlinearen Regression erstellt das Programm Graph Pad Prism 4 aufgrund einer algorithmischen Annäherung die Dosis-Wirkungskurve und berechnet daraus die mittlere Hemmkonzentration IC50. Da auf diesem Weg für einige der hier getesteten Substanzen die IC50 nicht bestimmt werden konnte, da im gewählten Konzentrationsbereich keine 50 %ige Hemmung erreicht wurde, wurden andere Hemmkonzentrationen durch Interpolation mit Hilfe von Graph Pad Prism 4 bzw. Microsoft Excel berechnet. Die Interpolation mit Graph Pad Prism basiert auf der nichtlinearen Regressionskurve und ist damit eine nichtlineare Interpolation. Mit dem Programm Microsoft Excel wurde eine lineare Interpolation durchgeführt. Hierbei

werden nur die beiden Konzentrationen der Testsubstanz oberhalb und unterhalb der gesuchten Hemmkonzentration linear interpoliert (siehe Abb. 21 Einleitung).

Es wurde überprüft, ob die nichtlineare Interpolation mit Graph Pad Prism und die lineare Interpolation mit Microsoft Excel für die Bestimmung von Hemmkonzentrationen vergleichbare Ergebnisse liefern.

Es zeigte sich, dass die Werte der Hemmkonzentrationen durch nichtlineare Interpolation mit Graph Pad Prism und lineare Interpolation mit Microsoft Excel teilweise sehr stark voneinander abwichen. Die prozentuale Abweichung zwischen den beiden Berechnungsmethoden reichte von 1 % bis 77 %. Die lineare Interpolation ist daher nur für eine grobe Abschätzung der Hemmkonzentration geeignet, da zur Berechnung nur zwei Messwerte, jeweils ober- bzw. unterhalb der gesuchten Hemmkonzentration, herangezogen werden. Die genaue Bestimmung der Hemmkonzentration sollte daher mittels nichtlinearer Regressionsanalyse durchgeführt werden, da hierbei für die Berechnung alle Messwerte der sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve mit ihren beiden Plateaus bei ca. 0 % und 100 % berücksichtigt werden.

5.3 Beurteilung der getesteten Substanzen als mögliche Tumorinhibitoren

5.3.1 Glykolyseinhibitoren

2-DG

Das Glucoseanalogon 2-DG wird durch das Enzym Hexokinase zu 2-DG-Phosphat (2-DG-P) phosphoryliert. Die weitere Umsetzung durch die Phosphohexose-Isomerase ist nicht möglich. 2-DG-P akkumuliert in der Zelle und hemmt die Hexokinase wahrscheinlich über Produkthemmung (Chen et al. 2007). 2-DG führte vor allem in Zellen mit mitochondrialen Defekten und unter hypoxische Bedingungen zu ATP-Mangel und Zelltod (Maher et al. 2004).

In den hier gestesteten Tumorzellen bewirkte 100 mM 2-DG zwar eine etwa 50 %ige Reduktion des ATP-Gehaltes, jedoch waren benigne Zellen noch deutlich stärker durch 2-DG beeinträchtigt. Einen deutlich stärkeren Effekt von 2-DG beobachteten Jiang et al.. Sie behandelten MDA-MB 468 für 30 min. mit nur 8 mM 2-DG. Der ATP-Gehalt war dadurch auf 33 % reduziert (Jiang et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit war der ATP-Gehalt in MDA-MB 468 im Mittel auf 44 % reduziert, allerdings erst nach 24 stündiger Inkubation mit 100 mM 2-DG. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind

möglicherweise auf unterschiedliche Rezepturen zum Ansetzen von 2-DG oder die Zellpassage zurückzuführen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen mit zunehmender Passage einen aggressiveren Phänotyp entwickeln und weniger sensitiv für 2-DG werden.

Möglicherweise ist 2-DG kein potenter Inhibitor des Tumorstoffwechsels. Le Goffe et al. berichten, dass 2-DG-6-P weiter im Pentosephosphatweg (PPW) verstoffwechselt werden und die Zelle somit einen adäquaten Redoxstatus aufrechterhalten kann (Le Goffe et al. 2002). Andere Autoren behaupten, dass 2-DG-6-P durch Glucose-6-phosphat-dehydrogenase im PPW nicht weiter umgesetzt wird (Dwaraknath und Jain 2009). Der Einsatz von 2-DG als Krebstherapeutikum könnte aber auch zu Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika führen. Als möglicher Mechanismus wird die gesteigerte Expression von P-Glycoprotein diskutiert, welches vom MDR1-Gen (MDR = *multi drug resistance*) kodiert wird (Ledoux et al. 2003). Unter hypoxischen Bedingungen, wie sie *in vivo* bei soliden Tumoren vorkommen, scheint 2-DG weniger wirksam zu sein. Maher et al. konnten *in vitro* zeigen, dass Tumorzellen unter Hypoxie deutlich resistenter gegenüber 2-DG sind. Sie führten die Resistenz auf die Expression von HIF-1 α zurück. Allerdings waren die Konzentrationen von 2-DG sehr gering (3 mg/ml = 18 μ M). Wahrscheinlich sind höhere Konzentrationen notwendig, um die Glykolyse stark genug zu hemmen und dadurch einen ATP-Mangel zu erzielen (Maher et al. 2007).

3-BrPA

3-BrPA hemmt das erste Enzym in der Glykolyse, die Hexokinase. 3-BrPA zeigte in den hier durchgeführten Untersuchungen eine sehr enge therapeutische Breite. Zwei der drei Tumorzelllinien (MDA-MB 231 und 23132/87) reagierten nur minimal auf die Behandlung. Auffallend war die gegensätzliche Reaktion der beiden Brustkrebszelllinien. Die als invasiver beschriebene MDA-MB 231 war sehr resistent. Im Gegensatz dazu war der ATP-Gehalt in MDA-MB 468 auf etwa 6 % abgefallen. Bei den benignen Zellen war der ATP-Gehalt nach Behandlung mit 3-BrPA nahezu null. Trotz euphorischer Daten in der Literatur (Ihrlund et al. 2008, Ko et al. 2004) scheint 3-BrPA für eine klinische Anwendung in der Tumorthherapie nicht geeignet, wofür es mehrere Gründe gibt. Wie in der Einleitung bereits beschrieben ist 3-BrPA ein stark alkylierendes Agens und interferiert vor allem mit SH-Gruppen von Cystein-Resten in Proteinen und Enzymen. Ein Zielmolekül von 3-BrPA ist z. B. die GAPDH, ein

cysteinhaltiges Enzym. Robey et al. konnten zeigen, dass 3-BrPA die Glykolyse eher durch die Blockade der GAPDH als durch Hexokinase hemmt (Robey et al. 2007). 3-BrPA in einer Konzentration von 1,2 mM hemmte auch nahezu vollständig die mitochondriale Atmung, wie Ko et al. an Schnitten von Lebertumoren zeigen konnten. Eine Konzentration von 5 mM war nötig, um die Hexokinase zu hemmen. 15 mM 3-BrPA hemmte die Glykolyse vollständig (Ko et al. 2001). Diese hohen Konzentrationen erscheinen aus therapeutischer Sicht extrem hoch und *in vivo* nicht einsetzbar.

Außerdem ist 3-BrPA nicht stabil in Lösung und *in vitro* sind Konzentrationen von 100 μ M für eine effektive Wirkung notwendig (Chen et al. 2007). In einer Studie mit Kaninchen wurde 3-BrPA intraarteriell appliziert und verursachte Darmnekrosen und Hepatotoxizität (Chang et al. 2007, Vali et al. 2007). Eine tumorselektive Wirkung ist somit nicht gewährleistet und es muss mit starken Nebenwirkungen gerechnet werden.

Iodoacetat

In den hier durchgeführten Experimenten wurde vor allem in benignen Zellen eine starke ATP-Depletion nach Inkubation mit 12,5 μ M Iodoacetat beobachtet. Die Wirkung auf Tumorzellen war sehr unterschiedlich. MDA-MB 468 waren sehr sensitiv gegenüber Iodoacetat, die Magenkarzinomlinie jedoch relativ resistent.

Da Iodoacetat auch ein alkylierendes Agens ist, erscheint die selektive Hemmung der GAPDH fraglich. In der Literatur sind Interaktionen von Iodoacetat mit verschiedenen Enzymen beschrieben. Iodoacetat hemmt wahrscheinlich auch Cysteinproteasen (Choi et al. 1998). Ein weiteres Zielenzym von Iodoacetat ist die 6-Phosphogluconolacton-Dehydrogenase (Scatena et al. 2008). Auch das Enzym Phosphofruktokinase wird durch Iodoacetat gehemmt, indem es mit dessen Thiolgruppe reagiert (Bloxham und Lardy 1973). In einer Konzentration von 100 μ M bei AS-30D-Zellen und 10 μ M bei HeLa-Zellen hatte Iodoacetat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation, hemmte aber die Glykolyse (Rodríguez-Enríquez et al. 2006). Daher scheint Iodoacetat für eine zielgerichtete Tumorthherapie mit breitem und nebenwirkungsarmem Anwendungsbereich nicht geeignet.

NaF

Die hier gewonnenen *in vitro*-Daten lassen für NaF keine tumorselektive Wirkung erkennen. Außer in Leukozyten kam es in allen getesteten benignen Zellen zu einer nahezu vollständigen ATP-Depletion. Für Leukozyten waren die Ergebnisse sehr inhomogen, was möglicherweise daran liegt, dass diese von verschiedenen Spendern stammten. Diese Ergebnisse sind kontrovers zu denen von Satoh et al., welche zeigen konnten, dass NaF eine höhere Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen aufweist als gegenüber normalen Zellen (Satoh et al. 2003). In diese Richtung auffallend war, dass die als besonders invasiv beschriebene Brusttumorzelllinie MDA-MB 231 unter den getesteten Tumorzellen am sensitivsten gegenüber NaF war. Fluorid hemmt nicht nur die Enolase, sondern auch andere magnesiumabhängige Enzyme (Guminska und Sterkowicz 1976), was eine tumorspezifische Wirkung fraglich macht. Magnesium spielt als Cofaktor u. a. bei folgenden Stoffwechselwegen eine Rolle: Inositolphosphat-Stoffwechsel, Zitratzyklus, Sphingolipid-Stoffwechsel, Cholesterinsynthese und Gallensäure-Stoffwechsel (Löffler, Petrides 2003).

Oxamat

Oxamat hemmt das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH), den letzten Schritt der Glykolyse, welcher zur Bildung von L-Laktat führt. Die Hemmung der LDH sollte daher zu einer verminderten Produktion von L-Milchsäure führen. In den hier durchgeführten Experimenten wurde die Milchsäureproduktion in MDA-MB 231 um etwa 40 % und der ATP-Gehalt sogar um etwa 74 % reduziert. Thornburg et al. fanden jedoch *in vitro* keine reduzierte Bildung von L-Laktat in Oxamat-behandelten MDA-MB 231, da Oxamat zu keiner signifikanten Hemmung der LDH führte. Oxamat scheint eher den Zitratzyklus zu hemmen (Thornburg et al. 2008). Insgesamt war die hemmende Wirkung von Oxamat nicht auf Tumorzellen beschränkt und scheint daher als allgemeines Tumorthapeutikum nicht geeignet.

5.3.2 Substanzen, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen

Rotenon

Auffallend war, dass vor allem normale Zellen, mit Ausnahme von Keratinozyten, sehr resistent gegenüber der Behandlung mit Rotenon waren. Unter den getesteten Tumorzelllinien führte Rotenon nur in der Brustkrebszelllinie MDA-MB 468 zu einer

deutlichen Reduktion des ATP-Gehaltes. Die Wirkung von Rotenon scheint daher zumindest für bestimmte Tumorzelllinien spezifisch zu sein.

Für den Wirkmechanismus von Rotenon ist zu bedenken, dass Rotenon die Atmungskette nicht vollständig hemmt. Wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben, werden im Komplex I der mitochondrialen Atmungskette Sauerstoffradikale produziert (Boveris und Chance 1973). Rotenon unterbricht die Redoxreaktion im Komplex I was letztendlich zur Bildung von Superoxid-Radikalen führt (Pitkänen und Robinson 1996). Wenn Zellen nicht in der Lage sind, der gesteigerten Radikalbildung durch antioxidative Mechanismen entgegenzuwirken, kommt es zur Apoptose in diesen Zellen (Wallace et al. 2010). Rotenon hemmt aber nur das Eisen-Schwefel (FeS)-Zentrum N2 des Komplex I. Die Gesamtfunktion der Atmungskette und die ATP-Produktion sind daher nicht vollständig unterbrochen (Lümmen 1998). Wenn das erste FeS-Zentrum im Komplex I intakt ist ergibt sich ein Nettoverlust von zwei Protonen pro NADH. Über die Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex II) werden durch FADH_2 weitere Elektronen in die Atmungskette eingespeist. Der Wirkmechanismus von Rotenon ist in Abb. 78 dargestellt.

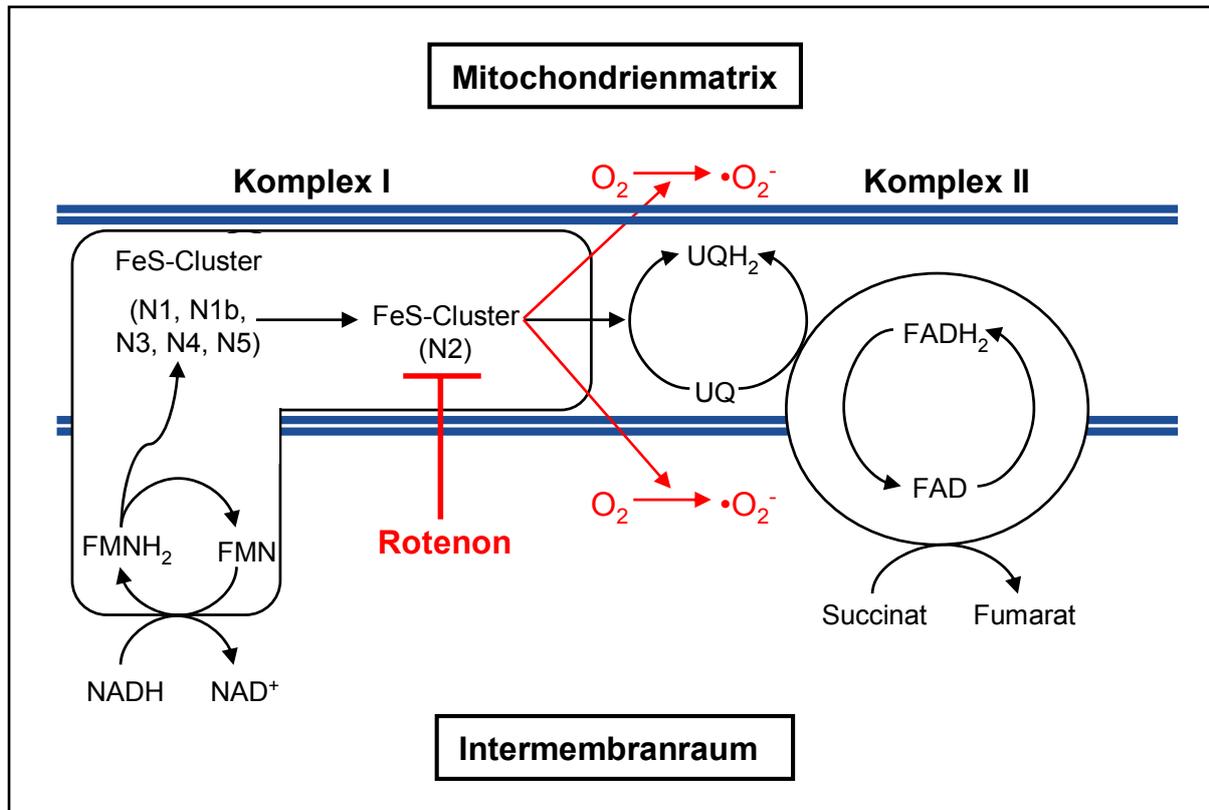


Abb. 78: Elektronentransport und Radikalbildung an Komplex I und II der Atmungskette.

Das Schema wurde basierend auf den Daten von Pitkänen und Robinson (1996) und Lümmen (1998) erstellt. Der Protonentransport ist nicht dargestellt.

Die zytotoxische Wirkung von Rotenon basiert möglicherweise eher auf einer vermehrten Radikalbildung als auf einem induzierten ATP-Mangel. Wie in der Einleitung bereits erläutert wurde, liefert der Pentosephosphatweg (PPW) NADPH für die Bildung des Antioxidans Glutathion. Ein hoher PPW-Durchsatz in Tumorzellen liefert möglicherweise genügend NADPH, um der gesteigerten Radikalbildung entgegenzuwirken. Neben seiner hemmenden Wirkung auf das Eisen-Schwefel-Zentrum N2 im Komplex I der Mitochondrien hat Rotenon auch Auswirkungen auf andere Zellstrukturen. Rotenon blockiert die Bildung des Spindelapparates während der Zellteilung (Brinkley et al. 1974). Im Tiermodell wird Rotenon zur Induktion der Parkinson-Erkrankung eingesetzt (Betarbet et al. 2000). Als lipophile Substanz passiert Rotenon ungehindert Zellmembranen und reichert sich im Fettgewebe, also auch im Gehirn, an (Di Monte 2003). Die orale Applikation von Rotenon verursachte leichte neurotoxische Schäden, die systemische Gabe führte sogar zum Tod in Tieren (Bové et al. 2005). Diese Nebeneffekte stellen einen möglichen therapeutischen Einsatz von Rotenon in Frage.

Oligomycin

Oligomycin ist ein nicht-selektiver Inhibitor und hemmt beide Funktionen der mitochondrialen ATPase, also sowohl die ATP-Synthese als auch die ATP-Hydrolyse. Die hier untersuchten Tumorzellen waren deutlich resistenter gegenüber der Behandlung mit Oligomycin im Vergleich zu den getesteten benignen Zellen. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Ramanathan et al. überein, die zeigen konnten, dass mit zunehmender Transformation von Zellen die Sensitivität gegenüber Oligomycin abnimmt (Ramanathan et al. 2005). Die Milchsäureproduktion war bei den Tumorzellen durch Oligomycin deutlich erhöht. Was den Ergebnissen von Hao et al. entspricht. Die Autoren untersuchten die Wirkung von Oligomycin auf verschiedenen Tumorzellen, die unterschiedliche Oxidations- und Glykolyseraten aufwiesen. Sie stellten fest, dass Tumorzellen mit einer hohen Respirationsrate nach Behandlung mit Oligomycin mehr Milchsäure produzierten als Tumorzellen mit geringer respiratorischer Aktivität (Hao et al. 2010). Dass die Mitochondrien der hier untersuchten Tumorzellen funktionell sind und damit neben der Glykolyse auch die oxidative Phosphorylierung zur ATP-Produktion nutzen, wurde durch die Behandlung der Zellen mit den beiden Entkopplern 2,4-DNP und Rhodamin 123 nachgewiesen, wie weiter unten erläutert wird.

Mit Ausnahme von HUVEC verminderte Oligomycin in einer Konzentration von 25 μM den ATP-Gehalt vor allem in benignen Zellen. Daher scheint diese Substanz für einen therapeutischen Einsatz ungeeignet. Weiterhin ist zu bedenken, dass Oligomycin auch die Glutaminolyse und die DNA-Synthese hemmt (Friday et al. 2011).

2,4-Dinitrophenol

Die Wirkung von 2,4-DNP auf Tumorzellen war individuell verschieden. Bei der Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 hatte 2,4-DNP so gut wie keinen Effekt auf den ATP-Gehalt. In den anderen beiden Tumorzelllinien wurde der ATP-Gehalt deutlich reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass sich DNP nicht als allgemeiner Tumoringhibitor eignet. Der Einsatz von DNP als Therapeutikum scheint dennoch möglich, da benigne Zellen resistent gegenüber der Behandlung mit DNP waren. Bei den Wiederholungsexperimenten mit Keratinozyten führte DNP in fünf von neun Experimenten jedoch zu einer kompletten ATP-Depletion, was daran liegen könnte, dass es sich bei den Wiederholungsexperimenten um unterschiedliche Passagen handelte. Die Produktion von Milchsäure in Keratinozyten wurde jedoch in keinem der durchgeführten Experimente durch DNP beeinflusst. Wie in der Einleitung bereits erläutert hängt die Wirkung von 2,4-DNP von denen der Zelle zur Verfügung stehenden Substraten ab. Durch Substrate, die vor allem in Mitochondrien oxidiert werden (z. B. Fettsäuren) bleibt die Oxidationsrate nach Behandlung mit 2,4-DNP lange stabil und die ATP-Synthese sinkt nur vorübergehend. Bei zytosolisch oxidierten Substraten (z. B. Zucker) nimmt die ATP-Synthese ab (Levere et al. 1998, Levere und Fontaine 2001, Sibille et al. 1998, Sibille et al. 2001). Es ist fraglich, ob Keratinozyten abhängig von der Kulturdauer die Fähigkeit verlieren, ihren Stoffwechselltyp anzupassen, wenn die Energiegewinnung über die oxidative Phosphorylierung blockiert ist. Dieses Phänomen wurde nicht weiter untersucht. Eine weitere Ursache könnten die unterschiedlichen Glucosekonzentrationen in den verschiedenen Zellkulturmedien sein. Das Zellkulturmedium der Tumorzellen enthält 3,1 g/l Glucose, das der Keratinozyten nur 1 g/l. Es wurde gezeigt, dass die Wirkung von DNP von der den Zellen zur Verfügung stehenden Glucosekonzentration abhängt. Nishizawa führte Experimente an Melanomzellen der Maus durch und konnte zeigen, dass alle Zellen, welche in PBS kultiviert wurden, durch die Behandlung mit DNP in Konzentrationen von 50 μM bis 500 μM nach 8 Std. starben.

Wurde der Kultur Glucose zugesetzt verlängerte sich die Überlebenszeit. Die Zugabe von 10 % FCS verhinderte sogar den zytotoxischen Effekt von Dinitrophenol (Nishizawa et al. 1979).

Auch für DNP ist zu bedenken, dass es neben seiner entkoppelnden Wirkung verschiedene Enzyme beeinflussen kann, die eine tumorspezifische Wirkung fraglich erscheinen lassen. Eine Aktivierung lysosomaler Enzyme, zytosolischer Phosphofruktokinase und Enolase (beide Glykolyse) sowie der mitochondrialen Succinatdehydrogenase (Zitratzyklus) wurden beschrieben (Andres et al. 1996).

Rhodamin 123

Die Wirkung von Rhodamin 123 war ähnlich zu der von 2,4-DNP. Nur in der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB 468 führte die Behandlung mit Rhodamin zu einer deutlichen Reduktion im ATP-Gehalt. Genau wie bei DNP reagierten Keratinozyten je nach Passage völlig gegensätzliche auf die Behandlung mit Rhodamin. Überwiegend (in sechs von acht Experimenten) führte Rhodamin aber zu einer kompletten ATP-Depletion. Die Milchsäureproduktion war durch Rhodamin 123 in allen getesteten Zellen deutlich gesteigert.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, scheint die Anreicherung von Rhodamin in Zellen von der Expressionsstärke des *mdr-1*-Gens abhängig zu sein (Brouty-Boyé et al. 1995). Zellen, die das *mdr-1*-Gen exprimieren sind resistent gegenüber Rhodamin 123. In der Arbeit von Brouty-Boyé et al. wurden auch MDA-MB 231 getestet, welche das *mdr-1*-Gen nicht exprimierten. Diese Zellen waren sehr sensitiv gegenüber Rhodamin 123 mit einer IC50 von 11 µM nach 72 Std. Inkubationszeit (Brouty-Boyé et al. 1995). In den hier durchgeführten Experimenten war der ATP-Gehalt in MDA-MB 231 nur um etwa 24 % reduziert. Die Inkubationszeit betrug im Vergleich zu den Experimenten von Brouty-Boyé hier auch nur 24 Std. und ist somit nicht direkt vergleichbar.

NaDCA

Seit der Veröffentlichung der viel versprechenden Ergebnisse von Bonnet et al. 2007 wurde DCA als Anti-Tumorsubstanz in vielen verschiedenen Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* untersucht. DCA soll den Pyruvatdehydrogenasekomplex in Mitochondrien aktivieren und so den Stoffwechsel der Tumorzellen von Glykolyse auf Oxidation umstellen, Apoptose in Krebszellen induzieren und das Tumorstadium vermindern

(Kim et al. 2006, Papandreou et al. 2006, Bonnet et al. 2007, Cairns et al. 2007). Bei den hier durchgeführten Experimenten war keine tumorselektive Wirkung von NaDCA zu beobachten. Zwar wurde der ATP-Gehalt in allen getesteten Tumorzelllinien durch NaDCA um mindestens 50 % reduziert, jedoch auch in allen getesteten benignen Zellen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Stockwin et al.. Sie untersuchten die Wirkung von DCA auf maligne und benigne Zellen und konnten keine tumorselektive Wirkung feststellen (Stockwin et al. 2010). Interessant war in den vorliegenden Untersuchungen die Beobachtung, dass bei der Magenkarzinomlinie 23132/87 und den Leukozyten der ATP-Gehalt am wenigsten durch DCA beeinflusst war, die Produktion der Milchsäure in den Magenkarzinomzellen aber doch deutlich vermindert war und in Leukozyten unverändert blieb. Aus diesen *in vitro*-Daten scheint DCA zumindest auf die Milchsäureproduktion einen therapeutisch positiven Einfluss zu haben.

Über die wirksame Konzentration von DCA *in vitro* liegen sehr unterschiedliche Daten vor. Einige Autoren fanden bei klinisch relevanten Dosen zwischen 0,5 - 1 mM DCA einen zytotoxischen Effekt (Bonnet et al. 2007), andere hingegen berichten von wirksamen Konzentrationsbereichen zwischen 10 - 100 mM (Heshe et al. 2010, Stockwin et al. 2010). Wiederum andere Arbeitsgruppen konnten keine direkte zytotoxische Wirkung von DCA *in vitro* nachweisen (Shahrzad et al. 2010). Bei uns waren 100 mM NaDCA am wirksamsten. Es ist zu bedenken, dass die hier gewonnenen *in vitro*-Daten unter normoxischen Bedingungen, also bei 21 % Sauerstoffkonzentration, gewonnen wurden, was sich deutlich von den Sauerstoffbedingungen *in vivo* unterscheidet. Hinweise, dass die Wirkung von DCA von den vorherrschenden Sauerstoffkonzentrationen abhängt fanden Shahrzad et al.. Sie untersuchten die Wirkung von DCA auf Kolonkarzinomzellen. *In vitro* induzierte DCA unter Normoxie Apoptose. Unter hypoxischen Bedingungen hingegen starben deutlich weniger Zellen (Shahrzad et al. 2010). Präklinische Untersuchungen an Nagetieren ergaben ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse. Bonnet et al. untersuchten die Wirkung von DCA auf das Lungenadenokarzinom in Ratten. DCA wurde über das Trinkwasser verabreicht und verlangsamte das Tumorstadium (Bonnet et al. 2007). *In vivo* war das Tumorstadium unter DCA-Behandlung in einem xenotransplantierten Kolonkarzinommodell aber sogar größer als in der Kontrollgruppe (Shahrzad et al. 2010).

Zudem ist die Effektivität von DCA gegenüber den verschiedenen PDK-Isoenzymen sehr unterschiedlich. PDK-2 ist am sensitivsten, PDK-3 am resistentesten (Bowker-Kinley et al. 1998). Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Proteinexpression der vier PDK-Isoenzyme ergaben eine sehr schwache Expression von PDK-2 in allen vier getesteten benignen Zellen. In den beiden Tumorzelllinien MDA-MB 231 und 23132/87 war das PDK-2-Protein stark exprimiert. Eine positive Korrelation zwischen der PDK-2-Expression und der DCA-Wirkung konnte jedoch nicht festgestellt werden. Zudem wird DCA als schwacher PDK-Inhibitor beschrieben (McFate et al. 2008). DCA interferiert aber auch mit anderen Strukturen und Syntheseschritten in der Zelle. So blockiert DCA auch die Glutathion-S-Transferase ζ (Tzeng et al. 2000), hemmt die Biosynthese von Cholesterol (Stacpoole und Greene 1992) und begünstigt oxidativen Stress (Laughter et al. 2004), was die tumorspezifische Wirkung ebenfalls fraglich macht.

Trotz der teilweise gut belegten antitumoralen Wirkung von DCA sind die Nebenwirkungen nicht zu unterschätzen. Die meisten Untersuchungen zur Wirkung von DCA stammen von Peter W. Stacpoole. Er verfasste zahlreiche Übersichtsarbeiten zu diesem Thema. Die Datenlage zur Toxizität von DCA beim Menschen ist bisher mäßig. Aus Tierexperimenten ist bekannt, dass DCA Leber, Nieren, Nervensystem, Hoden und Augen schädigen kann (Stacpoole et al. 1998 a). Die orale Gabe von 50 mg/kg Dichloracetat über mehrere Wochen führte in Ratten und Hunden zu neurotoxischen Schäden (Stacpoole 1989). Bei erwachsenen Menschen, die 25 mg/kg bzw. 50 mg/kg DCA oral oder systemisch erhalten hatten, zeigte die Hälfte der Behandelten anxiolytische oder sedierende Effekte. Erwachsene Patienten mit Hypercholesterinämie und Kinder mit angeborener Laktatazidose erhielten über mehrere Monate 50 - 100 mg/kg DCA oral. Als Nebenwirkung traten periphere Neuropathien auf, die aber reversibel waren (Stacpoole et al. 1998 b). Sprujit et al. stellten fest, dass die Nervenleitungsgeschwindigkeit unter DCA-Behandlung verlangsamt war (Sprujit et al. 2001) Es gibt bisher keine Hinweise, dass DCA beim Menschen toxische Wirkung auf Augen, Niere und Gonaden hat oder Neoplasien verursacht (Stacpoole et al. 1998 b). Brandsma et al. berichteten aber von schweren neurotoxischen Nebenwirkungen bei einem Melanompatienten mit Metastasen in Lungen und Lymphknoten, der DCA-Kapseln (15 mg/kg/Tag) eingenommen hatte (Brandsma et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Einsatz von DCA als mögliche tumorhemmende Substanz sehr präzise untersucht werden muss, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Es ist noch zu früh, um allgemeine Schlussfolgerungen über die Wirksamkeit von DCA gegen sämtliche Tumorarten zu ziehen (Papandreou et al. 2011).

5.3.3 Substanzen, die in andere wichtige Stoffwechselwege bzw. Signalwege des Stoffwechsels von Tumorzellen eingreifen

Oxythiamin

In der vorliegenden Arbeit erwies sich Oxythiamin als sehr effektiv in der Reduktion des ATP-Gehaltes in Tumorzellen auf unter 50 %. Allerdings war der ATP-Gehalt aller getesteten benignen Zellen noch deutlich stärker vermindert. Als Thiaminanalogen hemmt Oxythiamin nicht nur die Transketolase im PPW, sondern alle thiaminabhängigen Enzyme, wie Pyruvatdehydrogenase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase und α -Ketoglutaratdehydrogenase. Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums von Oxythiamin scheint eine tumorselektive Wirkung zunächst fraglich. Die hier gewonnenen *in vitro*-Daten widersprechen den viel versprechenden publizierten Ergebnissen aus *in vivo*-Experimenten. Wie in der Einleitung bereits dargestellt, führte die Applikation des Thiaminanalogs im Tiermodell zu einer Wachstumshemmung der Tumore (Ramos-Montoya et al. 2006). Interessant war die Beobachtung von Rais et al., dass die Behandlung mit Oxythiamin in einer Konzentration von 1,2 mM zwar *in vivo* das Tumorwachstum hemmte, jedoch keine Apoptose auslöste aber einen Zellzyklusstopp in der G₁-Phase bewirkte (Rais et al. 1999). Die Autoren erklären sich dieses Phänomen dadurch, dass Oxythiamin spezifisch den Stoffwechselweg blockiert, der für die Nukleotidsynthese benötigt wird aber keinen Einfluss auf Glykolyse und Energiegewinnung hat. Die von uns getestete Konzentration betrug 100 mM, also fast um den Faktor 10 höher als in der Untersuchung von Rais et al.. In geringeren Konzentrationen, wie sie in Vorversuchen eingesetzt wurden, war der ATP-Gehalt aller Zellen unverändert, erst bei 100 mM Oxythiaminkonzentration wurde der Gehalt an ATP in den Zellen deutlich vermindert. Ob geringere Konzentrationen trotz gleichbleibendem ATP-Gehalt einen Zellzyklusstopp bewirkten wurde hier nicht untersucht.

DON (6-Diazo-5-oxo-L-norleuzin)

Durch Hemmung der Glykolyse und Beeinflussung des mitochondrialen Stoffwechsels konnte in den hier durchgeführten Experimenten keine tumorselektive Wirkung beobachtet werden. In letzter Zeit ist deutlich geworden, dass die Aminosäure Glutamin für Tumorzellen ein wichtiges Substrat darstellt. Wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben, liefert Glutamin Kohlenstoff und Stickstoff für anabole Syntheseprozesse und dient als Energiesubstrat. Die Abbauprodukte von Glutamin und die gebildeten Nebenprodukte wie NADPH werden für die Synthese von Nucleinsäuren, Proteinen und Lipiden benötigt. Auch für die Bildung von reduziertem Glutathion, um den oxidativen Stress in Tumorzellen abzufangen wird Glutamin benötigt (DeBernardinis und Cheng 2010). Es wird diskutiert, ob Glutamin für manche Tumorzellen sogar essentieller ist als Glucose (Lu et al. 2010). Daher erschien es sinnvoll diesen Stoffwechselweg in Tumorzellen zu hemmen. Hier wurde DON in einer Konzentration von 1 mM getestet und ließ als einzige Substanz einen Trend für eine tumorselektive Wirkung erkennen, wenn auch der Unterschied zwischen malignen und benignen Zellen gering war.

Glutamin scheint aber nicht für alle Tumorzellen essentiell zu sein, wie Kallinowski et al. herausfanden. Sie untersuchten in Ratten mit transplantierten Brusttumoren die Glutaminaufnahme. Nur in 13 von 65 untersuchten Tumoren wurde eine Nettoaufnahme von Glutamin festgestellt (Kallinowski et al. 1987).

Zudem ist Glutamin aber auch für benigne Zellen ein wichtiges Substrat. Ein hoher Glutaminverbrauch wurde für normale Brustzellen beschrieben (Collins et al. 1998). Für die Funktion von Immunzellen ist Glutamin ebenfalls essentiell. Es beeinflusst die Proliferation von Lymphozyten, Zytokinproduktion und Phagozytoseaktivität von Makrophagen (Newsholme 2001). Möglicherweise lässt sich die tendenzielle tumorselektive Wirkung dadurch erklären, dass benigne Zellen den Glutaminmangel besser kompensieren können. Dagegen sprechen jedoch Ergebnisse von Unterluggauer et al., welche die Wirkung von DON auf humane Endothelzellen (HUVEC) und Fibroblasten untersuchten. Hierbei waren HUVEC deutlich sensitiver gegenüber dem Glutaminanalogon und wurden apoptotisch. In Fibroblasten wurde keine Apoptose induziert (Unterluggauer et al. 2008).

Für die hier gewonnenen Ergebnisse ist zu bedenken, dass der Abbau von Glutamin zu Pyruvat (= Glutaminolyse) nur in Anwesenheit von Sauerstoff stattfindet. *In vivo* herrscht in den Tumoren oft Sauerstoffmangel und Glutamin kann nicht als Substrat

genutzt werden. Die meisten Studien, in denen Glutamin als Hauptlieferant für die Energiegewinnung beschrieben wurde, fanden *in vitro* unter gut oxygenierten Kulturbedingungen statt (Reitzer et al. 1979) und sind daher nur bedingt aussagekräftig.

Metformin

Das Antidiabetikum Metformin, welches die AMP-Kinase aktiviert, führte in einer Konzentration von 5 mM bei den Tumorzellen nur in MDA-MB 468 zu einem um 50 % reduzierten ATP-Gehalt. Auffällig war die Beobachtung, dass Metformin in Keratinozyten eine komplette ATP-Depletion bewirkte. Jedoch konnten bereits Saha et al. zeigen, dass die Aktivierung der AMPK in Keratinozyten deren Wachstum hemmte, was diesen Befund erklärbar macht (Saha et al. 2006). Dass Metformin in dem hier verwendeten Versuchsprotokoll auf MDA-MB 231 keinen Effekt zeigte, liegt möglicherweise an einer zu kurzen Behandlungsdauer. In einem *in vitro*-Experiment von Phoenix et al. wurden MDA-MB 231 mit 5 mM Metformin behandelt. Erst nach einer Inkubationszeit von 64 Std. war das Wachstum signifikant um 29 % reduziert gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Phoenix et al. 2009). Völlig gegensätzlich zu den *in vitro*-Daten sind die Ergebnisse eines orthotopen Mausmodells für Mammakarzinom. Die orale Verabreichung von Metformin über das Trinkwasser bewirkte hier ein gesteigertes Tumorstadium im Vergleich zur Kontrollgruppe. Interessanterweise waren die Tumore der metforminbehandelten Mäuse auch stärker vaskularisiert (Phoenix et al. 2009).

Zakikhani et al. konnten zeigen, dass Metformin das Wachstum von Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinomzellen hemmte, aber auch das von nichttransformierten humane Brustepithelzellen. Erst ab einer Konzentration von 10 mM wurde die Zellproliferation um 50 % gehemmt (Zakikhani et al. 2006).

Dass Metformin gegenüber den Tumorzelllinien MDA-MB 231 und 23132/87 unwirksam war, könnte auch an einer zu geringen Konzentration liegen. Alimova et al. beobachteten erst bei 50 mM Metformin und nach einer Inkubationszeit von 72 Std. ein vermindertes Wachstum von Brustkrebszellen (Alimova et al. 2009). Ähnliche hohe Konzentrationen und 72 Std. Inkubationszeit waren notwendig, um das Wachstum von tripelnegativen Brustkrebszellen MDA-MB 468 und MDA-MB 231 *in vitro* zu hemmen. Im Langzeitexperiment wurden die Zellen für 2 - 3 Wochen mit

Metformin inkubiert. Hier genügten Konzentrationen zwischen 1 und 5 mM für eine signifikante Reduktion der Zellproliferation (Liu et al. 2009).

Ein weiterer Faktor, der die Wirkung von Metformin beeinflusst, scheint die Konzentration von Glucose im Zellkulturmedium zu sein. Buzzai et al. konnten zeigen, dass Metformin *in vitro* nur unter Glucosemangel zu einer signifikant verminderte Zellvitalität in metforminbehandelten Kolonkarzinomzellen führte (Buzzai et al. 2007). Weiterhin scheint die Zelldichte von Bedeutung zu sein wie Isakovic et al. *in vitro* an Glioblastomzellen zeigen konnten. Bei geringer Aussaatdichte blockierte Metformin das Zellwachstum durch einen Zellzyklusstopp in der G₀/G₁-Phase. Erreichten Glioblastomzellen das konfluente Stadium induzierte Metformin Apoptose. Primäre Astrozyten waren weitgehend resistent gegenüber Metformin (Isakovic et al. 2007).

Perifosin

In den hier durchgeführten *in vitro*-Experimenten wurde deutlich, dass Perifosin keine selektive Wirkung auf Tumorzellen hat. Bei den benignen Zellen führte Perifosin in HUVEC und Keratinozyten zu einer kompletten ATP-Depletion. Für die Brustkrebszelllinie MDA-MB 468 waren die Ergebnisse sehr uneinheitlich und lassen keine Aussage über die Wirksamkeit zu. Die Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 war gegenüber der Behandlung mit 50 µM Perifosin völlig resistent. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu dem von Hilgard et al.. Die Autoren fanden eine mittlere Hemmkonzentration (*Inhibitory Concentration 50* = IC₅₀) für Perifosin von 13,1 µM auf MDA-MB 231 (Hilgard et al. 1997). Allerdings wurde für die Bestimmung ein anderer Vitalitätstest (Koloniebildungstest) verwendet und ist daher mit den hier erzielten Ergebnissen nicht vergleichbar.

Perifosin interferiert mit mehreren Zellstrukturen, die nicht nur für Tumorzellen spezifisch sind, wodurch sich die Effekte auf benigne Zellen erklären lassen könnten. Neben dem PI3K/Akt-Signalweg sind für Perifosin weitere Wirkmechanismen in der Literatur beschrieben. Perifosin hemmt die CTP:Phosphocolin Cytidyltransferase, das Schlüsselenzym der Phosphatidylcholinsynthese, was schließlich zur Apoptose führt (Vink et al. 2006). Ein weiterer Mechanismus scheint die Hemmung der phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) zu sein. Dadurch wird Phosphatidyl-4,5-bisphosphat (PIP₂) nicht durch die PI-PLC in die beiden Produkte Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) gespalten (Maly et al. 1995).

Sorafenib

Angriffspunkte des Multikinaseinhibitors Sorafenib sind Angiogenese und Zellproliferation (Greil und Micksche 2006). In der vorliegenden Arbeit führte Sorafenib in einer Konzentration von 10 μM in den drei getesteten Tumorzelllinien zu einer ATP-Reduktion zwischen 40 % und 60 %. HUVEC und Keratinozyten waren aber noch deutlich sensitiver gegenüber Sorafenib als die untersuchten Tumorzellen. Wilhelm et al. konnten an humanen Gefäßendothelzellen (HUVEC) zeigen, dass die Phosphorylierung des Endothelzellrezeptors VEGFR-2 durch Sorafenib unterbunden wird (Wilhelm et al. 2004). Ob dies Auswirkungen auf die Zellvitalität hatte, wurde nicht angegeben. In den hier durchgeführten Experimenten fand sich *in vitro* ein deutlich verminderter ATP-Gehalt in HUVEC.

In Untersuchungen von Wilhelm et al. war Sorafenib sehr effektiv gegenüber MDA-MB 231 mit einer IC_{50} von 2,6 μM bei 72 Std. Inkubationszeit basierend auf Messungen des ATP-Gehaltes. Für diese Zelllinie wurden Mutationen von KRAS und BRAF im MAP-Kinase-Signalweg beschrieben (Wilhelm et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde Sorafenib (10 μM) nur für 24 Std. auf den Zellen belassen und führte in MDA-MB 231 zu einem auf 63 % reduzierten ATP-Gehalt. Die Ergebnisse sind somit nicht direkt vergleichbar.

Abhängig von der Konzentration fanden Rose et al. gegensätzliche Effekte von Sorafenib auf Blasenkarzinomzelllinien. In niedrigen Konzentrationen $< 1 \mu\text{M}$ zeigte Sorafenib stimulierende Effekte auf Zellproliferation und -migration. Konzentrationen $> 3 \mu\text{M}$ hemmten das Zellwachstum (Rose et al. 2010).

Letztlich war jedoch auch für Sorafenib *in vitro* keine selektive Wirkung auf Tumorzellen festzustellen.

Sorafenib ist als Medikament für verschiedene Tumorentitäten zugelassen und wird als gut verträglich beschrieben. Dennoch können starke Nebenwirkungen auftreten, da die Wirkungsweise von Sorafenib nicht tumorspezifisch ist. Im Extremfall muss die Behandlung mit Sorafenib wegen schwerwiegenden Nebenwirkungen sogar abgebrochen werden. Die häufigsten Nebenwirkungen betreffen den Gastrointestinaltrakt und die Haut (Greil und Micksche 2006). Eine gefürchtete Nebenwirkung ist das Hand-Fuß-Syndrom, eine mit Schwellung und Rötung einhergehende Hautveränderung, die im schlimmsten Fall zu schmerzhaften Blasen und Hautablösungen führt (Iijima et al. 2011). Weiterhin verursacht Sorafenib hämatologische Nebenwirkungen, vor allem Neutropenie und Thrombozytopenie

(Schutz et al. 2011). In der klinischen Praxis wird die Verträglichkeit von Sorafenib dennoch als gut eingestuft (Greil und Micksche 2006).

5.3.4 Kombination von Substanzen

Durch die Manipulation einzelner Stoffwechselwege in Tumorzellen konnte mit den hier eingesetzten Substanzen keine tumorspezifische Wirkung erreicht werden. Eine effektive Reduktion des ATP-Gehaltes in Tumorzellen konnte nur bei sehr hohen Konzentrationen der verwendeten Substanzen erreicht werden, die für alle getesteten benignen Zellen deutlich toxischer waren (mit Ausnahme von DON). Vor dem Hintergrund, dass Tumorzellen in ihrem Stoffwechsel sehr flexibel sind und sowohl Glykolyse als auch oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung nutzen können, reicht es wahrscheinlich nicht aus, nur einen Stoffwechselweg zu hemmen. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit die Manipulation des Glucosestoffwechsels in Tumorzellen war, wurde untersucht, ob durch eine gleichzeitige Manipulation von Glykolyse und mitochondrialem Stoffwechsel mit weniger toxischen Konzentrationen der Substanzen, eine tumorselektive Wirkung erreicht werden kann.

Kombinationen mit DCA

Zum einen wurde DCA, als Aktivator der oxidativen Phosphorylierung, in Kombination mit Hemmstoffen der Glykolyse bzw. des Pentosephosphatweges getestet.

DCA antagonisierte die ATP-depletierende Wirkung von 2-DG in den beiden Tumorzelllinien MDA-MB 231 und 23132/87. Daraus lässt sich schließen, dass in diesen Zellen die oxidative Phosphorylierung nicht beeinträchtigt ist. In allen getesteten benignen Zellen wurde die Wirkung von 2-DG durch DCA ebenfalls signifikant abgeschwächt. Den größten Effekt auf die Verminderung des ATP-Gehaltes wurde durch die Kombination DCA + Oxythiamin erreicht. In allen drei getesteten Tumorzelllinien wurde eine synergistische Wirkung beobachtet. Unter den benignen Zellen waren Fibroblasten und HUVEC durch diese Kombination nur mäßig beeinträchtigt. Leukozyten und Keratinozyten reagierten hingegen sogar noch sensibler auf die kombinierte Behandlung von DCA mit Oxythiamin. Daraus lässt sich schließen, dass der Pentosephosphatweg für die Vitalität von Tumorzellen und auch für manche normalen Körperzellen von großer Bedeutung ist. Daher stellt die

simultane Hemmung mehrerer Stoffwechselwege, von unseren Ergebnissen her betrachtet, ebenfalls keinen Ansatz für eine zielgerichtete Tumorthherapie dar.

Kombinationen mit Rotenon

In einem anderen Ansatz wurde durch Rotenon die oxidative Phosphorylierung gehemmt und gleichzeitig die Glykolyse bzw. der Pentosephosphatweg.

Bei den hier durchgeführten *in vitro*-Experimenten ergab sich für MDA-MB 231 und 23132/87 ein synergistischer Effekt auf die ATP-Depletion unter der Behandlung mit Rotenon + 2-DG. Jedoch wurde durch diese Behandlung der ATP-Gehalt in allen getesteten benignen Zellen noch deutlich stärker reduziert. Im Gegensatz dazu fanden Fath et al. eine tumorselektive Wirkung unter der kombinierten Behandlung von Rotenon + 2-DG. In Kolonkarzinomzellen führte die kombinierte Behandlung der Zellen mit 2-DG und Rotenon zu einem stärkeren zytotoxischen Effekt als die jeweilige Einzelbehandlung. Normale Fibroblasten blieben durch die kombinierte Behandlung vital. Auch *in vivo* ergab sich ein synergistischer Effekt von 2-DG und Rotenon. Die Inkubationszeiten bei kombinierter Behandlung *in vitro* betrug 24 Std. für 2-DG und 2 Std. für Rotenon (Fath et al. 2009). In der hier durchgeführten Arbeit wurden beiden Substanzen für 24 Std. auf den Zellen belassen. Daher sind die unterschiedlich erzielten Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar.

Auf MDA-MB 468 hatte nur die kombinierte Behandlung von Rotenon + Oxamat eine synergistische Wirkung. Es wurde jedoch klar, dass der synergistische Effekt, ungeachtet der Angriffspunkte der einzelnen Substanzen, in allen getesteten benignen Zellen noch deutlich stärker ausgeprägt war. Aus diesen *in vitro*-Daten scheint die gleichzeitige Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und der Glykolyse ebenfalls keine tumorselektive Therapie zu sein.

Lampidis et al. konnten nachweisen, dass die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung durch Rhodamin 123 (1,3 nM) zusammen mit der Blockade der Glykolyse durch 2-DG (300 µM) *in vitro* selektiv das Wachstum von MCF-7-Tumorzellen stoppte (Lampidis et al. 1983). In diesen Experimenten waren die Konzentrationen jedoch deutlich geringer, aber die Inkubationszeit betrug 2 Wochen. Bernal et al. untersuchten *in vivo* die Wirkung der gleichzeitigen Hemmung von Glykolyse durch 2-DG und der oxidativen Phosphorylierung durch Rhodamin 123. Die kombinierte Behandlung (39 µM/kg KG Rhodamin 123 + 3 µM/kg KG 2-DG)

verlängerte das Überleben von Mäusen, denen Ehrlich's Aszites Tumorzellen bzw. Zellen der Blasenkarzinomlinie MB49 implantiert wurden (Bernal et al. 1983).

Als weitere Möglichkeit könnten gleichzeitig Zucker- und Glutaminstoffwechsel gehemmt werden. Seyfried und Shelton sehen diese Möglichkeit in Kombination mit einer kalorienbegrenzten Diät als sinnvolle Maßnahme sowohl für eine Tumorthherapie als auch für die Prävention an (Seyfried und Shelton 2010).

Die alleinige Blockade eines bestimmten Stoffwechselweges genügt wahrscheinlich nicht, um einen antitumoralen Effekt zu erzielen. Obwohl Glucose für viele Tumorzellen die Hauptenergiequelle darstellt, ist es dennoch möglich, dass diese Zellen auch alternative Wege zur Energiegewinnung nutzen. In Prostatakarzinomzellen ist z. B. die Oxidation von Fettsäuren der vorherrschende energieliefernde Weg (Liu 2006). Zudem gibt es Hinweise, dass Tumorzellen in der Lage sind, verschiedene Energiequellen zu nutzen, je nach aktueller Verfügbarkeit an Nährstoffsubstraten (Buzzai et al. 2005). Diese Vielseitigkeit des Tumormetabolismus lässt die Kombination von Substanzen mit verschiedenen Angriffspunkten sinnvoll erscheinen, muß aber für jede Tumorentität individuell ausgetestet werden.

5.4 Charakterisierung der verwendeten malignen und benignen Zellen

5.4.1 Quantifizierung der Glucoseaufnahme

Ein charakteristisches Merkmal von vielen Tumorzellen ist deren gesteigerte Glucoseaufnahme, die im Vergleich zu normalen Zellen um das bis zu 10-fache gesteigert sein kann (Czech et al. 2000). Jedoch haben auch normale schnell proliferierende Zellen eine erhöhte Zuckeraufnahme (Doughty et al. 2006). Zur Charakterisierung der in dieser Arbeit untersuchten Zellen wurden diese hinsichtlich ihrer Aufnahmekapazität an Glucose untersucht.

Auffallend war die Glucoseaufnahme in den beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231. Letztere ist in der Literatur als aggressiver und invasiver beschrieben (Zhang et al. 1991). Mit fortschreitender maligner Transformation von Tumorzellen steigt auch die Glucoseaufnahme und die Laktatproduktion (Ramanathan et al. 2005). Dies konnte hier für die Brustkrebszelllinien nicht bestätigt werden, da die Glucoseaufnahme der aggressiveren Zelllinie MDA-MB 231 signifikant geringer war als in der weniger aggressiven Zelllinie MDA-MB 468.

In monozytären Zellen wurden großen Schwankungen in der Glucoseaufnahme beobachtet. Es ist bekannt, dass alle proliferierenden Zellen (maligne und benigne) eine gesteigerte Glykolyse aufweisen, da hierdurch Bausteine für DNA- und Phospholipidsynthese generiert werden. Isolierte Blut-Lymphozyten sind nicht mehr teilungsaktiv und benötigen daher keine Metaboliten für die Zellteilung. Monozyten stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die sich u. a. in der Expression von Oberflächenrezeptoren (Nunez et al. 1984, Schreiber et al. 1983, Wang et al. 1992), Phagozytoseaktivität (Khansari und Fudenberg 1984, Wang et al. 1992) und Zytokinproduktion (Elias et al. 1987, Frankenberger et al. 1996) unterscheiden. Die stark unterschiedliche Glucoseaufnahme lässt sich wahrscheinlich auf die Existenz von funktionell verschiedenen Subpopulationen zurückführen, zwischen denen hier nicht unterschieden wurde sowie auf deren unterschiedlichen Aktivitätszustand.

5.4.2 Immunhistochemische Charakterisierung

In glykolytischen Tumorzellen werden bestimmte Enzyme und Transportproteine verstärkt exprimiert (siehe Abschnitt 1.2.3). Dazu zählen die Serin/Threonin-Kinase Akt, die M2-Isoform der Pyruvatkinase, der Glucosetransporter GLUT-1 und der Laktattransporter MCT-1. Deren Expressionsmuster wurde immunhistochemisch in benignen und malignen Zellen untersucht.

Die phosphorylierte und damit aktivierte Form von Akt (pAkt) wurde in allen drei hier untersuchten Tumorzelllinien zytoplasmatisch detektiert. Eine sehr starke nukleäre Färbung fand sich in den beiden Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231, teilweise auch in der Magenkarzinomlinie. Schmidt et al. fanden in Tumorgewebe eine stärkere Expression von pAkt im Vergleich zu normalem Brustgewebe (Schmidt et al. 2010). In den hier untersuchten benignen Zellen, HUVEC und Keratinozyten, wurde pAkt ähnlich stark wie in den untersuchten Tumorzellen exprimiert. In Fibroblasten und Leukozyten war pAkt nur schwach exprimiert. Andere Arbeitsgruppen fanden in normalem Gewebe keine pAkt-Expression (Sun et al. 2001, Wu et al. 2008). Dass pAkt hier in normalen Zellen detektiert wurde könnte darin liegen, dass diese Zellen isoliert und nach Zellkultur untersucht wurden und nicht in ihrem natürlichen Gewebeverband. Daher könnte die starke Expression einen *in vitro*-bedingten Artefakt darstellen.

Für M2-PK wurde in der vorliegenden Arbeit eine sehr starke zytoplasmatische Färbung sowohl in benignen als auch malignen Zellen nachgewiesen. Die

Expression der M2-Isoform wird als Ursache für den Warburg-Effekt während der Tumorentstehung diskutiert (Christofk et al. 2008). Schmidt et al. fanden in ihren Untersuchungen an malignem und benignem Brustgewebe, eine stärkere Expression für M2-PK im Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Brustgewebe (Schmidt et al. 2010). Die hier gefundenen Ergebnisse werden durch eine aktuelle Arbeit von Bluemlein et al. bestätigt. Die Expression der M2-Isoform wurde in einer Reihe von Tumorzelllinien, malignen Tumorgeweben und den dazugehörigen benignen Kontrollgeweben mittels Massenspektrometrie quantifiziert. In allen analysierten Tumorproben war die Isoform M2 der Pyruvatkinase die vorherrschende Form, jedoch war M2-PK auch in den dazugehörigen benignen Gewebeproben die dominante Form (Bluemlein et al. 2011). Die Autoren vermuten, dass die Aktivität und nicht primär die Expression der M2-PK Ursache für den Warburg-Effekt ist.

Der Glucosetransporter GLUT-1 war in den hier durchgeführten Untersuchungen auf allen drei getesteten Tumorzelllinien sehr stark exprimiert. Eine erhöhte Expression des Glucosetransporters fanden auch Schmidt et al. auf Tumorgewebe der Brust (Schmidt et al. 2010). Immunhistochemische Untersuchungen von Zamora-León an humanen Gewebeschnitten ergaben, dass der Glucosetransporter GLUT-1 auch auf normalem Brustgewebe aber deutlich stärker auf Karzinomgewebe exprimiert war. (Zamora-León et al. 1996). Dies stimmt mit den hier gefundenen Ergebnissen überein. In den hier untersuchten Keratinozyten wurde für GLUT-1 eine deutliche membranständige Färbung nachgewiesen, auf den drei getesteten Tumorzellen war die Färbung aber um ein vielfaches stärker.

Eine deutliche Expression von MCT-1 wurde in den hier untersuchten HUVEC sowohl zytoplasmatisch als auch membranständig detektiert. Dies stimmt mit den Untersuchungen von Froberg et al. überein, die die Expression des Monocarboxylattransporters MCT-1 an benignen und malignen humanem Gehirngewebe untersuchten. In benignen Gewebeschnitten war MCT-1 vor allem in Blutgefäßzellen gefärbt (Froberg et al. 2001). MCT-1 war in allen drei hier untersuchten Tumorzelllinien (Magenkarzinomlinie 23132/87, MDA-MB 468 und MDA-MB 231) stark exprimiert. Dies widerspricht den Untersuchungen von Asada et al., die zeigen konnten, dass das MCT-1-Gen in MDA-MB 231 durch Methylierung stillgelegt ist und daher nicht detektierbar sein sollte (Asada et al. 2003). In den beiden getesteten Brustkrebszelllinien war MCT-1 vor allem nukleär, in MDA-MB 231 auch zytoplasmatisch und in MDA-MB 468 auch deutlich membranständig exprimiert.

Histologische Untersuchungen in einem humanen Gewebearray von Pinehiro et al. ergaben für Brusttumorgewebe eine überwiegend zytoplasmatische Färbung für MCT-1. In etwa 20 % der Tumore wurde MCT-1 in der Plasmamembran lokalisiert (Pinheiro et al. 2010). In einer Übersichtsarbeit berichtet Ganapathy von widersprüchlichen Daten bzgl. der MCT-1-Expression in Tumorzellen. Manche Studien zeigten eine erhöhte Expression, hingegen andere Studien ergaben keine gesteigerte Expression des Monocoboxylattransporters (Ganapathy et al. 2009), was auch zu unseren Daten passen könnte.

HIF-1 α wurde hier in allen drei getesteten Tumorzellen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert. HIF-1 α wurde auch in allen hier untersuchten benignen Zellen detektiert. Dass HIF-1 α auch in benignen Geweben exprimiert wird zeigten immunhistochemische Untersuchungen von Monsef et al.. Ihre Analysen an humanen Geweben zeigten, dass HIF-1 α sowohl im Prostatakarzinom als auch in benigner Prostatahyperplasie zytoplasmatisch detektiert werden konnte (Monsef et al. 2010). Untersuchungen von van der Groep et al. ergaben, dass bei erblich bedingtem Brustkrebs HIF-1 α in 90 % der untersuchten Gewebe überexprimiert war, bei sporadisch aufgetretenen Brustkrebserkrankungen in nur 44 % der Fälle. Die Autoren fanden zudem eine negative Korrelation zwischen der Expression von HIF-1 α und der Expression von Estrogen-, Progesteron- und Her-2/*neu*-Rezeptor (van der Groep et al. 2008). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die hier verwendeten Brustkrebszelllinien MDA-MB 468 und MDA-MB 231 sind als tripel negativ (TN) charakterisiert, d. h. die oben genannten Rezeptoren sind auf diesen Zellen nicht exprimiert (Liu et al. 2009). In diesen beiden Brustkrebszelllinien wurde eine sehr starke Expression von HIF-1 α detektiert.

5.4.3 Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren HIF, Glucosetransporter und Glyoxalasen

Charakteristisch für das Mikromilieu solider Tumore *in vivo* sind starke Schwankungen in der Sauerstoffkonzentration. Bei Experimenten in Zellkultur sind Nährstoffe und Sauerstoff reichlich vorhanden und bilden daher nicht die *in vivo*-Situation für Tumorzellen ab. Auch der Großteil der vorliegenden Untersuchungen musste bei normoxischen Bedingungen in einem normalen Zellkulturlabor durchgeführt werden. Erst kurz vor Abschluss der Arbeit stand durch Neubeschaffung ein Hypoxiearbeitsplatz zur Verfügung. Mit dessen Hilfe konnte der

Einfluss von Hypoxie auf verschiedene Glucosetransporter (GLUT-1 bis GLUT-5), die hypoxie-induzierbaren Faktoren 1 und 2 (HIF-1 α , HIF-2 α), sowie die Glyoxalasen 1 und 2 auf mRNA-Ebene untersucht werden. Auf Proteinebene wurde der Einfluss von Hypoxie auf Laktatdehydrogenase A und verschiedene Isoenzyme der Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK-1 bis PDK-5) analysiert.

mRNA-Expression der Glucosetransporter GLUT-1 bis GLUT-5

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA-Expression des Glucosetransporters GLUT-1 durch Hypoxie bei den drei getesteten Tumorzellen nur in MDA-MB 231 deutlich gesteigert. In einem kobaltchlorid-induzierten Hypoxiemodell konnte in MDA-MB 231 auf mRNA-Ebene keine gesteigerte Expression festgestellt werden, jedoch auf Proteinebene (Chen et al. 2010). Quantitative PCR-Analysen ergaben für MDA-MB 231 eine gesteigerte GLUT-1-Expression in MDA-MB 231 unter hypoxischen Bedingungen (Robey et al. 2005).

Zamora-León et al. untersuchten die Expression der Glucosetransporter 1 - 5 auf Proteinebene und immunhistochemisch in MDA-MB 468. Sie fanden eine sehr starke Expression für GLUT-1, 2 und 5. GLUT-4 wurde nur sehr schwach exprimiert (Zamora-León et al. 1996). Die hier durchgeführten Expressionsanalysen ergaben teilweise andere Ergebnisse. Eine starke mRNA-Expression wurde für GLUT-1 und GLUT-4 gefunden. GLUT-3 war etwas schwächer exprimiert. Die geringste Expressionsstärke wiesen GLUT-2 und GLUT-5 auf. Untersuchungen an der C6-Gliomzelllinie der Ratte ergaben, dass unter Hypoxie die Transkriptionsrate für GLUT-1 um das 2,5fache anstieg (Stein et al. 1995). Eine gesteigerte Expression durch Sauerstoffmangel konnte hier bei den Tumorzellen jedoch nur in der Brustkrebszelllinie MDA-MB 231, bei den benignen Zellen auch in Leukozyten und HUVEC beobachtet werden.

Der Glucosetransporter GLUT-2 besitzt eine geringe Affinität für Glucose (Johnson et al. 1990). Die Magenkarzinomlinie 23132/87 zeigte eine auffallend starke Expression dieses Glucosetransporters unter normoxischen Bedingungen, was mit der gefundenen sehr hohen Glucoseaufnahme korrelierte (siehe 4.8.1). In Leukozyten stieg die Expression unter hypoxischen Bedingungen massiv an. Wu et al. untersuchten die mRNA-Expression von GLUT-2 in 23 verschiedenen primären Zellen und Zelllinien. In der humanen Hepatomzelllinie HepG2 fand sich die stärkste mRNA-Expression von GLUT-2 unter normoxischen Bedingungen, gefolgt von

Hep3B. In allen anderen getesteten Tumorzellen, u. a. MDA-MB 231, war GLUT-2 nicht exprimiert (Wu et al. 2008), was mit unseren Ergebnissen übereinstimmt.

GLUT-3-mRNA wird ubiquitär in allen humanen Geweben exprimiert und besitzt die höchste Affinität für Glucose unter den Glucosetransportern 1 - 4 (Uldry und Thorens 2004). Eine starke Expression wurde hier vor allem auf Fibroblasten, HUVEC und Keratinozyten gefunden, die durch Hypoxie nicht weiter gesteigert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass diese Zellen auf Glucose als Energiesubstrat angewiesen sind. Auch die als sehr invasiv beschriebene Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 zeigte eine starke GLUT-3-Expression. In quantitativen PCR-Analysen konnte eine gesteigerte Expression des Glucosetransporters in MDA-MB 231 durch Hypoxie beobachtet werden (Robey et al. 2005). Burgman et al. untersuchten die Glucoseaufnahme und die Regulation der Glucosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 in MCF-7-Zellen. Sie fanden zwar eine gesteigerte Glucoseaufnahme unter Hypoxie, auf Proteinebene waren aber keine Veränderungen bei den beiden Glucosetransportern zu beobachten (Burgman et al. 2001). Wie oben bereits erwähnt besitzt der Promotor des *GLUT-3*-Gens ein *hypoxia-responsive element*. Hier wurde unter hypoxischen Kulturbedingungen die mRNA-Expression in MDA-MB 231 nur leicht und in Leukozyten massiv gesteigert.

Der Glucosetransport über GLUT-4 ist insulinabhängig (Uldry und Thorens 2004). Auf allen drei getesteten Tumorzellen wurde GLUT-4 stark exprimiert. Das Tumorsuppressorgen p53 bewirkt eine Herunterregulation von GLUT-4 (Schwartzberg-Bar-Yoseph et al. 2004). Da p53 in vielen Tumorzellen defekt ist exprimieren diese wahrscheinlich verstärkt GLUT-4. In den getesteten benignen Zellen, mit Ausnahme der Leukozyten, war GLUT-4 nur sehr schwach exprimiert. Für Leukozyten ist die Expression von GLUT-4 beschrieben (Calder et al. 2007).

Der Glucosetransporter 5 transportiert vor allem Fructose (Burant et al. 1992). Auffallend war die geringe Expression dieses Transporters in allen drei getesteten Tumorzelllinien und eine starke Expression in den benignen Zellen. Higashi et al. analysierten die Expression von GLUT-5. In immunhistochemischen Untersuchungen wurde GLUT-5 in Fibroblasten des Pankreas und der duodenalen Submucosa gefunden. 46 % der untersuchten Pankreastumorgewebe von Patienten waren positiv für GLUT-5. In einem kommerziellen Multitumorblock zeigte Brustkrebsgewebe ebenfalls eine positive Färbung für GLUT-5 (Higashi et al. 1997).

Dies deutet darauf hin, dass manche Tumore auch Fructose als alternatives Energiesubstrat aufnehmen können.

mRNA-Expression von HIF-1 α und HIF-2 α

In allen adhärent wachsenden Zellen wurde eine hohe mRNA-Expression von HIF-1 α und HIF-2 α auch bei 21 % Sauerstoffgehalt detektiert. Sauerstoffmangel (5 % O₂) bewirkte in adhärent wachsenden benignen Zellen sowie in allen drei Tumorzelllinien keine gesteigerte mRNA-Expression. Diese Beobachtungen stimmen mit den Daten aus der Literatur überein, die eine konstitutive mRNA-Expression für HIF-1 α und HIF-2 α in zahlreichen humanen Geweben und Zelllinien zeigten und durch Hypoxie nicht weiter gesteigert wurden (Huang et al. 1996; Wiesener et al. 1998; Kallio et al. 1997). Bei Leukozyten konnte auf mRNA-Ebene unter Normoxie keine Expression von HIF detektiert werden. Unter hypoxischen Bedingungen war HIF-1 α - und HIF-2 α -mRNA nachweisbar. Dies könnte dafür sprechen, dass HIF in Leukozyten durch Hypoxie in der Tat induziert wird, was den Namen „Hypoxie induzierbarer Faktor“ erklärt. Blancher et al. untersuchten ebenfalls die mRNA-Expression von HIF-1 α und HIF-2 α in MDA-MB 468 und MDA-MB 231. Bei 20 % Sauerstoff war HIF-1 α -mRNA in beiden Brustkrebszelllinien stark exprimiert. Für HIF-2 α hingegen fanden sie nur eine schwache Expression (Blancher et al. 2000). Die Regulation der Expression und Aktivität von HIF-1 α erfolgt auf mehreren Ebenen. Dazu gehören mRNA- und Proteinexpression, Kernlokalisierung und Transaktivierung (zur Übersicht siehe Semenza 2000). Wang et al. beschrieben in ihrer Arbeit, dass sowohl die mRNA- als auch Proteinmenge von HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen (1 % Sauerstoff) anstiegen (Wang et al. 1995). Eine deutliche Induktion von HIF-1 α -mRNA wurde in HeLa-Zellen beobachtet, die unter 95 % N₂ und 5 % CO₂ kultiviert wurden (Anderson et al. 2009). HIF-2 α wird ebenfalls v. a. auf Proteinebene reguliert (Wiesener et al. 1998). Unter normoxischen Bedingungen ist HIF-Protein instabil und wird im Proteasom abgebaut (Wiesener et al. 1998, Huang et al. 1998). In den hier durchgeführten Experimenten wurden die Zellen bei 5 % Sauerstoffgehalt für 24 Std. kultiviert. Dies entspricht den Sauerstoffbedingungen, die am Kapillarende herrschen. Möglicherweise ist die Sauerstoffkonzentration von 5 % noch zu hoch, um die Expression von HIF zu steigern. In soliden Tumoren herrschen variable Sauerstoffkonzentrationen und reichen von 5 % in gut durchbluteten Regionen bis hin zur Anoxie im Bereich nekrotischer Areale (Brown und Wilson 2004; Goda et al.

1997; Vaupel et al. 1991). Im Durchschnitt beträgt die Sauerstoffkonzentration etwa 1 %, was als Hypoxie bezeichnet wird.

5.4.4 Einfluss von Hypoxie und Normoxie auf die Protein-Expression von Laktatdehydrogenase-A und Pyruvatdehydrogenase-Kinase 1 bis 4

Protein-Expression von LDH-A

In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigten die adhärent wachsenden benignen Zellen unter normoxischen Bedingungen eine ähnlich starke Proteinexpression von LDH wie in den beiden Tumorzelllinien MDA-MB 231 und 23132/87. Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Beobachtungen fanden Weinberg und Chandel nur eine schwache Expression von LDH in normalen Zellen unter aeroben Bedingungen (Weinberg und Chandel 2009). Balinsky et al. untersuchten die Expression verschiedener Isoenzyme der LDH in normalem Brustgewebe, benignen und malignen Läsionen humaner Brustgewebe. LDH-A war im Tumorgewebe deutlich stärker exprimiert (Balinsky et al. 1983). Die Proteinexpression wurde durch Sauerstoffmangel in MDA-MB 468 nur leicht gesteigert. In MDA-MB 231 war sie sogar vermindert. Blancher et al. untersuchten den Einfluss von Hypoxie auf die mRNA-Expression und Aktivität von LDH-A in verschiedenen Brustkrebszelllinien u. a. in MDA-MB 468 und MDA-MB 231. Auf mRNA-Ebene wurde die Expression durch Hypoxie deutlich gesteigert. Allerdings wurden die Zellen auch bei fast anoxischen 0,1 % O₂ kultiviert. Bezüglich der Enzymaktivität von LDH-A fanden sie unter Hypoxie eine Steigerung um den Faktor 1,1 in jeweils beiden Zelllinien. MDA-MB 231 zeigte hierbei eine deutlich höhere Grundaktivität als MDA-MB 468 (Blancher et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit zeigten MDA-MB 231 bei Normoxie eine etwa doppelt so starke Proteinexpression wie MDA-MB 468. Unter der Annahme, dass aufgrund der Stärke der Proteinexpression auf die Enzymaktivität geschlossen werden kann, stimmen die Ergebnisse von Blancher et al. mit den hier gefundenen Expressionsmustern überein.

Protein-Expression von PDK-1 bis -4

Die hier durchgeführten Analysen ergaben ein sehr unterschiedliches Proteinexpressionsmuster der einzelnen Isoenzyme. Eine gewebespezifische Expression der vier PDK-Isoenzyme beobachteten auch Bowker-Kinley et al.

(Bowker-Kinley et al. 1998). In der Literatur ist beschrieben, dass HIF die Expression von PDK-1 und PDK-3 induziert (Papandreou et al. 2006, Kim et al. 2006). In diesen Studien lagen die Sauerstoffkonzentrationen zwischen 0,1 und 0,5 %. Eine gesteigerte PDK-1-Proteinexpression unter hypoxischen Bedingungen mit 5 % O₂ konnte von uns nur in MDA-MB 468 und Keratinozyten beobachtet werden. Auffällig war die hohe Proteinexpression in allen getesteten benignen Zellen. Die Proteinexpression von PDK-3 konnte durch Hypoxie in MDA-MB 231 und der Magenkarzinomlinie 23132/87 sehr stark gesteigert werden.

Die Isoform 2 der PDK ist die am weitesten verbreitete Form in humanen Geweben (Bowker-Kinley et al. 1998). PDK-2 war in der vorliegenden Untersuchung nur sehr schwach in benignen Zellen exprimiert. Die Expression wurde durch Sauerstoffmangel sogar weiter reduziert. Bei den Tumorzellen wurde PDK-2 in MDA-MB 231 und 23132/87 stark exprimiert. Auffällig war, dass Hypoxie die Proteinexpression in MDA-MB 231 reduzierte, in der Magenkarzinomlinie 23132/87 hingegen steigerte. Sun et al. konnten zeigen, dass eine bestimmte Mutation in Mitochondrien die Expression von HIF-1 α und PDK-2 in Tumorzellen steigerte (Sun et al. 2009). Hypoxische Kulturbedingungen mit 1 % Sauerstoff induzierte die Expression von PDK-3 in Tumorzellen und normalen Zellen (Lu et al. 2008). Dies konnte hier lediglich nur für die beiden Tumorzelllinien MDA-MB 231 und die Magenkarzinomlinie 23132/87 bestätigt werden. Eine leicht gesteigerte Expression durch Hypoxie wurde in Fibroblasten beobachtet.

Die Proteinexpression der Pyruvatdehydrogenase-Kinase 4 war in allen vier benignen Zellenarten sehr hoch. In den beiden Tumorzelllinien MDA-MB 231 und 23132/87 war die Proteinexpression am niedrigsten. Analysen an Biopsiematerial von Kolonkarzinomen und korrespondierendem normalen Gewebe ergaben, dass die mRNA-Expression von PDK-4 im Tumorgewebe stark herunterreguliert war (Blouin et al. 2010), was zu unserer Beobachtung passt. Hsieh et al. fanden folgenden Regulationsmechanismus für PDK-4: Der Transkriptionsfaktor E2F1 induziert die Expression von PDK-4. Das Tumorsuppressorgen *Rb* (Retinoblastom) welches in vielen humanen Tumoren defekt ist, bindet an E2F1 und hemmt dessen Transkriptionsaktivität. Letztendlich wird dadurch die Oxidation der Glucose gehemmt (Hsieh et al. 2008). Bei den Tumorzellen wurde in MDA-MB 468 die stärkste Proteinexpression von PDK-4 detektiert. Ob in diesen Zellen das Tumorsuppressorgen *Rb* mutiert ist wurde hier nicht untersucht.

5.5 Problem von *in vitro*-Modellen

Das Interesse von Wissenschaftlern an der Erforschung der Besonderheiten des Tumorstoffwechsels, die Otto Warburg 1923 zum ersten Mal beschrieben hatte, ist groß. Möglicherweise bietet sich der besondere Stoffwechsel von Tumoren als therapeutische Option an.

Die metabolischen Veränderungen im Tumorgewebe stehen in Wechselwirkungen mit dem Mikromilieu und genetischen Veränderungen des Tumors (Abb. 79).

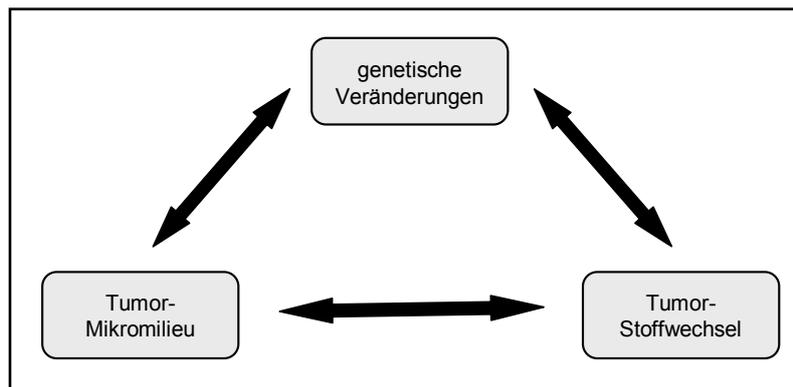


Abb. 79: Wechselwirkung zwischen onkogenen Veränderungen in Tumorzellen, Nährstoffangebot im Mikromilieu und Anpassung des Tumorstoffwechsels.

(Verändert nach Papandreou et al. 2011).

Daher ist es schwierig diese *in vivo*-Bedingungen *ex vivo* zu untersuchen. Die Zellen werden üblicherweise bei 21 % Sauerstoffgehalt kultiviert. Das Zellkulturmedium enthält zwischen 17 und 25 mM Glucose, also etwa drei- bis fünfmal mehr als die normalen Blutzuckerspiegel (5 - 7 mM) und es ist bekannt, dass hohe Glucosekonzentrationen die Glykolyse fördern (Crabtree-Effekt; Crabtree 1929). Zellen passen ihren Stoffwechsel diesen Kulturbedingungen an und dieser unterscheidet sich sehr von ihrem ursprünglichen *in vivo*-Stoffwechsel (Vaupel 2004, Gstraunthaler et al. 1999). In Zellkulturen, in denen die Zellen üblicherweise einschichtig (*Monolayer*) wachsen, ist unter normoxischen Bedingungen immer eine ausreichende Sauerstoffversorgung aller Zellen sichergestellt. Eine schnelle Proliferation von Tumorzellen übersteigt *in vivo* das Sauerstoffangebot und es bilden sich hypoxische Regionen im wachsenden Tumor. Daraufhin exprimieren Tumorzellen den Transkriptionsfaktor HIF-1 α was wiederum die Glykolyse steigert (Semenza 2008). Als Folge fällt vermehrt Milchsäure an und führt zu einem sauren pH im Mikromilieu des Tumors, was Einfluss auf die Genexpression hat (Chen et al. 2008). Sowohl Hypoxie als auch Azidose können die Mutationsrate steigern und das

Tumorwachstum fördern (Bindra et al. 2005, Gatenby et al. 2007). Es ist äußerst schwierig diese komplexen Wechselwirkungen sind *in vitro* zu reproduzieren.

Dennoch ist die *in vitro*-Testung von Tumorzelllinien, in denen außerhalb des komplexen Organismus Zellen eines definierten Typs untersucht werden, sinnvoll, da hierdurch potenziell therapeutische Substanzen identifiziert und selektioniert werden können. Substanzen, die *in vitro* eine tumorselektive Wirkung gezeigt haben können dann in aufwendigeren Tiermodellen und klinischen Studien weiter getestet werden.

6 Ausblick

Das wissenschaftliche Interesse am Tumorstoffwechsel als mögliche Therapieoption gewann in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung und ist nach wie vor brandaktuell. Trotz vielversprechender Ergebnisse, die zu diesem Thema in letzter Zeit veröffentlicht wurden, ist in der hier vorliegenden Arbeit deutlich geworden, dass die Manipulation von Stoffwechselwegen von Tumorzelllinien *in vitro* - zumindest mit den bisher favorisierten Substanzen - nicht tumorselektiv erfolgt. Diese präklinischen Modelle der *in vitro*-Testung von Tumorzelllinien, in denen außerhalb des komplexen Organismus Zellen eines definierten Typs untersucht werden, sind die erste Stufe, um potenziell therapeutische Substanzen zu identifizieren. In den bisher veröffentlichten Studien variiert der experimentelle Versuchsaufbau sehr stark (unterschiedliche Tumorzelllinien, Konzentration und Inkubationszeit der Substanzen, Methode zur Bestimmung der Zellvitalität), was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert. In jüngster Zeit werden in der medizinischen Forschung vermehrt computergestützte Modelle, sog. *in silico*-Modelle, eingesetzt, mit denen biologische Vorgänge am Computer analysiert werden. Für den Tumorstoffwechsel bedeutet dies, dass auf Grundlage der bekannten Stoffwechselwege Vorhersagen über die Wirkung von Substanzen die z. B. den Warbureffekt umkehren, möglich sind. Durch diese Simulationsmodelle identifizierte Kandidaten werden anschließend in Zellkulturen auf ihre antitumorale Wirksamkeit getestet, bevor sich aufwendige Untersuchungen im Tier und klinischen Testreihen anschließen. Die Verbindung von Expressionsdaten des Tumormetaboloms mit Daten des Humangenoms könnte die gezielte Entwicklung von sog. „*in silico*“-Modellen forcieren, in denen tumorspezifische Angriffspunkte für stoffwechselbasierte Therapien identifizierbar werden. In Zukunft könnte dann mit dieser Methode der Stoffwechsel von patienteneigenen Krebszellen analysiert werden und so eine zielgerichtete und individualisierte Tumorthherapie (*targeted therapy*) ermöglichen.

7 Zusammenfassung

Charakteristisch für viele maligne Tumorzellen ist eine erhöhte Aufnahme von Glucose und die Bildung großer Mengen Milchsäure (Laktat) auch in Anwesenheit von Sauerstoff (aerobe Glykolyse, „Warburg Effekt“) und eine verminderte Nutzung des Zitratzyklus. Als Grund werden Defekte in der mitochondrialen Atmungskette diskutiert. Aber auch eine durch Onkogene gesteigerte Glykolyserate, die nicht dem Pasteur-Effekt (verminderte Glykolyserate bei Sauerstoffangebot) unterliegt, könnte ursächlich sein. Ein weiterer für Tumorzellen wichtiger Stoffwechselweg, in dem Glucose abgebaut wird, ist der Pentosephosphatweg (PPW), dessen Blockade das Wachstum der Krebszellen hemmen könnte. Zudem stellt die Manipulation derjenigen Signalwege, die in den Tumorstoffwechsel involviert und in Tumorzellen überaktiviert (Ras/PI3K/Akt/mTOR- und Raf/MEK/ERK-Signalweg) oder unterdrückt (oxidative Phosphorylierung, p53) sind, mögliche Ansatzpunkte dar.

In dieser Arbeit wurde daher *in vitro* die Wirkung von 15 Substanzen an drei verschiedenen Tumorzelllinien [zwei Brustkrebszelllinien mit unterschiedlich invasivem Phänotyp (MDA-MB 231 und 468) und eine Magenkarzinomlinie (23132/87)] und vier verschiedenen benignen Zellen [Endometriumsfibroblasten, Endothelzellen (HUVEC), Blutleukozyten und Hautkeratinozyten] untersucht, welche in die oben genannten charakteristischen Stoffwechselwege von Tumorzellen bzw. mit dem Tumorstoffwechsel assoziierte Signalwege eingreifen und gegenwärtig intensiv als mögliche Tumortheraeutika diskutiert werden. Ziel war es, geeignete Kandidaten für eine zielgerichtete Therapie zu identifizieren. Die Messgröße für die Wirksamkeit einer Substanz war der Gehalt an ATP, weil der Energiegehalt einer Zelle mit der Vitalität korreliert.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit war die Beeinflussung des Glucosestoffwechsels in Tumorzellen. Da Glucose sowohl aerob als auch anaerob verstoffwechselt werden kann, wurden in einem ersten Ansatz zu einen Substanzen getestet, die die Glykolyse auf verschiedenen Ebenen hemmen, zum anderen wurden Substanzen untersucht, die den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflussen. Die Wirkung aller 15 Substanzen wurde zunächst jeweils als Einzelbehandlung getestet. Hierbei führten nur sehr hohe Konzentrationen in Tumorzellen zu einem drastisch verminderten ATP-Gehalt, die für benigne Zellen aber ebenfalls toxisch waren. Daher wurde in einem zweiten Schritt untersucht, ob durch die gleichzeitige Manipulation des Glucosestoffwechsels und des mitochondrialen Stoffwechsels mit jeweils

subtoxischen Konzentrationen eine tumorselektive Wirkung erreicht werden kann. Bei der Kombination der Substanzen Oxythiamin/NaDCA bzw. 2-DG/Rotenon ergaben sich zwar synergistische Effekte auf die Verminderung des ATP-Gehaltes in den getesteten Tumorzellen, eine generelle tumorselektive Wirkung konnte jedoch durch die kombinierte Behandlung nicht erreicht werden.

In jüngster Zeit mehren sich die Hinweise, dass die Glutaminolyse (Abbau von Glutamin) einen sehr wichtigen Stoffwechselweg für Energiegewinnung und Syntheseprozesse von Tumorzellen darstellt. Deshalb wurde in einem dritten Schritt untersucht, ob durch die Hemmung der Glutaminolyse mit der Substanz 6-Diazo-5-oxo-L-norleuzin (DON) eine tumorspezifische Wirkung erreicht werden kann. In der Tat konnte durch DON eine andeutungsweise tumorselektive Wirkung auf den ATP-Gehalt der Zellen erzielt werden, jedoch war das therapeutische Fenster sehr eng.

Durch die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung mit den Substanzen Rotenon, Oligomycin, 2,4-Dinitrophenol und Rhodamin 123 wurde in allen drei untersuchten Tumorzelllinien eine gesteigerte Milchsäureproduktion nachgewiesen. Dies ist ein eindeutiger Hinweis dafür, dass in diesen Tumorzellen die Mitochondrien keine Defekte aufweisen, weil die oxidative Phosphorylierung zu hemmen war und die Zellen hieraufhin die Glykolyse steigerten.

Die hier untersuchten benignen und malignen Zellen wurden hinsichtlich des Glucosestoffwechsels mit verschiedenen Methoden näher charakterisiert, um zu beurteilen, ob sich die Zellen in ihrem Stoffwechselphänotyp unterscheiden. Bei der Quantifizierung der Glucoseaufnahme wurde deutlich, dass auch manche benigne Zellen (Fibroblasten, T-Zellen) deutliche Mengen an Glucose aufnehmen, welche allerdings nur der Tumorzelllinie mit der niedrigsten Aufnahme (MDA-MB 231) glich. Mittels immunhistochemischer Färbungen wurden charakteristische Proteine des Zuckerstoffwechsels dargestellt. Zudem wurde die Expression von zentralen Genen des Stoffwechsels auf mRNA- bzw. Proteinebene untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass sowohl Tumorzellen als auch manche benigne Zellen für die Glykolyse typische Proteine bzw. mRNA stark exprimieren. Fazit der Charakterisierung ist, dass es zwischen den hier verwendeten malignen und benignen Zellen keine eindeutige Differenzierung aufgrund des Stoffwechselprofils gibt, sondern sich die getesteten Zellen nur graduell unterscheiden. Dieses Ergebnis erklärt möglicherweise die geringe Tumorspezifität der getesteten Substanzen.

Im Vergleich mit den vielversprechenden Ergebnissen aus der Literatur zeigten die hier gewonnenen *in vitro*-Daten eindeutig, dass die Wirkung von potenziell tumorhemmenden Substanzen je nach Tumorzelltyp extrem verschieden war. Dies beruht darauf, dass der vorherrschende Stoffwechseltyp (oxidativ bzw. glykolytisch) für jede Tumorentität verschieden ist. Daher muss vermutlich für jede Tumorentität bzw. sogar für jeden Patienten individuell die Wirkung und der Nutzen einer Hemmung des Tumorstoffwechsels untersucht werden, bevor hier künftig an eine zielgerichtete Therapie gedacht werden kann.

8 Summary

A characteristic feature of aggressive tumour cells is a high uptake of glucose and enhanced lactic acid production even in the presence of oxygen (aerobic glycolysis, “Warburg effect”) with a reduced use of the tricarboxylic acid cycle. Defects in mitochondrial function and oncogene activation are supposed to contribute to increased glycolysis, that is not subjected to the Pasteur effect (reduced rate of glycolysis in the presence of oxygen). The pentose phosphate pathway (PPP) is an important metabolic pathway in cancer cells, supplying building blocks for nucleotide synthesis and NADPH for proper redox control. Hence, inhibition of the PPP might block tumour cell growth. Perturbation of signalling pathways that are involved in tumour cell metabolism and are hyperactivated (Ras/PI3K/Akt/mTOR- and Raf/MEK/ERK-pathway) or suppressed (oxidative phosphorylation, p53) in cancer cells are possible targets for anticancer drugs.

Thus, in this work the effect of 15 substances highly discussed as potential anticancer agents which influence the aforementioned metabolic and signalling pathways was evaluated *in vitro* on three different tumour cells lines [two breast cancer cells lines with different metastatic phenotype (MDA-MB 231 and 468) and one gastric cancer cell line (23132/87)] and four normal cell types [endometrial fibroblasts, endothelial cells (HUVEC), peripheral blood leukocytes and skin keratinocytes]. Aim of the study was to identify suitable candidates for targeted therapies. ATP-level was measured as readout to determine the efficacy of the substances, because the ATP content of cells correlates well with cell viability.

The main focus of this work was to selectively modulate the glucose metabolism of cancer cells. Because glucose can be metabolized aerobically and anaerobically, we first tested substances that inhibit glycolysis at different steps and substances that interfere with mitochondrial metabolism. All of the 15 substances were tested as single treatment. Here, only very high concentrations of the respective substance significantly decreased ATP-levels in cancer cells - but to a much greater extend in normal cells. Therefore, in the next step we determined if impairing glucose and mitochondrial metabolism simultaneously with less toxic drug concentrations would be more specific in targeting cancer cells. Although synergistic effects were observed by co-treatment with oxthiamine/NaDCA and 2-DG/rotenone respectively on reducing ATP-levels, this effect was not selective for tumour cells too.

Recently, evidence is coming up that glutaminolysis (degradation of glutamine) is an important metabolic pathway for cancer cells providing energy substrates and building blocks. Thus, we examined if a tumour-specific effect could be achieved by inhibition of glutaminolysis with 6-Diazo-5-oxo-L-norleuzin (DON). Actually, other than the substances interfering with glucose metabolism, DON showed a tumour-specific effect to some extent, although the therapeutical range was very small.

Inhibition of oxidative mitochondrial metabolism with the substances rotenone, oligomycin, 2,4-dinitrophenol and rhodamine 123 increased lactic acid production in all three cancer cell lines. Thus, it was possible to impede oxidative phosphorylation and to force the cells to increase glycolysis, indicating that mitochondria had no defects.

To determine if tumour cells and normal cells differ in regard of their metabolic phenotype, the cells were analyzed for parameters concerning glucose metabolism with different methods. Quantifying glucose uptake of the cells revealed that some normal cells (fibroblasts, T-cells) take up significant amounts of glucose that are similar to those of cancer cells (MDA-MB 231) which showed the lowest glucose uptake among the three tumour cell lines tested. Characteristic proteins of glucose metabolism were analyzed using immunohistochemistry. Furthermore expression patterns of crucial genes involved in glucose metabolism were analyzed on mRNA and protein level. Thereby, it became obvious that both tumour cells as well as normal cells have very similar expression patterns regarding these typical genes. In conclusion, the characterization of tumour and normal cells did not show any substantial but rather gradual differences concerning the metabolic phenotype. These results might explain the marginal tumour specific effect of the drugs tested herein

Compared to the promising results from the literature our *in vitro* data clearly show that the effect of potential anticancer drugs is extremely different for several tumour cell types. This might be due to the predominant metabolic phenotype (oxidative or glycolytic) of different tumour entities. Thus, we suppose that inhibition of tumour cell metabolism has to be evaluated for every single cancer cell type or even every cancer patient on regard of effect and benefit for implementation of selective cancer pharmacotherapy.

9 Literaturverzeichnis

- Ahmed SA, Gogal RM, Jr., Walsh JE (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 170(2):211-224.
- Albers MJ, Bok R, Chen AP, Cunningham CH, Zierhut ML, Zhang VY *et al.* (2008). Hyperpolarized ¹³C lactate, pyruvate, and alanine: noninvasive biomarkers for prostate cancer detection and grading. *Cancer Res* 68(20):8607-8615.
- Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE *et al.* (2009). Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle* 8(6):909-915.
- Alo PL, Visca P, Botti C, Galati GM, Sebastiani V, Andreano T *et al.* (2001). Immunohistochemical expression of human erythrocyte glucose transporter and fatty acid synthase in infiltrating breast carcinomas and adjacent typical/atypical hyperplastic or normal breast tissue. *Am J Clin Pathol* 116(1):129-134.
- Altenberg B, Greulich KO (2004). Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84(6):1014-1020.
- Amicarelli F, Bucciarelli T, Poma A, Aimola P, Di IC, Ragnelli AM *et al.* (1998). Adaptive response of human melanoma cells to methylglyoxal injury. *Carcinogenesis* 19(3):519-523.
- Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS *et al.* (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 25(9):2097-2116.
- Anderson KM, Tsui P, Guinan P, Rubenstein M (2006). The proliferative response of hela cells to 2-deoxy-D-glucose under hypoxic or anoxic conditions: an analogue for studying some properties of in vivo solid cancers. *Anticancer Res* 26(6B):4155-4162.
- Andres MI, Repetto G, Sanz P, Repetto M (1996). Comparative effects of the metabolic inhibitors 2,4-dinitrophenol and iodoacetate on mouse neuroblastoma cells in vitro. *Toxicology* 110(1-3):123-132.
- Armstrong JS, Hornung B, Lecane P, Jones DP, Knox SJ (2001). Rotenone-induced G2/M cell cycle arrest and apoptosis in a human B lymphoma cell line PW. *Biochem Biophys Res Commun* 289(5):973-978.
- Asada K, Miyamoto K, Fukutomi T, Tsuda H, Yagi Y, Wakazono K *et al.* (2003). Reduced expression of GNA11 and silencing of MCT1 in human breast cancers. *Oncology* 64(4):380-388.
- Baer SC, Casaubon L, Younes M (1997). Expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in cutaneous neoplasia. *J Am Acad Dermatol* 37(4):575-577.
- Baggetto LG (1992). Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie* 74(11):959-974.
- Balinsky D, Platz CE, Lewis JW (1983). Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues. *Cancer Res* 43(12 Pt 1):5895-5901.
- Barclay RK, Phillipps MA (1966). Effects of 6-diazo-5-oxol-norleucine and other tumor inhibitors on the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide in mice. *Cancer Res* 26(2):282-286.
- Basu RK, Hubchak S, Hayashida T, Runyan CE, Schumacker PT, Schnaper HW (2011). Interdependence of HIF-1alpha and TGF-beta/Smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 300(4):F898-F905.
- Bernal SD, Lampidis TJ, Mclsaac RM, Chen LB (1983). Anticarcinoma activity in vivo of rhodamine 123, a mitochondrial-specific dye. *Science* 222(4620):169-172.

- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3(12):1301-1306.
- Bhardwaj V, Rizvi N, Lai MB, Lai JC, Bhushan A (2010). Glycolytic enzyme inhibitors affect pancreatic cancer survival by modulating its signaling and energetics. *Anticancer Res* 30(3):743-749.
- Bianchi G, Loibl S, Zamagni C, Salvagni S, Raab G, Siena S *et al.* (2009). Phase II multicenter, uncontrolled trial of sorafenib in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Drugs* 20(7):616-624.
- Binder C, Binder L, Marx D, Schauer A, Hiddemann W (1997). Deregulated simultaneous expression of multiple glucose transporter isoforms in malignant cells and tissues. *Anticancer Res* 17(6D):4299-4304.
- Bindra RS, Gibson SL, Meng A, Westermark U, Jasin M, Pierce AJ *et al.* (2005). Hypoxia-induced down-regulation of BRCA1 expression by E2Fs. *Cancer Res* 65(24):11597-11604.
- Blancher C, Moore JW, Talks KL, Houlbrook S, Harris AL (2000). Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 60(24):7106-7113.
- Blech J, Elger K, Grill M, Hackenbroch V (2010). *Der Spiegel* 20/2010., pp. 166-171.
- Blouin JM, Penot G, Collinet M, Nacfer M, Forest C, Laurent-Puig P *et al.* (2011). Butyrate elicits a metabolic switch in human colon cancer cells by targeting the pyruvate dehydrogenase complex. *Int J Cancer* 128(11):2591-2601.
- Bloxham PD, Lardy HA (1973). Phosphofructokinase. 3 ed. Academic Press New York.
- Bluemlein K, Gruning NM, Feichtinger RG, Lehrach H, Kofler B, Ralser M (2011). No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis. *Oncotarget*.
- Bonnet S, Archer SL, Lalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R *et al.* (2007). A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11(1):37-51.
- Bopp SK, Lettieri T (2008). Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol* 8:8.
- Boros LG, Puigjaner J, Cascante M, Lee WN, Brandes JL, Bassilian S *et al.* (1997). Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation. *Cancer Res* 57(19):4242-4248.
- Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2(3):484-494.
- Boveris A, Chance B (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134(3):707-716.
- Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM (1998). Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J* 329 (Pt 1):191-196.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brandsma D, Dorlo TP, Haanen JH, Beijnen JH, Boogerd W (2010). Severe encephalopathy and polyneuropathy induced by dichloroacetate. *J Neurol* 257(12):2099-2100.

- Brinkley BR, Barham SS, Barranco SC, Fuller GM (1974). Rotenone inhibition of spindle microtubule assembly in mammalian cells. *Exp Cell Res* 85(1):41-46.
- Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW *et al.* (2001). Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51(2):349-353.
- Brouy-Boye D, Kolonias D, Wu CJ, Savaraj N, Lampidis TJ (1995). Relationship of multidrug resistance to rhodamine-123 selectivity between carcinoma and normal epithelial cells: taxol and vinblastine modulate drug efflux. *Cancer Res* 55(8):1633-1638.
- Brown JM, Wilson WR (2004). Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 4(6):437-447.
- Burant CF, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell GI, Davidson NO (1992). Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J Biol Chem* 267(21):14523-14526.
- Burdon RH (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 18(4):775-794.
- Burgman P, Odonoghue JA, Humm JL, Ling CC (2001). Hypoxia-Induced increase in FDG uptake in MCF7 cells. *J Nucl Med* 42(1):170-175.
- Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, Deberardinis RJ, Hatzivassiliou G, Elstrom RL *et al.* (2005). The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene* 24(26):4165-4173.
- Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, Deberardinis RJ, Zhao F *et al.* (2007). Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res* 67(14):6745-6752.
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53(3):661-674.
- Cailleau R, Olive M, Cruciger QV (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14(11):911-915.
- Cairns RA, Papandreou I, Sutphin PD, Denko NC (2007). Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(22):9445-9450.
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11(2):85-95.
- Calder PC, Dimitriadis G, Newsholme P (2007). Glucose metabolism in lymphoid and inflammatory cells and tissues. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10(4):531-540.
- Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, Malloy KM, Gehrig PA, Bae-Jump VL (2010). Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation--implications for a novel treatment strategy. *Gynecol Oncol* 116(1):92-98.
- Capello M, Ferri-Borgogno S, Cappello P, Novelli F (2011). alpha-Enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS J* 278(7):1064-1074.
- Carew JS, Huang P (2002). Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 1:9.
- Carnero A (2010). The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des* 16(1):34-44.
- Cascante M, Centelles JJ, Veech RL, Lee WN, Boros LG (2000). Role of thiamin (vitamin B-1) and transketolase in tumor cell proliferation. *Nutr Cancer* 36(2):150-154.
- Cayman Chemical (2010). Assay Kits. Cayman Chemical Company.

- Chang JM, Chung JW, Jae HJ, Eh H, Son KR, Lee KC *et al.* (2007). Local toxicity of hepatic arterial infusion of hexokinase II inhibitor, 3-bromopyruvate: In vivo investigation in normal rabbit model. *Acad Radiol* 14(1):85-92.
- Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A (2001). Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 276(12):9519-9525.
- Chen CL, Chu JS, Su WC, Huang SC, Lee WY (2010). Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF-1alpha, GLUT1, and CAIX. *Virchows Arch* 457(1):53-61.
- Chen JL, Lucas JE, Schroeder T, Mori S, Wu J, Nevins J *et al.* (2008). The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS Genet* 4(12):e1000293.
- Chen LB (1988). Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol* 4:155-181.
- Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P (2007). The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr* 39(3):267-274.
- Chen Z, Zhang H, Lu W, Huang P (2009). Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochim Biophys Acta* 1787(5):553-560.
- Choi MH, Park WJ, Park YK, Chai JY, Lee SH (1998). Isolation and characterization of a 40 kDa cysteine protease from *Gymnophalloides seoi* adult worms. *Korean J Parasitol* 36(2):133-141.
- Chorny S, Parkhomenko J, Chorna N (2007). Thiamine deficiency caused by thiamine antagonists triggers upregulation of apoptosis inducing factor gene expression and leads to caspase 3-mediated apoptosis in neuronally differentiated rat PC-12 cells. *Acta Biochim Pol* 54(2):315-322.
- Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, 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.
- Collins CL, Wasa M, Souba WW, Abcouwer SF (1998). Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines. *J Cell Physiol* 176(1):166-178.
- Copeland WC, Wachsman JT, Johnson FM, Penta JS (2002). Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest* 20(4):557-569.
- Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ (1990). Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer Res* 10(5A):1153-1159.
- Crabtree HG (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* 23(3):536-545.
- Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, Kim H *et al.* (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62(22):6674-6681.
- Czech N, Brenner W, Kampen WU, Henze E (2000). [Diagnostic value of positron emission tomography (PET) in clinical oncology]. *Dtsch Med Wochenschr* 125(18):565-567.
- Dairkee SH, Hackett AJ (1991). Differential retention of rhodamine 123 by breast carcinoma and normal human mammary tissue. *Breast Cancer Res Treat* 18(1):57-61.
- Dang CV (2010). Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism. *Cancer Res* 70(3):859-862.
- Datema R, Schwarz RT (1979). Interference with glycosylation of glycoproteins. Inhibition of formation of lipid-linked oligosaccharides in vivo. *Biochem J* 184(1):113-123.

- Day SE, Kettunen MI, Gallagher FA, Hu DE, Lerche M, Wolber J *et al.* (2007). Detecting tumor response to treatment using hyperpolarized ¹³C magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Nat Med* 13(11):1382-1387.
- Deberardinis RJ, 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.
- Deberardinis RJ, Cheng T (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 29(3):313-324.
- Decaudin D, Geley S, Hirsch T, Castedo M, Marchetti P, Macho A *et al.* (1997). Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 57(1):62-67.
- Di Monte DA (2003). The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol* 2(9):531-538.
- Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Broer S (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 350 Pt 1:219-227.
- Doughty CA, Bleiman BF, Wagner DJ, Dufort FJ, Mataraza JM, Roberts MF *et al.* (2006). Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. *Blood* 107(11):4458-4465.
- Downward J (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 15(2):177-182.
- Dwarakanath B, Jain V (2009). Targeting glucose metabolism with 2-deoxy-D-glucose for improving cancer therapy. *Future Oncol* 5(5):581-585.
- Dwarakanath BS, Singh D, Banerji AK, Sarin R, Venkataramana NK, Jalali R *et al.* (2009). Clinical studies for improving radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose: present status and future prospects. *J Cancer Res Ther* 5 Suppl 1:S21-S26.
- Eidinoff ML, Knolle JE, Marano B, Cheong L (1958). Pyrimidine Studies I. Effect of DON (6-Diazo-5-oxo-L-norleucine) on Incorporation of Precursors into Nucleic Acid Pyrimidines. *Cancer Res* 18:105-109.
- Elias JA, Ferro TJ, Rossman MD, Greenberg JA, Daniele RP, Schreiber AD *et al.* (1987). Differential prostaglandin production by unfractionated and density-fractionated human monocytes and alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 42(2):114-121.
- Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR *et al.* (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64(11):3892-3899.
- Engel LW, Young NA (1978). Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res* 38(11 Pt 2):4327-4339.
- Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD (2005). Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330(7503):1304-1305.
- Fath MA, Diers AR, ykin-Burns N, Simons AL, Hua L, Spitz DR (2009). Mitochondrial electron transport chain blockers enhance 2-deoxy-D-glucose induced oxidative stress and cell killing in human colon carcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 8(13):1228-1236.
- Feichtinger RG, Zimmermann F, Mayr JA, Neureiter D, Hauser-Kronberger C, Schilling FH *et al.* (2010). Low aerobic mitochondrial energy metabolism in poorly- or undifferentiated neuroblastoma. *BMC Cancer* 10:149.

- Feichtinger RG, Neureiter D, Mayr JA, Zimmermann FA, Berthold F, Jones N *et al.* (2011). Loss of mitochondria in ganglioneuromas. *Front Biosci (Elite Ed)* 3:179-186.
- Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL (1999). Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 59(16):3915-3918.
- Flick DA, Gifford GE (1984). Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 68(1-2):167-175.
- Fogal V, Richardson AD, Karmali PP, Scheffler IE, Smith JW, Ruoslahti E (2010). Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Mol Cell Biol* 30(6):1303-1318.
- Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW (1996). Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* 87(1):373-377.
- Friday E, Oliver R, III, Welbourne T, Turturro F (2011). Glutaminolysis and glycolysis regulation by troglitazone in breast cancer cells: Relationship to mitochondrial membrane potential. *J Cell Physiol* 226(2):511-519.
- Froberg MK, Gerhart DZ, Enerson BE, Manivel C, Guzman-Paz M, Seacotte N *et al.* (2001). Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues. *Neuroreport* 12(4):761-765.
- Fukuda H, Matsuzawa T, Abe Y, Endo S, Yamada K, Kubota K *et al.* (1982). Experimental study for cancer diagnosis with positron-labeled fluorinated glucose analogs: [18F]-2-fluoro-2-deoxy-D-mannose: a new tracer for cancer detection. *Eur J Nucl Med* 7(7):294-297.
- Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD (2009). Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther* 121(1):29-40.
- Ganote CE, Grinwald PM, Nayler WG (1984). 2,4-Dinitrophenol (DNP)-induced injury in calcium-free hearts. *J Mol Cell Cardiol* 16(6):547-557.
- Garcia CK, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RG, Brown MS (1994). Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 76(5):865-873.
- Garcia CK, Li X, Luna J, Francke U (1994). cDNA cloning of the human monocarboxylate transporter 1 and chromosomal localization of the SLC16A1 locus to 1p13.2-p12. *Genomics* 23(2):500-503.
- Gatenby RA, Gillies RJ (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4(11):891-899.
- Gatenby RA, Gillies RJ (2007). Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 39(7-8):1358-1366.
- Gauthier T, is-Pouxviel C, Murat JC (1990). Respiration of mitochondria isolated from differentiated and undifferentiated HT29 colon cancer cells in the presence of various substrates and ADP generating systems. *Int J Biochem* 22(4):411-417.
- Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI (2006). Hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) induces angiogenesis in breast carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 14(1):78-82.
- Gillies RJ, Didier N, Denton M (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 159(1):109-113.
- Gillies RJ, Robey I, Gatenby RA (2008). Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med* 49 Suppl 2:24S-42S.

- Goda F, O'Hara JA, Liu KJ, Rhodes ES, Dunn JF, Swartz HM (1997). Comparisons of measurements of pO₂ in tissue in vivo by EPR oximetry and microelectrodes. *Adv Exp Med Biol* 411:543-549.
- Godoy A, Ulloa V, Rodriguez F, Reinicke K, Yanez AJ, Garcia ML *et al.* (2006). Differential subcellular distribution of glucose transporters GLUT1-6 and GLUT9 in human cancer: ultrastructural localization of GLUT1 and GLUT5 in breast tumor tissues. *J Cell Physiol* 207(3):614-627.
- Goldberg EB, Colowick SP (1965). The role of glycolysis in the growth of tumor cells. 3. Lactic dehydrogenase as the site of action of oxamate on the growth of cultured cells. *J Biol Chem* 240:2786-2790.
- Gottlieb E, Tomlinson IP (2005). Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat Rev Cancer* 5(11):857-866.
- Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* 15(11):1406-1418.
- Greil R, Micksche M (2006). Sorafenib. *ArzneimittelPROFIL. ArzneimittelPROFIL Onkologie*:2-14.
- Griguer CE, Oliva CR, Gillespie GY (2005). Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines. *J Neurooncol* 74(2):123-133.
- Groussard C, Morel I, Chevanne M, Monnier M, Cillard J, Delamarche A (2000). Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol* 89(1):169-175.
- Grover-McKay M, Walsh SA, Seftor EA, Thomas PA, Hendrix MJ (1998). Role for glucose transporter 1 protein in human breast cancer. *Pathol Oncol Res* 4(2):115-120.
- Grover GJ, Marone PA, Koetzner L, Seto-Young D (2008). Energetic signalling in the control of mitochondrial F1F0 ATP synthase activity in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 40(12):2698-2701.
- Gstraunthaler G, Seppi T, Pfaller W (1999). Impact of culture conditions, culture media volumes, and glucose content on metabolic properties of renal epithelial cell cultures. Are renal cells in tissue culture hypoxic? *Cell Physiol Biochem* 9(3):150-172.
- Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA (1998). Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 7(3):205-213.
- Guminska M, Sterkowicz J (1976). Effect of sodium fluoride on glycolysis in human erythrocytes and Ehrlich ascites tumour cells in vitro. *Acta Biochim Pol* 23(4):285-291.
- Guppy M, Leedman P, Zu X, Russell V (2002). Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J* 364(Pt 1):309-315.
- Hadad SM, Fleming S, Thompson AM (2008). Targeting AMPK: a new therapeutic opportunity in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 67(1):1-7.
- Halestrap AP, Price NT (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343 Pt 2:281-299.
- Halestrap AP, Meredith D (2004). The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 447(5):619-628.
- Han YH, Kim SW, Kim SH, Kim SZ, Park WH (2008). 2,4-dinitrophenol induces G1 phase arrest and apoptosis in human pulmonary adenocarcinoma Calu-6 cells. *Toxicol In Vitro* 22(3):659-670.
- Hanstein WG (1976). Uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 456(2):129-148.

- Hao W, Chang CP, Tsao CC, Xu J (2010). Oligomycin-induced bioenergetic adaptation in cancer cells with heterogeneous bioenergetic organization. *J Biol Chem* 285(17):12647-12654.
- Harris AL (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2(1):38-47.
- He Q, Gao Z, Yin J, Zhang J, Yun Z, Ye J (2011). Regulation of HIF-1{alpha} activity in adipose tissue by obesity-associated factors: adipogenesis, insulin, and hypoxia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(5):E877-E885.
- Held P (2009). An Absorbance-based Cytotoxicity Assay using High Absorptivity, Water-soluble Tetrazolium Salts., pp. 1-3.
- Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3(2):177-182.
- Heshe D, Hoogestraat S, Brauckmann C, Karst U, Boos J, Lanvers-Kaminsky C (2011). Dichloroacetate metabolically targeted therapy defeats cytotoxicity of standard anticancer drugs. *Cancer Chemother Pharmacol* 67(3):647-655.
- Hideshima T, Catley L, Raje N, Chauhan D, Podar K, Mitsiades C *et al.* (2007). Inhibition of Akt induces significant downregulation of survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Br J Haematol* 138(6):783-791.
- Higashi T, Tamaki N, Honda T, Torizuka T, Kimura T, Inokuma T *et al.* (1997). Expression of glucose transporters in human pancreatic tumors compared with increased FDG accumulation in PET study. *J Nucl Med* 38(9):1337-1344.
- Higgins CF (2007). Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 446(7137):749-757.
- Higuchi M, Proske RJ, Yeh ET (1998). Inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I by TNF results in cytochrome c release, membrane permeability transition, and apoptosis. *Oncogene* 17(19):2515-2524.
- Hilf R, Rector WD, Orlando RA (1976). Multiple molecular forms of lactate dehydrogenase and glucose 6-phosphate dehydrogenase in normal and abnormal human breast tissues. *Cancer* 37(4):1825-1830.
- Hilgard P, Klenner T, Stekar J, Nossner G, Kutscher B, Engel J (1997). D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity. *Eur J Cancer* 33(3):442-446.
- Hiramoto K, Fujino T, Kikugawa K (1996). DNA strand cleavage by tumor-inhibiting antibiotic 6-diazo-5-oxo-L-norleucine. *Mutat Res* 360(2):95-100.
- Hosono K, Endo H, Takahashi H, Sugiyama M, Sakai E, Uchiyama T *et al.* (2010). Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer Prev Res (Phila)* 3(9):1077-1083.
- Hsieh MC, Das D, Sambandam N, Zhang MQ, Nahle Z (2008). Regulation of the PDK4 isozyme by the Rb-E2F1 complex. *J Biol Chem* 283(41):27410-27417.
- Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF (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 LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (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.

- Hunt TK, Aslam RS, Beckert S, Wagner S, Ghani QP, Hussain MZ *et al.* (2007). Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms. *Antioxid Redox Signal* 9(8):1115-1124.
- Ihrlund LS, Hernlund E, Khan O, Shoshan MC (2008). 3-Bromopyruvate as inhibitor of tumour cell energy metabolism and chemopotentiator of platinum drugs. *Mol Oncol* 2(1):94-101.
- Iijima M, Fukino K, Adachi M, Tsukamoto T, Murai M, Naito S *et al.* (2011). Sorafenib-associated hand-foot syndrome in Japanese patients. *J Dermatol* 38(3):261-266.
- Isakovic A, Harhaji L, Stevanovic D, Markovic Z, Sumarac-Dumanovic M, Starcevic V *et al.* (2007). Dual antiglioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 64(10):1290-1302.
- Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K (1997). A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta* 44(7):1299-1305.
- Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, Alonso AM *et al.* (2005). Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26(12):2095-2104.
- Jalving M, Gietema JA, Lefrandt JD, de JS, Reyners AK, Gans RO *et al.* (2010). Metformin: taking away the candy for cancer? *Eur J Cancer* 46(13):2369-2380.
- Jiang W, Zhu Z, Thompson HJ (2008). Modulation of the activities of AMP-activated protein kinase, protein kinase B, and mammalian target of rapamycin by limiting energy availability with 2-deoxyglucose. *Mol Carcinog* 47(8):616-628.
- Johnson JH, Newgard CB, Milburn JL, Lodish HF, Thorens B (1990). The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem* 265(12):6548-6551.
- Johnson LV, Walsh ML, Bockus BJ, Chen LB (1981). Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 88(3):526-535.
- Jones LW, Narayan KS, Shapiro CE, Sweatman TW (2005). Rhodamine-123: therapy for hormone refractory prostate cancer, a phase I clinical trial. *J Chemother* 17(4):435-440.
- Joost HG, Thorens B (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 18(4):247-256.
- Kallinowski F, Runkel S, Fortmeyer HP, Forster H, Vaupel P (1987). L-glutamine: a major substrate for tumor cells in vivo? *J Cancer Res Clin Oncol* 113(3):209-215.
- Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(11):5667-5672.
- Kandel ES, Hay N (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253(1):210-229.
- Kang HT, Hwang ES (2006). 2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. *Life Sci* 78(12):1392-1399.
- Kato M, Li J, Chuang JL, Chuang DT (2007). Distinct structural mechanisms for inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase isoforms by AZD7545, dichloroacetate, and radicicol. *Structure* 15(8):992-1004.
- Khansari N, Fudenberg HH (1984). Functional heterogeneity of human cord blood monocytes. *Scand J Immunol* 19(4):337-342.

- Kim C, Lee JL, Choi YH, Kang BW, Ryu MH, Chang HM *et al.* (2010). Phase I dose-finding study of sorafenib in combination with capecitabine and cisplatin as a first-line treatment in patients with advanced gastric cancer. *Invest New Drugs*.
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3(3):177-185.
- Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR (2002). Metformin: an update. *Ann Intern Med* 137(1):25-33.
- Klimova T, Chandel NS (2008). Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ* 15(4):660-666.
- Knowles AF (1982). Differential effects of 2,4-dinitrophenol and valinomycin (+ K⁺) on uncoupler-stimulated ATPase of human tumor mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 681(1):62-71.
- Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF (2001). Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett* 173(1):83-91.
- Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS *et al.* (2004). Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 324(1):269-275.
- Kolch W, Kotwaliwale A, Vass K, Janosch P (2002). The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev Mol Med* 4(8):1-18.
- Kolev Y, Uetake H, Takagi Y, Sugihara K (2008). Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis. *Ann Surg Oncol* 15(8):2336-2344.
- Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK (2003). Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther* 2(11):1093-1103.
- Kourelis TV, Siegel RD (2011). Metformin and cancer: new applications for an old drug. *Med Oncol*.
- Kristensen SR (1989). A critical appraisal of the association between energy charge and cell damage. *Biochim Biophys Acta* 1012(3):272-278.
- Kueng W, Silber E, Eppenberger U (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 182(1):16-19.
- Kurosu T, Tsuji K, Kida A, Koyama T, Yamamoto M, Miura O (2007). Rottlerin synergistically enhances imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells through its mitochondrial uncoupling effect independent of protein kinase C-delta. *Oncogene* 26(21):2975-2987.
- Lampidis TJ, Bernal SD, Summerhayes IC, Chen LB (1983). Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells in vitro. *Cancer Res* 43(2):716-720.
- Lampidis TJ, Salet C, Moreno G, Chen LB (1984). Effects of the mitochondrial probe rhodamine 123 and related analogs on the function and viability of pulsating myocardial cells in culture. *Agents Actions* 14(5-6):751-757.
- Landau BR, Laszolo J, Stengle J, Burk D (1958). Certain metabolic and pharmacologic effects in cancer patients given infusions of 2-deoxy-D-glucose. *J Natl Cancer Inst* 21(3):485-494.
- Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 21(12):3995-4004.

- Laughter AR, Dunn CS, Swanson CL, Howroyd P, Cattley RC, Corton JC (2004). Role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in responses to trichloroethylene and metabolites, trichloroacetate and dichloroacetate in mouse liver. *Toxicology* 203(1-3):83-98.
- Laurent A, Nicco C, Chereau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A *et al.* (2005). Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 65(3):948-956.
- Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM *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 GC, Vallette G, Charrier L, Candelon T, Bou-Hanna C, Bouhours JF *et al.* (2002). Metabolic control of resistance of human epithelial cells to H₂O₂ and NO stresses. *Biochem J* 364(Pt 2):349-359.
- Ledoux S, Yang R, Friedlander G, Laouari D (2003). Glucose depletion enhances P-glycoprotein expression in hepatoma cells: role of endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res* 63(21):7284-7290.
- Leek RD, Talks KL, Pezzella F, Turley H, Campo L, Brown NS *et al.* (2002). Relation of hypoxia-inducible factor-2 alpha (HIF-2 alpha) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in Human breast cancer. *Cancer Res* 62(5):1326-1329.
- Leighl NB, Dent S, Clemons M, Vandenberg TA, Tozer R, Warr DG *et al.* (2008). A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 108(1):87-92.
- Leverve X, Sibille B, Devin A, Piquet MA, Espie P, Rigoulet M (1998). Oxidative phosphorylation in intact hepatocytes: quantitative characterization of the mechanisms of change in efficiency and cellular consequences. *Mol Cell Biochem* 184(1-2):53-65.
- Leverve XM, Fontaine E (2001). Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. *IUBMB Life* 52(3-5):221-229.
- Levine AJ, Puzio-Kuter AM (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330(6009):1340-1344.
- Linsinger G, Wilhelm S, Wagner H, Hacker G (1999). Uncouplers of oxidative phosphorylation can enhance a Fas death signal. *Mol Cell Biol* 19(5):3299-3311.
- Liu K, Shih N (2007). The Role of Enolase in Tissue Invasion and Metastasis of Pathogens and Tumor Cells. *Journal of Cancer Molecules* 3(2):45-48.
- Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Deng XS, Alimova IN, Lind SE *et al.* (2009). Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle* 8(13):2031-2040.
- Liu H, Hu YP, Savaraj N, Priebe W, Lampidis TJ (2001). Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors. *Biochemistry* 40(18):5542-5547.
- Liu Y (2006). Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 9(3):230-234.
- Lopez-Rios F, Sanchez-Arago M, Garcia-Garcia E, Ortega AD, Berrendero JR, Pozo-Rodriguez F *et al.* (2007). Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 67(19):9013-9017.
- Löffler G, Petrides PE (2003). *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage ed.
- Lu CW, Lin SC, Chen KF, Lai YY, Tsai SJ (2008). Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *J Biol Chem* 283(42):28106-28114.

- Lu W, Pelicano H, Huang P (2010). Cancer metabolism: is glutamine sweeter than glucose? *Cancer Cell* 18(3):199-200.
- Lummen P (1998). Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochim Biophys Acta* 1364(2):287-296.
- Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ (2004). Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol* 53(2):116-122.
- Maher JC, Wangpaichitr M, Savaraj N, Kurtoglu M, Lampidis TJ (2007). Hypoxia-inducible factor-1 confers resistance to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose. *Mol Cancer Ther* 6(2):732-741.
- Maly K, Uberall F, Schubert C, Kindler E, Stekar J, Brachwitz H *et al.* (1995). Interference of new alkylphospholipid analogues with mitogenic signal transduction. *Anticancer Drug Des* 10(5):411-425.
- Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, Boutati E, Lambadiari V, Mitrou P *et al.* (2007). Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *Eur J Clin Invest* 37(4):282-290.
- Marchetti P, Decaudin D, Macho A, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA *et al.* (1997). Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *Eur J Immunol* 27(1):289-296.
- Marin-Hernandez A, Rodriguez-Enriquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodriguez FL, Ias-Silva M, Sosa-Garrocho M *et al.* (2006). Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J* 273(9):1975-1988.
- Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Rodriguez-Enriquez S, Encalada R, Moreno-Sanchez R, Saavedra E (2011). Modeling cancer glycolysis. *Biochim Biophys Acta* 1807(6):755-767.
- Maschek G, Savaraj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF *et al.* (2004). 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res* 64(1):31-34.
- Mason EF, Rathmell JC (2011). Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1813(4):645-654.
- Matheson BK, Adams JL, Zou J, Patel R, Franklin RB (2007). Effect of metabolic inhibitors on ATP and citrate content in PC3 prostate cancer cells. *Prostate* 67(11):1211-1218.
- Mattson MP, Zhang Y, Bose S (1993). Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis, and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose. *Exp Neurol* 121(1):1-13.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME *et al.* (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399(6733):271-275.
- Mazurek S, Michel A, Eigenbrodt E (1997). Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. *J Biol Chem* 272(8):4941-4952.
- Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, Vaupel P, Eigenbrodt E (2002). Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *Br J Nutr* 87 Suppl 1:S23-S29.
- Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 15(4):300-308.
- McDermott U, Downing JR, Stratton MR (2011). Genomics and the continuum of cancer care. *N Engl J Med* 364(4):340-350.

- McFate T, Mohyeldin A, Lu H, Thakar J, Henriques J, Halim ND *et al.* (2008). Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *J Biol Chem* 283(33):22700-22708.
- McMillian MK, Li L, Parker JB, Patel L, Zhong Z, Gunnett JW *et al.* (2002). An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell Biol Toxicol* 18(3):157-173.
- Medina RA, Owen GI (2002). Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res* 35(1):9-26.
- Meng F, Matteucci M, Har C (2008). The antiproliferative activity of 3-Bromopyruvate is not due to selective inhibition of glycolysis (abstract). *Proceedings of the 99th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research*.
- Menon S, Manning BD (2008). Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene* 27 Suppl 2:S43-S51.
- Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E *et al.* (2010). Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med* 2(31):31ra34.
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11(2):231-238.
- Modica-Napolitano JS, Weiss MJ, Chen LB, Aprille JR (1984). Rhodamine 123 inhibits bioenergetic function in isolated rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 118(3):717-723.
- Modica-Napolitano JS, Aprille JR (2001). Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Adv Drug Deliv Rev* 49(1-2):63-70.
- Monsef N, Soller M, Panagopoulos I, Abrahamsson PA (2010). HIF1alpha isoforms in benign and malignant prostate tissue and their correlation to neuroendocrine differentiation. *BMC Cancer* 10:385.
- Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274(6):1393-1418.
- Mueller C, Al-Batran S, Jaeger E, Schmidt B, Bausch M, Sethuraman N (2008). A phase IIa study of PEGylated glutaminase (PEG-PGA) plus 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) in patients with advanced refractory solid tumors (abstract). *Journal of Clinical Oncology*.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction (abstract). *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*(51):263-273.
- Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335-350.
- Nakashima RA, Paggi MG, Pedersen PL (1984). Contributions of glycolysis and oxidative phosphorylation to adenosine 5'-triphosphate production in AS-30D hepatoma cells. *Cancer Res* 44(12 Pt 1):5702-5706.
- Newsholme P (2001). Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr* 131(9 Suppl):2515S-2522S.
- Nishizawa K, Sato C, Morita T (1979). Alterations in the survival of X-irradiated cells by 2,4-dinitrophenol depending on ATP deprivation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 35(1):15-22.
- Noguchi Y, Marat D, Saito A, Yoshikawa T, Doi C, Fukuzawa K *et al.* (1999). Expression of facilitative glucose transporters in gastric tumors. *Hepatogastroenterology* 46(28):2683-2689.
- Nomoto S, Sanchez-Céspedes M, Sidransky D (2002). Identification of mtDNA mutations in human cancer. *Methods Mol Biol* 197:107-117.

- Novgorodov SA, Gudz TI, Mohr Y, Goncharenko EN, Yaguzhinsky LS (1989). ATP-synthase complex: the mechanism of control of ion fluxes induced by cumene hydroperoxide in mitochondria. *FEBS Lett* 247(2):255-258.
- Nunez G, Giles RC, Ball EJ, Hurley CK, Capra JD, Stastny P (1984). Expression of HLA-DR, MB, MT and SB antigens on human mononuclear cells: identification of two phenotypically distinct monocyte populations. *J Immunol* 133(3):1300-1306.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267(17):5421-5426.
- O'Neil RG, Wu L, Mullani N (2005). Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Mol Imaging Biol* 7(6):388-392.
- Ovejera AA, Houchens DP, Catane R, Sheridan MA, Muggia FM (1979). Efficacy of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine and N-[N-gamma-glutamyl-6-diazo-5-oxo-norleucyl]-6-diazo-5-oxo-norleucine against experimental tumors in conventional and nude mice. *Cancer Res* 39(8):3220-3224.
- Owen MR, Doran E, Halestrap AP (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 348 Pt 3:607-614.
- Panka DJ, Wang W, Atkins MB, Mier JW (2006). The Raf inhibitor BAY 43-9006 (Sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res* 66(3):1611-1619.
- Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3(3):187-197.
- Papandreou I, Goliasova T, Denko NC (2011). Anticancer drugs that target metabolism: Is dichloroacetate the new paradigm? *Int J Cancer* 128(5):1001-1008.
- Pathania D, Millard M, Neamati N (2009). Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 61(14):1250-1275.
- Pedersen PL (1978). Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res* 22:190-274.
- Pedersen PL (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr* 39(3):211-222.
- Pelicano H, Feng L, Zhou Y, Carew JS, Hileman EO, Plunkett W *et al.* (2003). Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem* 278(39):37832-37839.
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25(34):4633-4646.
- Peternel L, Kotnik M, Prezelj A, Urleb U (2009). Comparison of 3 cytotoxicity screening assays and their application to the selection of novel antibacterial hits. *J Biomol Screen* 14(2):142-150.
- Pfeiffer T, Schuster S, Bonhoeffer S (2001). Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292(5516):504-507.
- Phoenix KN, Vumbaca F, Claffey KP (2009). Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ERalpha negative MDA-MB-435 breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 113(1):101-111.
- 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 RM, 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* 2010:427694.
- Pitkanen S, Robinson BH (1996). Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest* 98(2):345-351.
- Plastaras JP, Kim SH, Liu YY, Dicker DT, Dorsey JF, McDonough J *et al.* (2007). Cell cycle dependent and schedule-dependent antitumor effects of sorafenib combined with radiation. *Cancer Res* 67(19):9443-9454.
- Poole RC, Halestrap AP (1993). Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 264(4 Pt 1):C761-C782.
- Popov KM, Hawes JW, Harris RA (1997). Mitochondrial alpha-ketoacid dehydrogenase kinases: a new family of protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31:105-111.
- Porta C, Figlin RA (2009). Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway and kidney cancer, and the therapeutic potential of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt inhibitors. *J Urol* 182(6):2569-2577.
- Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ (1997). Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 272(17):11205-11214.
- Rais B, Comin B, Puigjaner J, Brandes JL, Creppy E, Saboureau D *et al.* (1999). Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Lett* 456(1):113-118.
- Ramanathan A, Wang C, Schreiber SL (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.
- Ramos-Montoya A, Lee WN, Bassilian S, Lim S, Trebukhina RV, Kazhyna MV *et al.* (2006). Pentose phosphate cycle oxidative and nonoxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *Int J Cancer* 119(12):2733-2741.
- Ranganathan S, Tew KD (1993). Analysis of glyoxalase-I from normal and tumor tissue from human colon. *Biochim Biophys Acta* 1182(3):311-316.
- Ranganathan S, Walsh ES, Tew KD (1995). Glyoxalase I in detoxification: studies using a glyoxalase I transfectant cell line. *Biochem J* 309 (Pt 1):127-131.
- Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB (2003). Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol* 23(20):7315-7328.
- Rausch V, Liu L, Kallifatidis G, Baumann B, Mattern J, Gladkich J *et al.* (2010). Synergistic activity of sorafenib and sulforaphane abolishes pancreatic cancer stem cell characteristics. *Cancer Res* 70(12):5004-5013.
- Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D (1979). Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254(8):2669-2676.
- Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologische Krebsregister in Deutschland e.V. (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006.Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Gabriele Husmann, Dr.Peter Kaatsch, Prof.Dr.Alexander Katalinic, Dr.Joachim Bertz, Dr.Jörg Haberland, Dr.Klaus Kraywinkel *et al.*, editors.
- Robey RB HRZL (2007). Effects of the anti-tumor agent 3-bromopyruvate (3-BrPA) on glycolytic energy metabolism. *FASEB J*(21):890-896.
- Robey IF, Lien AD, Welsh SJ, Baggett BK, Gillies RJ (2005). Hypoxia-inducible factor-1alpha and the glycolytic phenotype in tumors. *Neoplasia* 7(4):324-330.

- Roche Diagnostics GmbH (2008). Real-time and Dynamic Monitoring of Cell Proliferation and Viability for Adherent Cells. *xCELLigence Application Note 1*.
- Roche Diagnostics GmbH (2008). Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation.
- Roche Diagnostics GmbH (2009). The xCELLigence System - New Horizons in Cellular Analysis.
- Rodriguez-Enriquez S, Vital-Gonzalez PA, Flores-Rodriguez FL, Marin-Hernandez A, Ruiz-Azuara L, Moreno-Sanchez R (2006). Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 215(2):208-217.
- Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Moreno-Sanchez R (2009). Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells. *J Cell Physiol* 221(3):552-559.
- Rondinelli RH, Epner DE, Tricoli JV (1997). Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in late pathological stage human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1(2):66-72.
- Rose A, Grandoch M, vom DF, Rubben H, Rosenkranz A, Fischer JW *et al.* (2010). Stimulatory effects of the multi-kinase inhibitor sorafenib on human bladder cancer cells. *Br J Pharmacol* 160(7):1690-1698.
- Rosenbluth RJ, Cooney DA, Jayaram HN, Milman HA, Homan ER (1976). DON, CONV and DONV-II. Inhibition of L-asparagine synthetase in vivo. *Biochem Pharmacol* 25(16):1851-1858.
- Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 64(3):985-993.
- Sabri MI, Ochs S (1971). Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in mammalian nerve by iodoacetic acid. *J Neurochem* 18(8):1509-1514.
- Saha AK, Persons K, Safer JD, Luo Z, Holick MF, Ruderman NB (2006). AMPK regulation of the growth of cultured human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 349(2):519-524.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT *et al.* (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839):487-491.
- Sakamoto H, Mashima T, Kizaki A, Dan S, Hashimoto Y, Naito M *et al.* (2000). Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. *Blood* 95(10):3214-3218.
- Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA (1991). Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 88(6):1886-1893.
- Sambrook J, Fritsch E.F, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 1 ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sanchez-Cenizo L, Formentini L, Aldea M, Ortega AD, Garcia-Huerta P, Sanchez-Arago M *et al.* (2010). Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J Biol Chem* 285(33):25308-25313.
- Satoh T, Takayama F, Hashimoto K (2003). Induction of apoptosis of human oral tumor cell lines by sodium fluoride. *Meikai Univ Dent*(32):97-108.
- Sattler UG, Hirschhaeuser F, Mueller-Klieser WF (2010). Manipulation of glycolysis in malignant tumors: fantasy or therapy? *Curr Med Chem* 17(2):96-108.
- Scatena R, Bottoni P, Pontoglio A, Mastrototaro L, Giardina B (2008). Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 17(10):1533-1545.

- Scatena R, Bottoni P, Pontoglio A, Giardina B (2010). Revisiting the Warburg effect in cancer cells with proteomics. The emergence of new approaches to diagnosis, prognosis and therapy. *Proteomics Clin Appl* 4(2):143-158.
- Schek N, Hall BL, Finn OJ (1988). Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 48(22):6354-6359.
- Schmidt M, Voelker HU, Kapp M, Krockenberger M, Dietl J, Kammerer U (2010). Glycolytic phenotype in breast cancer: activation of Akt, up-regulation of GLUT1, TKTL1 and down-regulation of M2PK. *J Cancer Res Clin Oncol* 136(2):219-225.
- Schmidt MM, Dringen R (2009). Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. *Front Neuroenergetics* 1:1.
- Schönfeld P (2002). Wärmeproduktion bei Kältestress, die zitterfreie Thermogenese.
- Schreiber AD, Kelley M, Dziarski A, Levinson AI (1983). Human monocyte functional heterogeneity: monocyte fractionation by discontinuous albumin gradient centrifugation. *Immunology* 49(2):231-238.
- Schuler F, Casida JE (2001). Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH:ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labeling. *Biochim Biophys Acta* 1506(1):79-87.
- Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Drewes G, Mietzner B, Steinberg P *et al.* (2006). Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem* 281(2):977-981.
- Schutz FA, Je Y, Choueiri TK (2010). Hematologic toxicities in cancer patients treated with the multi-tyrosine kinase sorafenib: A meta-analysis of clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol*.
- Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E (2004). The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 64(7):2627-2633.
- Semenza GL, Wang GL (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.
- Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P *et al.* (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271(51):32529-32537.
- Semenza GL (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88(4):1474-1480.
- Semenza GL (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(10):721-732.
- Semenza GL (2007). Evaluation of HIF-1 inhibitors as anticancer agents. *Drug Discov Today* 12(19-20):853-859.
- Semenza GL (2008). Hypoxia-inducible factor 1 and cancer pathogenesis. *IUBMB Life* 60(9):591-597.
- Semenza GL (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29(5):625-634.
- Seyfried TN, Shelton LM (2010). Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)* 7:7.
- Shahrzad S, Lacombe K, Adamcic U, Minhas K, Coomber BL (2010). Sodium dichloroacetate (DCA) reduces apoptosis in colorectal tumor hypoxia. *Cancer Lett* 297(1):75-83.
- Shapiro RA, Clark VM, Curthoys NP (1979). Inactivation of rat renal phosphate-dependent glutaminase with 6-diazo-5-oxo-L-norleucine. Evidence for interaction at the glutamine binding site. *J Biol Chem* 254(8):2835-2838.

- Shapovalov Y, Hoffman D, Zuch D, Bentley K, Eliseev RA (2011). Mitochondrial dysfunction in cancer cells due to aberrant mitochondrial replication. *J Biol Chem*.
- Shelton LM, Huysentruyt LC, Seyfried TN (2010). Glutamine targeting inhibits systemic metastasis in the VM-M3 murine tumor model. *Int J Cancer* 127(10):2478-2485.
- Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, Jeon E, Hong SH, Jung MS *et al.* (2005). Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res* 65(8):3162-3170.
- Sibille B, Ronot X, Filippi C, Nogueira V, Keriél C, Leverve X (1998). 2,4 Dinitrophenol-uncoupling effect on delta psi in living hepatocytes depends on reducing-equivalent supply. *Cytometry* 32(2):102-108.
- Sibille B, Filippi C, Piquet MA, Leclercq P, Fontaine E, Ronot X *et al.* (2001). The mitochondrial consequences of uncoupling intact cells depend on the nature of the exogenous substrate. *Biochem J* 355(Pt 1):231-235.
- Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, Tripathi RP, Gupta JP, Mathew TL *et al.* (2005). Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol* 181(8):507-514.
- Skulachev VP (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363(2):100-124.
- Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, James DE, Lienhard GE (1991). Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17):7815-7819.
- Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN *et al.* (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118(12):3930-3942.
- Spruijt L, Naviaux RK, McGowan KA, Nyhan WL, Sheean G, Haas RH *et al.* (2001). Nerve conduction changes in patients with mitochondrial diseases treated with dichloroacetate. *Muscle Nerve* 24(7):916-924.
- Stacpoole PW (1989). The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* 38(11):1124-1144.
- Stacpoole PW, Greene YJ (1992). Dichloroacetate. *Diabetes Care* 15(6):785-791.
- Stacpoole PW, Henderson GN, Yan Z, Cornett R, James MO (1998a). Pharmacokinetics, metabolism and toxicology of dichloroacetate. *Drug Metab Rev* 30(3):499-539.
- Stacpoole PW, Henderson GN, Yan Z, James MO (1998b). Clinical pharmacology and toxicology of dichloroacetate. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 4:989-994.
- Statistisches Bundesamt Wiesbaden (2010). Gesundheit. In: Todesursachen in Deutschland. Statistisches Bundesamt Wiesbaden.
- Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E (1995). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* 15(10):5363-5368.
- Stern R, Shuster S, Neudecker BA, Formby B (2002). Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res* 276(1):24-31.
- Stockwin LH, Yu SX, Borgel S, Hancock C, Wolfe TL, Phillips LR *et al.* (2010). Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *Int J Cancer* 127(11):2510-2519.
- Strumilo SA, Senkevich SB, Galitskii EA, Vinogradov VV (1983). [Enzyme activity of thiamine pyrophosphate in the rat after oxythiamine administration]. *Biull Eksp Biol Med* 96(11):42-44.

- Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL *et al.* (2001). AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 159(2):431-437.
- Sun W, Zhou S, Chang SS, McFate T, Verma A, Califano JA (2009). Mitochondrial mutations contribute to HIF1alpha accumulation via increased reactive oxygen species and up-regulated pyruvate dehydrogenase kinase 2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15(2):476-484.
- Szatrowski TP, Nathan CF (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51(3):794-798.
- Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ *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.
- Tennant DA, Duran RV, Boulahbel H, Gottlieb E (2009). Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis* 30(8):1269-1280.
- Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 10(4):267-277.
- Thompson CB, Bauer DE, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Zong WX, Zhao F *et al.* (2005). How do cancer cells acquire the fuel needed to support cell growth? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70:357-362.
- Thornburg JM, Nelson KK, Clem BF, Lane AN, Arumugam S, Simmons A *et al.* (2008). Targeting aspartate aminotransferase in breast cancer. *Breast Cancer Res* 10(5):R84.
- Thornton RD, Lane P, Borghaei RC, Pease EA, Caro J, Mochan E (2000). Interleukin 1 induces hypoxia-inducible factor 1 in human gingival and synovial fibroblasts. *Biochem J* 350 Pt 1:307-312.
- Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997). Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11(1):72-82.
- Tzeng HF, Blackburn AC, Board PG, Anders MW (2000). Polymorphism- and species-dependent inactivation of glutathione transferase zeta by dichloroacetate. *Chem Res Toxicol* 13(4):231-236.
- Uldry M, Thorens B (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 447(5):480-489.
- Ulivi P, Arienti C, Amadori D, Fabbri F, Carloni S, Tesei A *et al.* (2009). Role of RAF/MEK/ERK pathway, p-STAT-3 and Mcl-1 in sorafenib activity in human pancreatic cancer cell lines. *J Cell Physiol* 220(1):214-221.
- Unger C, Berdel W, Hanauske AR, Sindermann H, Engel J, Mross K (2010). First-time-in-man and pharmacokinetic study of weekly oral perifosine in patients with solid tumours. *Eur J Cancer* 46(5):920-925.
- Unterluggauer H, Mazurek S, Lener B, Hutter E, Eigenbrodt E, Zwerschke W *et al.* (2008). Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase. *Biogerontology* 9(4):247-259.
- Urcan E, Haertel U, Styllou M, Hickel R, Scherthan H, Reichl FX (2010). Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 26(1):51-58.
- Valabrega G, Capellero S, Cavalloni G, Zaccarello G, Petrelli A, Migliardi G *et al.* (2010). HER2-positive breast cancer cells resistant to trastuzumab and lapatinib lose reliance upon HER2 and are sensitive to the multitargeted kinase inhibitor sorafenib. *Breast Cancer Res Treat*.

- Vali M, Liapi E, Kowalski J, Hong K, Khwaja A, Torbenson MS *et al.* (2007). Intraarterial therapy with a new potent inhibitor of tumor metabolism (3-bromopyruvate): identification of therapeutic dose and method of injection in an animal model of liver cancer. *J Vasc Interv Radiol* 18(1 Pt 1):95-101.
- van Blitterswijk WJ, Verheij M (2008). Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. *Curr Pharm Des* 14(21):2061-2074.
- van der GP, Bouter A, Menko FH, van der WE, van Diest PJ (2008). High frequency of HIF-1alpha overexpression in BRCA1 related breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 111(3):475-480.
- Varshney R, Adhikari JS, Dwarakanath BS (2003). Contribution of oxidative stress to radiosensitization by a combination of 2-DG and 6-AN in human cancer cell line. *Indian J Exp Biol* 41(12):1384-1391.
- 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.
- Vaupel P (2004). Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* 14(3):198-206.
- Vaupel P, Mayer A, Hockel M (2006). Impact of hemoglobin levels on tumor oxygenation: the higher, the better? *Strahlenther Onkol* 182(2):63-71.
- Vaupel P, Mayer A (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 26(2):225-239.
- Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Del BS, Martin-Castillo B, Lopez-Bonet E *et al.* (2011). The anti-diabetic drug metformin suppresses the metastasis-associated protein CD24 in MDA-MB-468 triple-negative breast cancer cells. *Oncol Rep* 25(1):135-140.
- Vier J, Gerhard M, Wagner H, Hacker G (2004). Enhancement of death-receptor induced caspase-8-activation in the death-inducing signalling complex by uncoupling of oxidative phosphorylation. *Mol Immunol* 40(10):661-670.
- Vink SR, van Blitterswijk WJ, Schellens JH, Verheij M (2007). Rationale and clinical application of alkylphospholipid analogues in combination with radiotherapy. *Cancer Treat Rev* 33(2):191-202.
- Vistejnova L, Dvorakova J, Hasova M, Muthny T, Velebny V, Soucek K *et al.* (2009). The comparison of impedance-based method of cell proliferation monitoring with commonly used metabolic-based techniques. *Neuro Endocrinol Lett* 30 Suppl 1:121-127.
- Vollmers HP, Stulle K, Dammrich J, Pfaff M, Papadopoulos T, Betz C *et al.* (1993). Characterization of four new gastric cancer cell lines. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 63(6):335-343.
- Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfor K, Rofstad EK *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.
- Walenta S, Chau TV, Schroeder T, Lehr HA, Kunz-Schughart LA, Fuerst A *et al.* (2003). Metabolic classification of human rectal adenocarcinomas: a novel guideline for clinical oncologists? *J Cancer Res Clin Oncol* 129(6):321-326.
- Wallace DC, Fan W, Procaccio V (2010). Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol* 5:297-348.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12):5510-5514.
- Wang JB, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R *et al.* (2010). Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell* 18(3):207-219.

- Wang SY, Mak KL, Chen LY, Chou MP, Ho CK (1992). Heterogeneity of human blood monocyte: two subpopulations with different sizes, phenotypes and functions. *Immunology* 77(2):298-303.
- Warburg O, Christian W (1941). Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Die Naturwissenschaften*(39):589-590.
- Warburg O, Minami S (1923). Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. *Klin Wochenschr* 2(17):776-777.
- Warburg O, Wind F, Negelein E (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* 8(6):519-530.
- Warburg O (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124(3215):269-270.
- Weinberg F, Chandel NS (2009). Mitochondrial metabolism and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1177:66-73.
- Wick AN, Drury DR, Nakada HI, Wolfe JB (1957). Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem* 224(2):963-969.
- Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL *et al.* (1998). Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 92(7):2260-2268.
- Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H *et al.* (2004). BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 64(19):7099-7109.
- Williams AC, Collard TJ, Paraskeva C (1999). An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 18(21):3199-3204.
- Wise DR, Deberardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK *et al.* (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(48):18782-18787.
- Wood IS, Trayhurn P (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89(1):3-9.
- Wu CH, Ho YS, Tsai CY, Wang YJ, Tseng H, Wei PL *et al.* (2009). In vitro and in vivo study of phloretin-induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter. *Int J Cancer* 124(9):2210-2219.
- Wu F, Lukinius A, Bergstrom M, Eriksson B, Watanabe Y, Langstrom B (1999). A mechanism behind the antitumour effect of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON): disruption of mitochondria. *Eur J Cancer* 35(7):1155-1161.
- Wu Y, Mohamed H, Chillar R, Ali I, Clayton S, Slamon D *et al.* (2008). Clinical significance of Akt and HER2/neu overexpression in African-American and Latina women with breast cancer. *Breast Cancer Res* 10(1):R3.
- Xiao C, Lachance B, Sunahara G, Luong JH (2002). An in-depth analysis of electric cell-substrate impedance sensing to study the attachment and spreading of mammalian cells. *Anal Chem* 74(6):1333-1339.
- Xing JZ, Zhu L, Gabos S, Xie L (2006). Microelectronic cell sensor assay for detection of cytotoxicity and prediction of acute toxicity. *Toxicol In Vitro* 20(6):995-1004.
- Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN *et al.* (2005). Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 65(2):613-621.

- Yang CM, Liu YZ, Liao JW, Hu ML (2010). The in vitro and in vivo anti-metastatic efficacy of oxythiamine and the possible mechanisms of action. *Clin Exp Metastasis* 27(5):341-349.
- Yeh CS, Wang JY, Chung FY, Lee SC, Huang MY, Kuo CW *et al.* (2008). Significance of the glycolytic pathway and glycolysis related-genes in tumorigenesis of human colorectal cancers. *Oncol Rep* 19(1):81-91.
- Yeluri S, Madhok B, Prasad KR, Quirke P, Jayne DG (2009). Cancer's craving for sugar: an opportunity for clinical exploitation. *J Cancer Res Clin Oncol* 135(7):867-877.
- Younes M, Brown RW, Mody DR, Fernandez L, Laucirica R (1995). GLUT1 expression in human breast carcinoma: correlation with known prognostic markers. *Anticancer Res* 15(6B):2895-2898.
- Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechago J (1996). Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res* 56(5):1164-1167.
- Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M (2006). Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res* 66(21):10269-10273.
- Zamora-Leon SP, Golde DW, Concha II, Rivas CI, gado-Lopez F, Baselga J *et al.* (1996). Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5):1847-1852.
- Zancan P, Sola-Penna M, Furtado CM, Da SD (2010). Differential expression of phosphofructokinase-1 isoforms correlates with the glycolytic efficiency of breast cancer cells. *Mol Genet Metab* 100(4):372-378.
- Zhang H, Cao R, Lee WN, Deng C, Zhao Y, Lappe J *et al.* (2010). Inhibition of protein phosphorylation in MIA pancreatic cancer cells: confluence of metabolic and signaling pathways. *J Proteome Res* 9(2):980-989.
- Zhang RD, Fidler IJ, Price JE (1991). Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metastasis. *Invasion Metastasis* 11(4):204-215.
- Zhao F, Mancuso A, Bui TV, Tong X, Gruber JJ, Swider CR *et al.* (2010). Imatinib resistance associated with BCR-ABL upregulation is dependent on HIF-1alpha-induced metabolic reprogramming. *Oncogene* 29(20):2962-2972.
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D *et al.* (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59(22):5830-5835.
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM *et al.* (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60(6):1541-1545.
- Zhou J, Schmid T, Brune B (2003a). Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 14(6):2216-2225.
- Zhou J, Fandrey J, Schumann J, Tiegs G, Brune B (2003b). NO and TNF-alpha released from activated macrophages stabilize HIF-1alpha in resting tubular LLC-PK1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(2):C439-C446.
- 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.
- Ziebart T, Walenta S, Sattler U, Kunkel M, Wagner W, Muller-Klieser W (2010). [Metabolite-induced bioluminescence for tumor prediction: detection of metabolites in tumors of the head and neck region]. *HNO* 58(1):31-34.

Danksagung

Frau Prof. Dr. Ulrike Kämmerer danke ich sehr herzlich für die ausgezeichnete Betreuung, die respektvolle Zusammenarbeit und die stetige Förderung meines wissenschaftlichen Berufsweges.

Ein besonders herzliches Dankeschön gilt Michaela Kapp, für ihre unentbehrliche Unterstützung im Labor und ihr stetige Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Christoph Otto für seine umfassende Unterstützung, die ausgesprochen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und für seine Funktion als assoziierter Mentor.

Bei Herrn Prof. Dr. Roland Benz bedanke ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Johannes Dietl danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation an der Universtiätsfrauenklinik Würzburg durchführen zu können.

Allen Kolleginnen danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Freunden, die mir stets mit Rat und Tat in allen Lebenslagen zur Seite stehen.

Den Mädels meiner Mentoring Med-Gruppe danke ich für ihre Unterstützung auf dem Weg der Forscherkarriere und für die schöne Zeit in Würzburg.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mich stets uneingeschränkt unterstützt und fortwährend gefördert haben. Deshalb widme ich ihnen diese Arbeit.