

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

Chirurgische Klinik I

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

**Charakterisierung humaner Tumorzelllinien  
hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarkern und  
des Warburg-Effektes**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

**Thomas Henrik Schwab**

aus Neustadt an der Weinstraße

Würzburg, Mai 2011

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. C. Otto  
**Korreferent:** Prof. Dr. med. C.-T. Germer  
**Dekan:** Prof. Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2011**

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

---

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1</b>  | <b>Einleitung</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1       | Theorien zur Kanzerogenese.....   | 1         |
| 1.2       | Strategien zum Nachweis von Tumorstammzellen .....  | 2         |
| 1.3       | Der Energiestoffwechsel von Körper- und Tumorzellen.....                                    | 3         |
| 1.4       | Zielsetzung.....  | 7         |
| <b>2</b>  | <b>Fragen</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>3</b>  | <b>Material und Methoden</b> .....  | <b>10</b> |
| 3.1       | Kulturmedien und Pufferlösung.....  | 10        |
| 3.2       | Zelllinien.....   | 11        |
| 3.3       | Durchflusszytometrie .....  | 12        |
| 3.4       | Messung der Laktatbildung.....  | 14        |
| 3.5       | Immunhistochemie.....   | 15        |
| 3.6       | Auswertung.....   | 16        |
| <b>4</b>  | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>17</b> |
| 4.1       | Nachweis der Expression von CD44 und CD24 auf Tumorzellen .....                             | 17        |
| 4.2       | Messung der Glukoseaufnahme von Tumorzellen.....  | 20        |
| 4.3       | Nachweis der Expression der Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 auf<br>Tumorzellen .....   | 24        |
| 4.4       | Messung der Laktatbildung durch Tumorzellen .....   | 26        |
| 4.5       | Übersicht der Ergebnisse.....   | 31        |
| <b>5</b>  | <b>Beantwortung der Fragen</b> .....  | <b>32</b> |
| <b>6</b>  | <b>Diskussion</b> .....   | <b>35</b> |
| 6.1       | Der Warburg-Effekt bei Tumorzelllinien .....  | 35        |
| 6.2       | Glutamin-abhängige Laktatbildung aus Glukose.....   | 40        |
| 6.3       | Der Warburg-Effekt: „Aerobe Glykolyse“ oder Milchsäuregärung .....                          | 42        |
| 6.4       | Beeinflussung des Tumorwachstums durch Inhibition der glykolytischen ATP-<br>Gewinnung..... | 46        |
| <b>7</b>  | <b>Ausblick</b> .....   | <b>49</b> |
| <b>8</b>  | <b>Zusammenfassung</b> .....  | <b>50</b> |
| <b>9</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b> .....   | <b>52</b> |
| <b>10</b> | <b>Appendix</b> .....   | <b>58</b> |
|           | <b>Danksagung, Lebenslauf</b>   |           |



# 1 Einleitung

---

Krebserkrankungen stellen weltweit die häufigste Todesursache dar. Allein im Jahr 2007 verstarben 7,9 Millionen Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung. Bis 2030 wird sich die Zahl der Todesfälle auf ca. 12 Millionen erhöht haben ([www.who.int](http://www.who.int)). Obwohl in den letzten Jahrzehnten bemerkenswerte Fortschritte bei Prävention und Behandlung von Krebserkrankungen erzielt wurden (Lippman SM und Hawk ET, 2009; DeVita Jr. VT und Chu E, 2008), sind auch weiterhin große Anstrengungen notwendig, die molekularen Mechanismen maligner Erkrankungen aufzuklären – Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieoptionen.

## 1.1 Theorien zur Kanzerogenese

Allgemein ist akzeptiert, dass die Entstehung von Krebs, die so genannte Kanzerogenese, auf Mutationen in bestimmten Bereichen des Genoms zurückgeht. Nach dieser Theorie der somatischen Mutation können sämtliche Gene betroffen sein, doch führen Mutationen insbesondere in solchen Genen zur Entstehung von Krebs, die in ihrer gesunden Form Zellwachstum bzw. Zelldifferenzierung regulieren. Solche Gene werden auch als Protoonkogene bzw. Tumorsuppressorgene bezeichnet. In der Regel sind mehrere mutagene Ereignisse in definierter Reihenfolge notwendig, um Genmutationen auszulösen (Fearon ER und Vogelstein B, 1990). Als Trigger sind zahlreiche physikalische, chemische oder biologische Faktoren bekannt (Loeb LA und Harris CC, 2008; Javier RT und Butel JS, 2008). Die Wirksamkeit solcher Kanzerogene wird durch die Dauer der Einwirkung, die Dosis der betreffenden Substanz sowie der individuellen genetischen Prädisposition beeinflusst. Zellen, deren Genom durch Mutationen verändert wurde, proliferieren nach einer Latenzzeit unkontrolliert (klonale Expansion) und verlieren ihre zell- und gewebe-spezifischen Eigenschaften. Die Umwandlung einer normalen Körperzelle in eine Tumorzelle wird als Transformation bezeichnet.

Das Konzept der somatischen Mutation ist in modifizierter Form auch Grundlage für andere Hypothesen zur Kanzerogenese. So gehen Befürworter der Exis-

tenz von Tumorstammzellen ebenfalls von genetischen Mutationen als Ursache der Transformation aus. Allerdings sollen lediglich Mutationen in Stammzellen bzw. Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften ausschlaggebend sein, um das klinische Bild eines Tumors hervorzurufen. Da sich diese Stammzellen innerhalb eines Tumors befinden, werden sie als Tumorstammzellen bezeichnet. Analog zu Stammzellen „gesunden“ Gewebes verfügen auch sie über die Fähigkeit, sich einerseits selbst zu erneuern und andererseits unterschiedlich differenzierte Tochterzellen zu generieren (asymmetrische Zellteilung). Tumorstammzellen sollen für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren verantwortlich sein. Mit Tumorstammzellen lässt sich zudem das Auftreten von Rezidiven nach Chemo- und / oder Strahlentherapie erklären. Da sie – wie „gesunde“ Stammzellen – eine geringe Zellteilungsrate aufweisen, sind sie wesentlich therapieresistenter als die sich aus ihnen entwickelnden, rasch teilenden Tumorzellen (Reya T et al., 2001; Wicha MS et al., 2006). Ob sich Tumorstammzellen aus differenzierten Zellen, die „reprogrammiert“ wurden, oder aus entarteten Stammzellen entwickeln, ist derzeit nicht geklärt (Spillane JB und Henderson MA, 2007; Taipale J und Beachy PA, 2001). Auch scheint der Phänotyp von Tumorstammzellen je nach Tumorentität unterschiedlich zu sein, was ihren Nachweis zurzeit noch erheblich erschwert.

## **1.2 Strategien zum Nachweis von Tumorstammzellen**

Tumorstammzellen wurden zum ersten Mal bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) nachgewiesen. Aufgereinigte Leukämiezellen mit dem Oberflächenprofil CD34<sup>pos</sup> / CD38<sup>neg</sup> können – im Gegensatz zu Leukämiezellen mit einem abweichenden Oberflächenprofil – bereits in geringer Anzahl Leukämie im Mausmodell auslösen. Dabei ist die entstandene Tumorerkrankung morphologisch und phänotypisch identisch mit der AML des Patienten, aus dem sie isoliert wurde (Bonnet D und Dick JE, 1997). Inzwischen sind auch in soliden Tumoren Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften nachgewiesen worden, so beispielsweise in der Mamma (Al-Hajj M et al., 2003), im ZNS (Singh SK et al., 2004), in der Prostata (Collins AT et al., 2005) im Kolon (Ricci-Vitiani L et al. 2007), im Pankreas (Li C et al., 2007) und im Ovar (Zhang

S et al., 2008). Das Oberflächenprofil dieser Tumorstammzellen variiert zwar entsprechend des Ursprungsgewebes, doch werden insbesondere die Oberflächenmoleküle CD44, CD49f ( $\alpha 6$ -Integrin), CD29 ( $\beta 1$ -Integrin) oder CD133 besonders häufig auf Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften gefunden (Wicha MS et al., 2006).

Auch etablierte Tumorzelllinien scheinen Tumorstammzellen zu enthalten (Fillmore CM und Kuperwasser C, 2008; Sheridan C et al., 2005; Takaishi et al., 2009). Analog zu den Versuchen von Bonnet und Dick zeigten auch Fillmore und Kuperwasser für etablierte Brustkrebszelllinien, dass bereits eine geringe Anzahl von Zellen mit dem Oberflächenprofil CD44<sup>pos</sup> / CD24<sup>neg</sup> Brustkrebs im Mausmodell auslöst. Hingegen waren Brustkrebszellen mit einem abweichenden Oberflächenprofil hierzu nicht in der Lage bzw. mit nur sehr geringen Angehraten. Ob auch Zelllinien, die von anderen Tumorentitäten etabliert wurden, Tumorstammzellen enthalten, ist bislang nur wenig untersucht. Zur Identifizierung von Tumorstammzellen werden sehr häufig die beiden Oberflächenmoleküle CD44 und CD24 herangezogen. Bei gesunden Zellen hat CD44 eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen, Zelladhäsion sowie Zellmigration (Lesley J et al., 1993). Die Bedeutung von CD24 ist noch weitestgehend ungeklärt. In Tumorzellen verändert sich die Funktion beider Oberflächenmoleküle dahingehend, dass sie vor allem die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen regulieren (Baumann P et al., 2005; Bourguignon LY, 2001). Einige Studien beschreiben aber auch gegenteilige Funktionen von CD24 und CD44 (Lopez JI et al., 2005; Schabath H et al., 2006).

### **1.3 Der Energiestoffwechsel von Körper- und Tumorzellen**

Jede Zelle benötigt zur Aufrechterhaltung ihrer funktionellen und strukturellen Integrität ausreichend Energie. Dieser Energiebedarf wird je nach Stoffwechsellage zu unterschiedlichen Teilen durch den Abbau von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen gedeckt, wobei jeweils der Energieträger Adenosintri-phosphat (ATP) gebildet wird. Wichtigster Energielieferant ist Traubenzucker (Glukose), der im Zytosol über den Embden-Meyerhof-Weg (Glykolyse) unter Bildung von

2 Molekülen ATP pro Molekül Glukose metabolisiert wird. Das dabei entstehende Pyruvat wird unter aeroben Bedingungen über den Citrat-Zyklus zu Kohlendioxid und in der Atmungskette zu Wasser abgebaut (oxidative Phosphorylierung), wobei weitere 36 Moleküle ATP pro Molekül Glukose gebildet werden. Unter anaeroben Bedingungen hingegen wird Pyruvat im Zytosol zu Laktat, dem Anion der Milchsäure reduziert. Dieser Stoffwechselweg wird als Milchsäuregärung bezeichnet.

Tumorzellen weisen oftmals einen veränderten Energiestoffwechsel auf. So beobachteten bereits 1923 Otto Heinrich Warburg und Seigo Minami, dass Tumoren auch in Gegenwart von Sauerstoff Glukose zu Laktat vergären (Tab. 1.1) (Warburg O et al., 1923). Dies widersprach der Beobachtung, dass gesunde Körperzellen in Gegenwart von Sauerstoff Glukose zu Kohlendioxid und Wasser oxidieren. Hierzu sind in den Mitochondrien die Enzyme des Citrat-Zyklus und die Enzymkomplexe der Atmungskette notwendig. Die bioenergetische Besonderheit von Tumorzellen, Laktat auch in Gegenwart von Sauerstoff zu bilden, wurde von O. Warburg als „aerobe Glykolyse“ bzw. von seinem Umfeld als „Warburg-Effekt“ bezeichnet (Tab. 1.1). Warburg verstand dabei unter der Glykolyse die Umwandlung von Zucker zu Laktat, während man heute hierunter den Abbau von Glukose zu Pyruvat versteht. Wird Pyruvat in Laktat umgewandelt, so wird dies als Milchsäuregärung bezeichnet. Aufgrund der geringen Energieausbeute der Milchsäuregärung weisen Tumorzellen einen erhöhten Verbrauch von Glukose auf (Gatenby RA und Gillies RJ, 2004).

Die genetischen Ursachen, die an der Ausprägung des Warburg-Effektes beteiligt sind, werden immer besser verstanden. Mutationen in Protoonkogenen (z.B. Ras und Akt) bzw. Tumorsuppressorgenen (z.B. LKB1 und VHL) führen u.a. zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 (*hypoxia-inducible factor*), der eine zentrale Rolle im Tumorstoffwechsel einnimmt. Schnell wachsende Tumoren verbrauchen viel Glukose und geraten sehr rasch in einen Sauerstoffmangel (Hypoxie). Fehlt ihnen in dieser Situation HIF-1, dann können sie nicht mehr wachsen, da dieser Transkriptionsfaktor ihnen hilft, unter Hypoxie Glukose in Energie umzuwandeln (Gatenby RA und Gillies RJ, 2004; Shaw RJ, 2006).

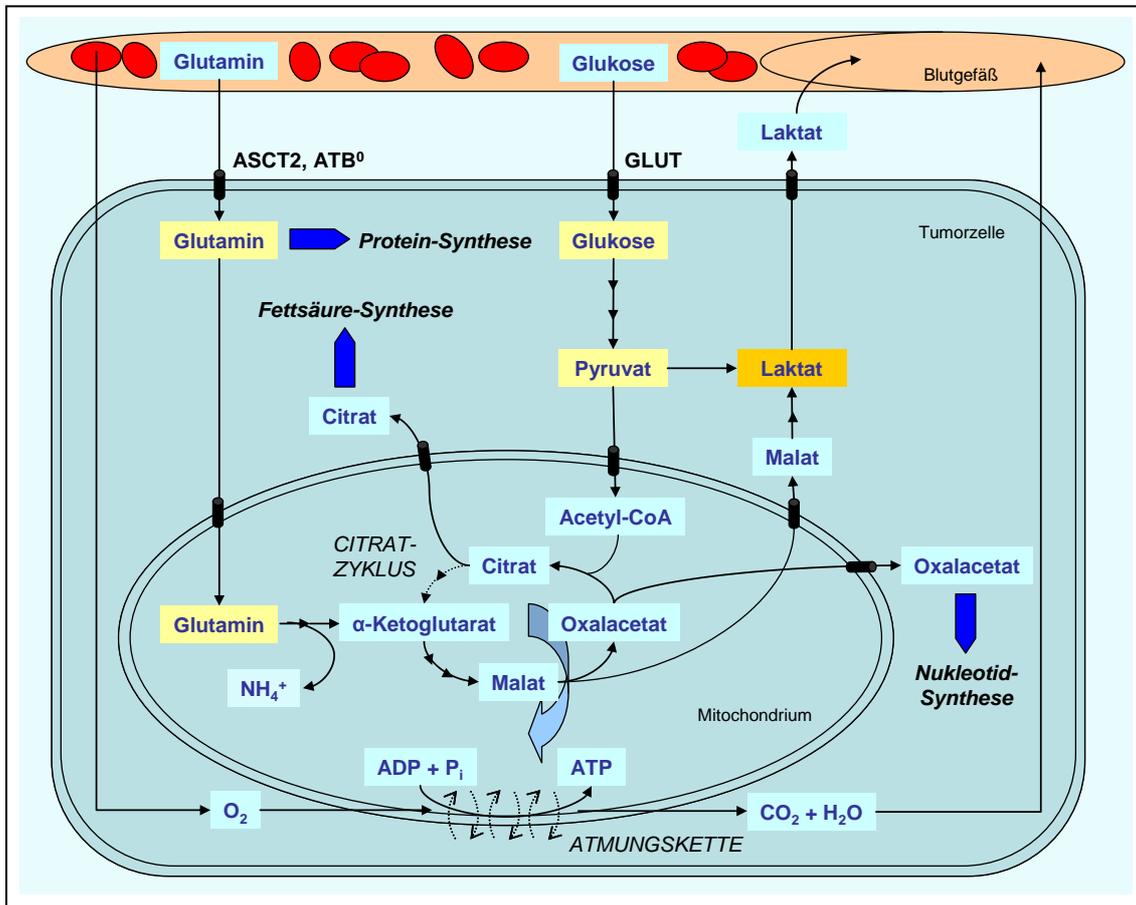
Hierzu steigert HIF-1 die Expression von Enzymen der Glykolyse, während die Synthese und Funktion mitochondrialer Enzyme für den weiteren Abbau von Glukose-Derivaten partiell bzw. komplett inhibiert werden (Moreno-Sánchez R, 2007). Zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung induziert HIF-1 außerdem die Bildung neuer Blutgefäße (Neovaskularisierung). Um den erhöhten Bedarf der Krebszellen an Glukose zu decken, wird durch HIF-1 zudem die Überexpression spezifischer Glukosetransporter (GLUT) gesteuert. Dabei werden aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften insbesondere die für Glukose hochaffinen Transporter GLUT-1 und GLUT-3 exprimiert (Marín-Hernández A et al., 2009; Macheda ML et al., 2005).

**Tabelle 1.1: Die Abbauwege von Glukose in An- und Abwesenheit von Sauerstoff.** Die von Warburg beobachtete Fähigkeit von Tumoren, Glukose auch in Anwesenheit von Sauerstoff zu Laktat zu vergären („aerobe Glykolyse“), ist bei normalen Körperzellen nicht bzw. nur in geringem Ausmaß zu finden (Moreno-Sánchez R, 2007).

|             | Umgebungsbedingungen   |                              |
|-------------|--|------------------------------|
|             | aerob  | anaerob                      |
| Körperzelle | CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O<br>(oxidative Phosphorylierung)   | Laktat<br>(Milchsäuregärung) |
| Tumorzelle  | Laktat<br>(„aerobe Glykolyse“)<br><b>und</b><br>CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O<br>(oxidative Phosphorylierung) | Laktat<br>(Milchsäuregärung) |

Der geringen Energieausbeute und der Abhängigkeit von einer ausreichenden Versorgung mit Glukose zum Trotz, ergeben sich durch den Warburg-Effekt eine Reihe von Vorteilen für Tumorzellen: so können sie im Gegensatz zu gesunden Körperzellen auch bei fluktuierender Sauerstoffversorgung überleben (Pouysségur J et al., 2006); zudem nutzen sie zahlreiche Intermediate der Glykolyse als Kohlenstoffquelle zum Aufbau körpereigener Bestandteile (Anabolismus) (Kroemer G und Pouysségur J, 2008). Des Weiteren übernimmt das von den Zellen gebildete Laktat wichtige biologische Funktionen im Stoffwechsel von Tumorzellen (Fischer K et al., 2007; Swietach P et al., 2007). Zudem

wird Laktat unter aeroben Bedingungen auch zur Energiegewinnung genutzt (Sonveaux P et al., 2008).



**Abbildung 1.1: Die Bildung von Laktat aus dem Abbau von Glukose und Glutamin** (modifiziert nach Vander Heiden MG et al., 2009). Über Glukosetransporter (GLUT) gelangt Glukose in die Zelle und wird dort über Pyruvat zu Laktat abgebaut (Tab. 1.1: „aerobe Glykolyse“). Nur ein geringer Anteil des Pyruvats wird in Acetyl-CoA umgewandelt und in den Citrat-Zyklus eingeschleust. Glutamin wird nach seiner Aufnahme über Na<sup>+</sup>-abhängige Aminosäuretransporter (ASCT2 und ATB<sup>0</sup>) in einem verkürzten Citrat-Zyklus zu Malat abgebaut, das seinerseits decarboxyliert und über Pyruvat (nicht gezeigt) zu Laktat reduziert wird. Die dabei anfallenden Reduktionsäquivalente (nicht gezeigt) werden im anabolen Stoffwechsel der Tumorzelle verwendet. Malat kann aber auch in Oxalacetat bzw. Citrat umgewandelt und so für die Nukleotid- bzw. Fettsäuresynthese genutzt werden. Die im Citrat-Zyklus anfallenden Reduktionsäquivalente (symbolisiert durch gebogenen Blockpfeil) werden für die Gewinnung des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) in der Atmungskette eingesetzt.

Tumoren bilden auch beim Abbau der nicht-essentiellen Aminosäure Glutamin Laktat. Die bei diesem als Glutaminolyse bezeichneten Stoffwechselweg entstehenden Reduktionsäquivalente führen in der Atmungskette zur Bildung von circa 9 Molekülen ATP pro Molekül Glutamin (Reitzer LJ et al., 1979;

DeBerardinis RJ et al., 2008). Während die Glykolyse, chemisch handelt es sich hierbei um eine Dehydrogenierung von Glukose zu Pyruvat, ohne Sauerstoff abläuft, setzt die Glutaminolyse ein hohes Sauerstoffangebot voraus. Da Tumoren ab einer bestimmten Größe in der Regel mit Sauerstoff minderversorgt sind, können die hypoxischen Zellen Glutamin unter den herrschenden anaeroben Bedingungen als Energiequelle nicht nutzen (Kallinowski F et al., 1987) (Abb. 1.1). Auch die Metabolite des Glutamin-Stoffwechsels werden für anabole Stoffwechselwege, u.a. für die Protein-, Fettsäure- und Nukleotidsynthese, genutzt (Matés JM et al., 2009; Medina MA et al., 1992).

#### **1.4 Zielsetzung**

Wie im letzten Kapitel erläutert, geht die Entstehung von Krebs maßgeblich mit Veränderungen im Stoffwechsel einher. Für die Energieversorgung von Krebszellen unter hypoxischen Bedingungen kommt der Glukose als leicht aufzuschließendem Energieträger eine maßgebliche Bedeutung zu. Hierzu passt, dass der Anstieg der Krebsrate seit dem 2. Weltkrieg mit dem steigenden Zuckerkonsum korreliert (Cordain L et al., 2005). Auch Studien, die einen Zusammenhang zwischen geänderten Ernährungsgewohnheiten und der Entstehung von Krebs herstellen, komplettieren dieses Bild. So belegt u.a. eine Studie des Stockholmer Karolinska Instituts, dass ein übermäßiger Konsum gesüßter Nahrungsmittel sowie zuckerhaltiger Getränke die Entstehung von Pankreaskrebs begünstigt (Larsson SC et al., 2006).

Um nicht auf klinisches Material angewiesen zu sein, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene humane Tumorzelllinien untersucht. Zunächst wurde die Verteilung der beiden Oberflächenmarker CD44 und CD24 auf diesen Zelllinien überprüft, da beide Marker die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen regulieren und sie somit zur Abschätzung der Malignität herangezogen werden (s. auch Kap. 1.2) (Baumann P et al., 2005; Bourguignon LY, 2001). Aufgrund der Verteilung der beiden Marker sind folgende Phänotypen denkbar:

CD44<sup>pos</sup> / CD24<sup>pos</sup> (CD44<sup>+</sup> / CD24<sup>+</sup>)  
CD44<sup>pos</sup> / CD24<sup>neg</sup> (CD44<sup>+</sup> / CD24<sup>-</sup>)  
CD44<sup>neg</sup> / CD24<sup>pos</sup> (CD44<sup>-</sup> / CD24<sup>+</sup>)  
CD44<sup>neg</sup> / CD24<sup>neg</sup> (CD44<sup>-</sup> / CD24<sup>-</sup>)

Die gesteigerte Glukoseaufnahme von Tumoren korreliert mit deren Malignität und der Lebenserwartung von Krebspatienten (Kunkel M et al., 2003; Mochiki E et al., 2004); gleiches gilt für eine starke Laktatbildung (Walenta S et al., 2000). Für die vorliegende Arbeit wurden unterschiedliche Tumorzelllinien (Tab. 3.2) hinsichtlich ihrer Glukoseaufnahme und Laktatbildung sowie ihrer Malignität untersucht. Da die Tumorzelllinien ursprünglich aus Biopsien klinischer Tumoren etabliert wurden, sollten sie deren Eigenschaften „konserviert“ haben und diese bei den entsprechenden Untersuchungen aufweisen.

Weiter wurde in dieser Arbeit untersucht, ob in den zur Verfügung stehenden Tumorzelllinien eine mögliche Abhängigkeit des Tumorstoffwechsels von Glutamin nachzuweisen ist. Glutamin als nicht-essentielle Aminosäure ist *in vivo* ein Hauptbestandteil der freien Aminosäuren und wird aus diesem Grund den Nährmedien zugefügt.

Abschließend wurden die in dieser Arbeit erhobenen Daten unter dem Gesichtspunkt betrachtet, ob ein Zusammenhang zwischen einem bestimmten Oberflächenprofil und dem Energiestoffwechsel hergestellt werden kann.

## 2 Fragen

---

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, neun Tumorzelllinien hinsichtlich ihres Oberflächenprofils und des Warburg-Effektes zu untersuchen. Hierzu werden folgende Fragen gestellt:

- 1) Wie unterscheiden sich die getesteten Tumorzelllinien hinsichtlich der Verteilung von CD44 und CD24 auf ihrer Oberfläche?
- 2) Welche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten gibt es im Glukosestoffwechsel der untersuchten Tumorzelllinien? Welche Besonderheiten fallen bei der Messung der Glukoseaufnahme sowie der Laktatbildung auf?
- 3) Sind Tumorzelllinien nachzuweisen, deren Oberflächenprofil mit einem bestimmten Stoffwechsel korreliert?

### 3 Material und Methoden

---

#### 3.1 Kulturmedien und Pufferlösung

Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 in „Dutch Modification“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit folgenden Zusätzen (in Klammern jeweils die Endkonzentration) verwendet: Penicillin G (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/L), Natriumpyruvat (1 mmol/L), 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (alle Zusätze von Invitrogen GmbH, Karlsruhe) sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Cell Concepts GmbH, Umkirch). Als Standardmedium enthielt dieses Kulturmedium Glukose (2 g/L bzw. 11 mmol/L) und Glutamin (0,3 g/L bzw. 2 mmol/L). Folgende modifizierte RPMI-Medien wurden verwendet: Glukose-freies Medium (Glc<sup>-</sup> Gln<sup>+</sup>), Glutamin-freies Medium (Glc<sup>+</sup> Gln<sup>-</sup>) und Glukose- und Glutamin-freies Medium (Glc<sup>-</sup> Gln<sup>-</sup>). Mit Ausnahme von Glukose und Glutamin wurden keine Veränderungen am Medium vorgenommen (Tab. 3.1).

**Tabelle 3.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien.** Zu den Zusätzen siehe Text.

| Nährmedium                    | Bezeichnung                       | Glukose | Glutamin | Zusätze |
|-------------------------------|-----------------------------------|---------|----------|---------|
| Glukose- und Glutamin-haltig  | Glc <sup>+</sup> Gln <sup>+</sup> | +       | +        | +       |
| Glukose-frei, Glutamin-haltig | Glc <sup>-</sup> Gln <sup>+</sup> | -       | +        | +       |
| Glukose-haltig, Glutamin-frei | Glc <sup>+</sup> Gln <sup>-</sup> | +       | -        | +       |
| Glukose- und Glutamin-frei    | Glc <sup>-</sup> Gln <sup>-</sup> | -       | -        | +       |

Für humane Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen wurden spezielle, auf diese Zelltypen abgestimmte Medien verwendet:

**Medium für Fibroblasten (“Fibroblast Growth Medium 2”).** Das verwendete Medium der Firma PromoCell® (Heidelberg, Kat.-Nr.: C-23020) enthielt Insulin (5 µg/mL), bFGF (1 ng/mL), Glukose (8 mmol/L) und 2 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (Endkonzentration in Klammern).

**Medium für Makrophagen („DMEM Low Glucose“).** Das Medium (Cell Concepts, Umkirch, Kat.-Nr.: M-L2501-I) enthielt 5,6 mmol/L Glukose, 2 mmol/L L-Glutamin sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum.

**Medium für Endothelzellen („Endothelial Cell Growth Medium“).** Das Medium der Firma PromoCell® GmbH (Heidelberg, Kat.-Nr.: C-22010) enthielt 5,6 mmol/L Glukose sowie 2 % hitzeinaktiviertes Kälberserum, ECGS/Heparin (0,4 %), EGF (0,1 ng/mL), bFGF (1 ng/mL) und Hydrocortison (1 µg/mL) (Endkonzentration in Klammern).

**PBS („Phosphate buffered saline“).** Diese phosphatgepufferte Salzlösung (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) bestand aus Natriumchlorid (140 mmol/L), Kaliumchlorid (2,7 mmol/L), Natriumdihydrogenphosphat (7,2 mmol/L) sowie Kaliumhydrogenphosphat (1,47 mmol/L).

### **3.2 Zelllinien**

In Tab. 3.2 sind die verwendeten Tumorzelllinien aufgelistet. Sämtliche Zellen wuchsen adhärent und waren frei von Mycoplasmen. Als Kontrollzelllinien wurden „Human Umbilical Vein Endothelial Cells“ (HUVEC) und „Normal Human Dermal Fibroblasts“ (NHDF) der Firma PromoCell® GmbH sowie Mäuse-Makrophagen (J774.2) (über die Firma Cell Concepts GmbH bezogen) verwendet.

#### **3.2.1 Zellkultivierung**

Alle untersuchten Zelllinien wurden im CO<sub>2</sub>-Inkubator (NU-5500 DH Duraflo CO<sub>2</sub>, NuAire Inc., Plymouth, U.S.A.) bei Standardbedingungen von 37°C, 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Kat.-Nr.: 658175) kultiviert. In regelmäßigen Abständen (2 bis 3-mal pro Woche) wurde das Kulturmedium ausgetauscht bzw. die Zellen „passagiert“ (s. hierzu Zellernte).

### 3.2.2 Zellernte

Die Zellen wurden mit Trypsin / EDTA (0,5 % / 0,22 % in PBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, mit 50 mL PBS aufgenommen und für 6 Minuten bei 397 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in einem definierten Volumen PBS resuspendiert und anschließend die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit 0,04 % (Endkonzentration) Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gefärbt.

**Tabelle 3.2: Tumor- und Kontrollzelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden.** Mit Ausnahme von J774.2 sind sämtliche Zelllinien humanen Ursprungs.

| Zelllinie | Gewebe                     | Bezugsquelle                             |
|-----------|----------------------------|--|
| HT-29     | Kolon                      | DSMZ <sup>*)</sup> , Kat.-Nr.: ACC 299   |
| 23132/87  | Magen                      | DSMZ <sup>*)</sup> , Kat.-Nr.: ACC 201   |
| MDAMB-231 | Mamma                      | ATCC <sup>**)</sup> , Kat.-Nr.: HTB-26   |
| MDAMB-468 | Mamma                      | ATCC <sup>**)</sup> , Kat.-Nr.: HTB-132  |
| MCF-7     | Mamma                      | ATCC <sup>**)</sup> , Kat.-Nr.: HTB-22   |
| BT-20     | Mamma                      | ATCC <sup>**)</sup> , Kat.-Nr.: HTB-19   |
| SKOV-3    | Ovar                       | ATCC <sup>**)</sup> , Kat.-Nr.: HTB-77   |
| BXPC-3    | Pankreas                   | ATCC <sup>**)</sup> , Kat.-Nr.: CRL-1687 |
| HRT-18    | Rektum                     | ATCC <sup>**)</sup> , Kat.-Nr.: CCL-244  |
| HUVEC     | Nabelschnur-Endothelzellen | PromoCell, Kat.-Nr.: C-12200             |
| NHDF      | Dermale Fibroblasten       | PromoCell, Kat.-Nr.: C-12350             |
| J774.2    | Murine Makrophagen         | Cell Concepts, Kat.-Nr.: 85011428        |

<sup>\*)</sup> Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

<sup>\*\*)</sup> American Type Culture Collection ([www.atcc.org](http://www.atcc.org))

## 3.3 Durchflusszytometrie

### 3.3.1 Theorie

Das Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie basiert auf Fluorochrom-markierten Agenzien, die spezifisch mit den zu untersuchenden Zellen interagieren und nach Anregung durch eine Energiequelle (Laserlicht) Photonen emittieren. Diese Fluoreszenzen werden gemessen und graphisch dargestellt,

wobei sich die Fluoreszenzintensität proportional zur Quantität des untersuchten Parameters verhält. Daneben wird Streulicht in Vorwärtsrichtung (Ablenkwinkel  $1^\circ$  bis  $10^\circ$  zur Achse des Laserlichtes; Forward angle light scatter = FCS) als Maß der Zellgröße sowie Seitwärtsstreulicht (Ablenkwinkel  $90^\circ$  zur Achse des Laserlichtes; Side angle light scatter = SSC) als Maß für Granularität und „Membranunregelmäßigkeiten“ einer Zelle gemessen.

Die zur Phänotypisierung verwendeten Fluorochrom-markierten Antikörper waren mit R-Phycoerythrin (PE; Emissionsmaximum bei 575 nm) bzw. mit Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC; Emissionsmaximum bei 520 nm) konjugiert.

### **3.3.2 CD44 / CD24-Phänotypisierung**

Jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen der zu untersuchenden Tumorzelllinien wurden in 50  $\mu\text{L}$  PBS mit dem anti-CD44 Antikörper G44-26 (PE-konjugiert; BD Biosciences, Heidelberg) bzw. dem anti-CD24 Antikörper ML5 (FITC-konjugiert; BD Biosciences, Heidelberg) für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Bei Verwendung von zwei Antikörpern pro Probenröhrchen (Doppelmarkierung) wurden die Antikörper hintereinander inkubiert. Zu jedem Röhrchen wurden 300  $\mu\text{L}$  PBS hinzugegeben und die Proben bei 397 xg für 6 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zur Messung am Durchflusszytometer (FACSscan™, Becton Dickinson, Heidelberg) in 300  $\mu\text{L}$  PBS resuspendiert. Es wurden 10.000 Ereignisse als Endpunkt jeder Messung mit dem Programm BD CellQuest™ Pro (Version 5.1.1) gemessen und gespeichert.

Zur Überprüfung unspezifischer Antikörperbindungen wurde als Negativkontrolle pro Messreihe jeweils ein gesondertes Probenröhrchen mit 1  $\mu\text{L}$  eines nicht-bindenden Antikörpers, der den gleichen Isotyp wie die Analyse-Antikörper G44-26 bzw. ML5 aufwies (PE-konjugierter Maus IgG<sub>1, $\kappa$</sub>  Antikörper bzw. FITC-konjugierter Maus IgG<sub>1, $\kappa$</sub>  Antikörper) (beide BD Biosciences), verwendet. Ein weiteres Probenröhrchen wurde ohne Zusätze („Solo“-Röhrchen) gemessen, um die Hintergrundfluoreszenz der jeweiligen Messreihe zu bestimmen. Der Anteil toter Zellen wurde mittels 10-minütiger Inkubation in 5  $\mu\text{L}$  7-Aminoactino-

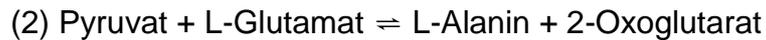
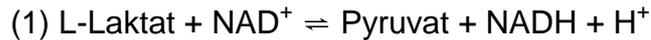
mycin (7-AAD) (BD Biosciences, Heidelberg) in einem weiteren Röhrchen festgelegt („Vitalitätsröhrchen“).

### **3.3.3 Messung der Glukoseaufnahme**

Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen, resuspendiert in 500  $\mu\text{L}$  Kulturmedium ( $\text{Glc}^+ \text{Gln}^+$ ), wurden in einer Zellkulturschale mit 24 Vertiefungen (transparent, Flachboden) (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) für 24 Stunden im  $\text{CO}_2$ -Inkubator kultiviert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 500  $\mu\text{L}$  PBS gewaschen, bevor sie in 500  $\mu\text{L}$  Glukose-freies Medium ( $\text{Glc}^- \text{Gln}^+$ ) für 15 Minuten, 1 Stunde und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Die Zellen wurden mit 500  $\mu\text{L}$  PBS gewaschen und anschließend mit dem Fluorochrom-markierten D-Glukoseanalogon 2-NBDG (2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglukose) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in 500  $\mu\text{L}$  PBS (Endkonzentration 0,2 mmol/L) für 30 und 60 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  bzw.  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und vom Plattenboden mit Trypsin / EDTA (0,5 % / 0,22 % in PBS) abgelöst. Die Zellen wurden pelletiert (397 xg für 6 Minuten) und in 300  $\mu\text{L}$  PBS am Durchflusszytometer gemessen. Als Negativkontrolle wurde eine Probe gleicher Zellzahl ohne Inkubation mit 2-NBDG („Kontrolle“) verwendet. Die Vitalität der Zellen wurde mit 7-AAD überprüft.

### **3.4 Messung der Laktatbildung**

Jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen der betreffenden Tumorzelllinie wurden in 100  $\mu\text{L}$  Nährmedium für 24, 48 bzw. 72 Stunden in einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen (transparent, Flachboden) (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) im  $\text{CO}_2$ -Inkubator kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der entnommene Überstand in Reaktionsgefäße (Eppendorf AG, Hamburg) bei  $-25^\circ\text{C}$  bis zur Messung gelagert. Für die Bestimmung der Laktatkonzentration im Überstand wurde der Laktat-Assay der Firma R-Biopharm AG (Darmstadt, Kat.-Nr.: 10139084035) verwendet, der auf den nachfolgenden Reaktionen beruht:



Das Gleichgewicht der ersten Reaktion liegt zwar auf der Seite von Laktat, doch mit Hilfe der Glutamat-Pyruvat-Transaminase wird Pyruvat zu Alanin umgewandelt (Reaktion 2), wodurch sich das Gleichgewicht der ersten Reaktion auf die Seite von Pyruvat und  $\text{NADH} + \text{H}^+$  verschiebt. Die Menge an reduziertem NADH, die äquivalent zur Menge an Laktat ist, wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt. Die photometrischen Messungen erfolgten im Mikroplatten-Lesegerät GENios Plus (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) und die Messdaten wurde mit dem Programm XFLUOR4 (Version 4.51) aufgenommen. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Aliquot mit bekannter Laktatmenge sowie ein Aliquot des jeweiligen Nährmediums verwendet. Als Negativkontrolle („Leerwert“) wurde Reinstwasser verwendet. Die zur Herstellung der Reaktionslösungen benötigten Mengen wurden der Anleitung des Laktatassays entnommen, ebenso die Formel<sup>1</sup> zur Berechnung der Laktatmenge aus den gemessenen Extinktionswerten für NADH.

### 3.5 Immunhistochemie

Jeweils  $3 \times 10^5$  Zellen wurden in 500  $\mu\text{L}$  PBS bei 143 xg für 5 Minuten auf Glasobjektträger zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und bei  $-25^\circ\text{C}$  gelagert. Vor der immunhistochemischen Untersuchung wurden die Zellen fixiert, indem die Objektträger aus dem Gefrierschrank unmittelbar in 2 %ige Formaldehyd-Lösung (mit PBS verdünnt) überführt und für 10 Minuten inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen nacheinander mit 0,05 %iger Triton-X100-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Kat-Nr.: 1.08603.1000) für 10 Minuten, mit

---

<sup>1</sup> Zur Bestimmung der Laktat-Konzentration in g/L durch Messung der Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  [ $\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$ ] wurde folgende Formel verwendet:  $c \text{ (g/L)} = (V * \text{MG} / \epsilon * d * v * 1000) * \Delta E$ . Testvolumen  $V \text{ [mL]} = 0,224 \text{ mL}$ , Molekulargewicht (MG) von Laktat = 90,1 g/mol, Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von NADH bei 340 nm = 6,3 L/mmol \* cm und Probevolumen  $v \text{ [mL]} = 0,010 \text{ mL}$  sind vom Hersteller vorgegeben.  $d \text{ [cm]} = \text{Schichtdicke von Test- und Probevolumen}$ . Sie wurde für die ELISA-Platte mit 96 Vertiefungen wie folgt berechnet:  $d = V / A = 0,64 \text{ cm}$  mit dem Testvolumen  $V (= 0,224 \text{ mL} = 0,224 \text{ cm}^3)$  und der Fläche ( $A = 0,35 \text{ cm}^2$ ).  $E_1 = \text{Extinktion vor Starten der Reaktion}$ ,  $E_2 = \text{Extinktion nach Ablauf der Reaktion}$ .

Peroxidase Blocking Reagens (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Kat.-Nr.: S2001) für 15 Minuten und mit Beriglobin-Lösung (1:50 mit PBS verdünnt) (ZLB Behring AG, Marburg, Kat.-Nr.: 4455849) für weitere 15 Minuten inkubiert. Die Primär-Antikörper gegen GLUT-1 (US Biological, Swampscott/Massachusetts, U.S.A., Kat.-Nr.: G3900-01J) bzw. GLUT-3 (Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Kat.-Nr.: GLUT-301AP) wurden in einer Verdünnung von 1:100 bzw. 1:300 mit *antibody dilution*-Lösung (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Kat.-Nr.: S3022) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden die Objektträger nur mit *antibody dilution*-Lösung inkubiert. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Zellen mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper (Dako, Kat.-Nr.: P0217), der 1:100 mit *antibody dilution*-Lösung verdünnt worden war, für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde zu den Präparaten Diaminobenzidin (Dako, Kat.-Nr.: K3466) gegeben und die Färbereaktion nach 3 Minuten gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte durch Anfärbung der Zellkerne mit Hämalaun. Nach darauffolgender Entwässerung in aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 96 %, 100 % und abschließend in Xylol) wurden die Zellproben mit Einschlußmedium von R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen (Kat.-Nr.: 04-0001) eingedeckt.

### **3.6 Auswertung**

Die am Durchflusszytometer gewonnenen Daten wurden mit dem Freeware-Programm WinMDI (Version 2.8) ausgewertet. Die statistische Auswertung sämtlicher Daten erfolgte mit dem Programm Excel 2003 der Firma Microsoft. Bei wiederholt durchgeführten Messungen wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Minimal- bzw. Maximalwerte dieser Datensätze finden sich jeweils im Anhang.

## 4 Ergebnisse

---

Für diese Arbeit wurden verschiedene Tumorzelllinien (Tab. 3.2) *in vitro* charakterisiert. Im Vordergrund standen die Phänotypisierung der Zellen und Untersuchungen zu ihrem Energiestoffwechsel. Die hierfür verwendeten Zellen waren nach der Zellernte (Kap. 3.2.2) zu circa 90 % vital<sup>2</sup>.

### 4.1 Nachweis der Expression von CD44 und CD24 auf Tumorzellen

Die beiden Oberflächenmoleküle CD44 und CD24 sind für die Identifizierung von Tumorstammzellen von Bedeutung (s. Einleitung). Daher wurden die in Tab. 3.2 aufgelisteten Tumorzelllinien hinsichtlich der Expression beider Marker durchflusszytometrisch analysiert.

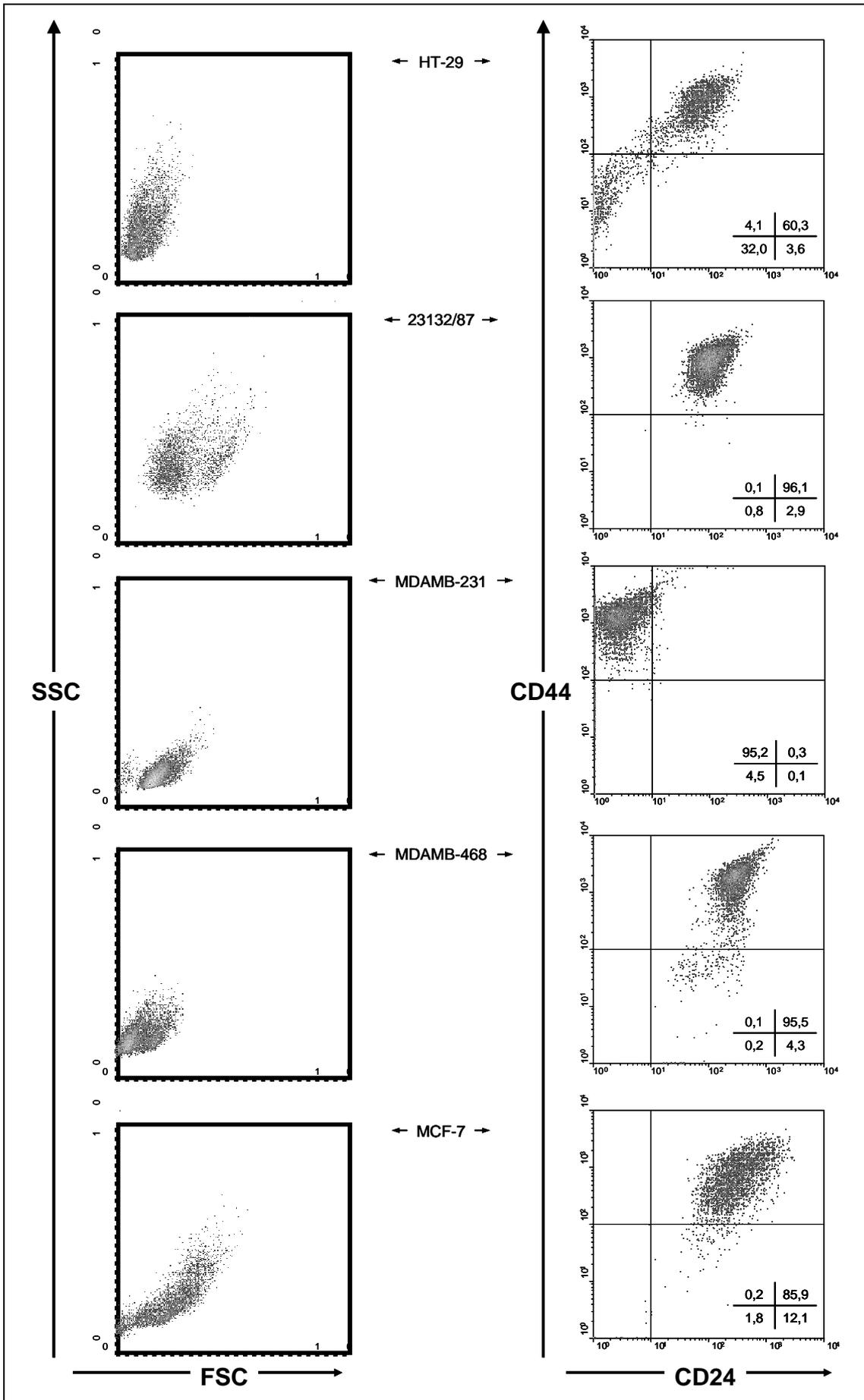
Die Ergebnisse der Phänotypisierung für jede Tumorzelllinie sind in Abb. 4.1 und Tab. 4.1 gezeigt. Auf sämtlichen Tumorzelllinien wurden entweder ein oder beide Marker nachgewiesen; es gab keine Zelllinie, die ausschließlich doppelt negativ war. Doppelt positiv (jeweils > 80 % der Zellen) waren die Zellen der Tumorzelllinien 23132/87, MDAMB-468, MCF-7 und BT-20. Die Zellen der Tumorzelllinien HT-29 und SKOV-3 waren zu einem geringeren Anteil ebenfalls doppelt positiv (jeweils > 50 % der Zellen).

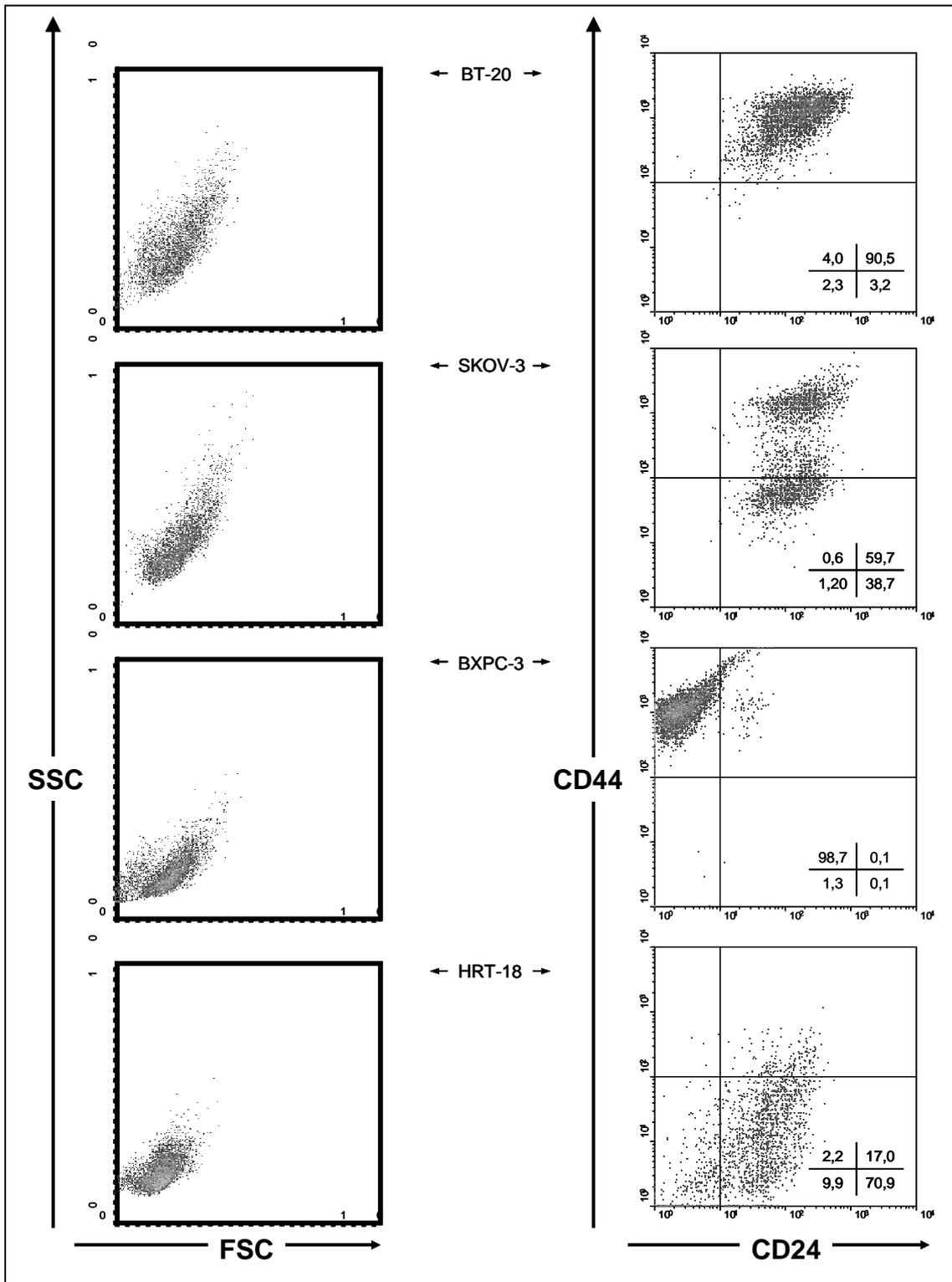
Im Durchschnitt wiesen jeweils mehr als 90 % der Zellen der Tumorzelllinien MDAMB-231 und BXP-3 das Oberflächenprofil CD44<sup>+</sup> / CD24<sup>-</sup> auf. Bei den anderen Zelllinien wurde dieser Phänotyp auf bis zu 9 % der Zellen gefunden.

Die Zellen der Tumorzelllinie HRT-18 waren im Durchschnitt zu 67 % einfach positiv für CD24 (Phänotyp 3 in Tab. 4.1). Zwar waren auch bis zu 38,7 % der Zellen der Tumorzelllinie SKOV-3 einfach positiv für CD24, doch da der Großteil der Zellen doppelt positiv waren, wurden sie dem Phänotyp 1 zugeordnet (Tab. 4.1).

---

<sup>2</sup> Die toten Zellen wurden durchflusszytometrisch mittels 7-AAD (7-Aminoactinomycin) nachgewiesen. Im Durchschnitt betrug der Anteil 7-AAD-positiver Zellen in dieser Arbeit 11,0 % ± 13,5 % (Maximum 46,4 %, Minimum 0,1 %).





**Abbildung 4.1 (auch S. 18):** Durchflusszytometrische Bestimmung von Zellgröße und Granularität (FSC und SSC) sowie des CD44 / CD24-Phänotyps bei Tumorzelllinien. Die Darstellung von Zellgröße und Granularität zeigen jeweils eine deutliche Population. Anhand der CD44 / CD24-Verteilung wurden 3 Phänotypen definiert (s. hierzu Tab. 4.1). Bei den in dieser Abbildung gezeigten Daten handelt es sich um Einzelmessungen, in Tab. 4.1 um die Minimal- bzw. Maximalwerte verschiedener Messungen.

**Tabelle 4.1: Übersicht der Ergebnisse zur CD44 / CD24-Phänotypisierung von neun Tumorzelllinien.** Gezeigt sind die Minimal- und Maximalwerte verschiedener Messreihen („n“ gibt die Anzahl der Messreihen wider). Die Daten dieser Analyse führten zur Identifizierung von drei Phänotypen, wobei die meisten Tumorzelllinien zum Typ 1 (CD44<sup>+</sup> / CD24<sup>+</sup>) gehören. Der jeweilige Phänotyp ist unterstrichen.

| Zelllinie       | n | CD44 <sup>+</sup> / CD24 <sup>+</sup> | CD44 <sup>+</sup> / CD24 <sup>-</sup> | CD44 <sup>-</sup> / CD24 <sup>+</sup> | CD44 <sup>-</sup> / CD24 <sup>-</sup> |
|-----------------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
|                 |   | Maximal- / Minimalwert (%)            |
| HT-29           | 2 | <u>60,3 / 46,8</u>                    | 9,0 / 4,1                             | 4,1 / 3,6                             | 40,1 / 32,0                           |
| 23132/87        | 3 | <u>96,1 / 93,1</u>                    | 0,3 / 0,1                             | 5,7 / 2,9                             | 0,9 / 0,5                             |
| MDAMB-231       | 3 | 0,2 / 0,6                             | <u>95,2 / 91,4</u>                    | 0,1 / 0,1                             | 6,7 / 4,5                             |
| MDAMB-468       | 2 | <u>95,5 / 80,6</u>                    | 0,1 / 0,1                             | 19,0 / 4,3                            | 0,3 / 0,2                             |
| MCF-7           | 2 | <u>85,9 / 80,4</u>                    | 0,4 / 0,2                             | 17,8 / 12,1                           | 1,8 / 1,4                             |
| BT-20           | 2 | <u>90,5 / 89,3</u>                    | 5,9 / 4,0                             | 3,3 / 2,2                             | 2,7 / 2,3                             |
| SKOV-3          | 2 | <u>59,7 / 43,7</u>                    | 0,6 / 0,5                             | 38,7 / 18,7                           | 37,1 / 1,2                            |
| BXPC-3          | 3 | 0,1 / 0,1                             | <u>98,7 / 96,1</u>                    | 0,1 / 0,1                             | 1,3 / 3,9                             |
| HRT-18          | 2 | 17,0 / 14,8                           | 2,2 / 1,1                             | <u>70,9 / 62,9</u>                    | 21,1 / 9,9                            |
| <b>Phänotyp</b> |   | <b>1</b>                              | <b>2</b>                              | <b>3</b>                              |                                       |

Inwieweit diese Phänotypen (Tab. 4.1) charakteristische Eigenschaften im Energiestoffwechsel aufweisen, wurde im Weiteren untersucht.

#### 4.2 Messung der Glukoseaufnahme von Tumorzellen

Glukose nimmt im Stoffwechsel von Tumorzellen eine zentrale Rolle ein (s. Einleitung). Zur Quantifizierung der Glukoseaufnahme der in Tab. 3.2 aufgelisteten Tumorzelllinien wurden diese zuerst für 15 Minuten in Glukose-freies Medium (Glc<sup>-</sup> Gln<sup>+</sup>) (Tab. 3.1) überführt, bevor sie mit dem Fluorochrom-markierten D-Glukoseanalogon 2-NBDG inkubiert wurden. Die Messung der Glukoseaufnahme erfolgte am Durchflusszytometer.

Wie der Tab. 4.2 sowie der Abb. 10.2 im Appendix zu entnehmen ist, nahmen sämtliche getesteten Zellen, unabhängig davon, ob es sich hierbei um benigne oder maligne Zellen handelte, 2-NBDG aus dem Medium auf (zwischen 34,8 und 96,9 %). Die Menge an aufgenommenem 2-NBDG, die durch Messung der

mittleren Fluoreszenzintensität  $\Delta$ MFI bestimmt wurde<sup>3</sup>, war dabei abhängig von Temperatur und Inkubationsdauer (Tab. 4.2, Abb. 4.2).

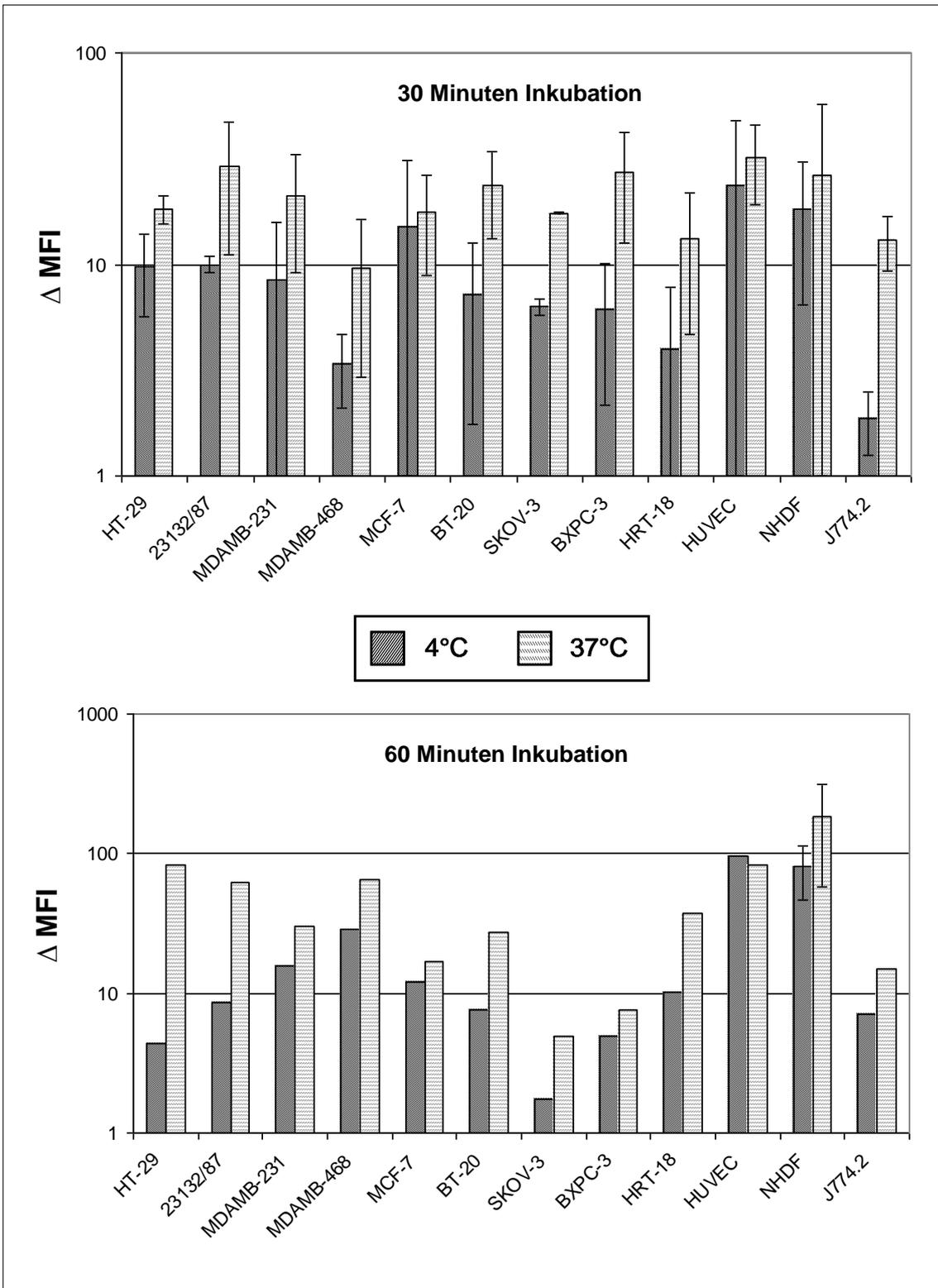
**Tabelle 4.2: Bestimmung der 2-NBDG-Aufnahme ( $\Delta$ MFI) und der 2-NBDG-positiven Zellen (%) nach 30- bzw. 60-minütiger Inkubation bei 4°C und 37°C.** Die Zellen nehmen bei 37°C mehr 2-NBDG auf als bei 4°C. Wesentliche Unterschiede in der Aufnahmekapazität von 2-NBDG zwischen malignen und benignen Zelllinien bestehen nicht. Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte sind im Appendix aufgeführt.

| Zelllinie | 30 min Inkubation |                                     |             | 60 min Inkubation |                                     |              |
|-----------|-------------------|-------------------------------------|-------------|-------------------|-------------------------------------|--------------|
|           | n                 | $\Delta$ MFI (positive Zellen in %) |             | n                 | $\Delta$ MFI (positive Zellen in %) |              |
|           |                   | 4°C                                 | 37°C        |                   | 4°C                                 | 37°C         |
| HT-29     | 2                 | 9,8 (74,5)                          | 18,3 (79,1) | 1                 | 4,4 (56,8)                          | 84,0 (92,0)  |
| 23132/87  | 2                 | 10,0 (82,6)                         | 28,9 (89,8) | 1                 | 8,5 (71,4)                          | 62,8 (86,9)  |
| MDAMB-231 | 2                 | 8,4 (70,0)                          | 21,0 (88,9) | 1                 | 15,9 (84,8)                         | 30,2 (86,7)  |
| MDAMB-468 | 2                 | 3,4 (48,9)                          | 9,7 (60,3)  | 1                 | 28,4 (87,8)                         | 65,1 (92,3)  |
| MCF-7     | 2                 | 15,0 (72,9)                         | 17,7 (86,6) | 1                 | 12,2 (71,7)                         | 17,1 (73,8)  |
| BT-20     | 2                 | 7,2 (72,3)                          | 23,7 (94,6) | 1                 | 7,6 (61,4)                          | 27,1 (85,4)  |
| SKOV-3    | 2                 | 6,3 (78,5)                          | 17,4 (88,5) | 1                 | 1,8 (34,8)                          | 5,0 (47,4)   |
| BXPC-3    | 2                 | 6,1 (66,0)                          | 27,3 (92,5) | 1                 | 4,9 (50,3)                          | 7,6 (53,5)   |
| HRT-18    | 2                 | 4,0 (72,4)                          | 13,3 (91,4) | 1                 | 10,3 (84,4)                         | 37,5 (96,9)  |
| HUVEC     | 3                 | 23,6 (82,6)                         | 32,2 (88,3) | 1                 | 96,6 (96,8)                         | 84,1 (93,1)  |
| NHDF      | 2                 | 18,4 (79,9)                         | 26,3 (66,8) | 3                 | 80,2 (91,3)                         | 184,1 (93,1) |
| J774.2    | 2                 | 1,9 (57,1)                          | 13,0 (88,4) | 1                 | 7,1 (79,8)                          | 14,8 (85,0)  |

Zur einfacheren Abschätzung der Glukoseaufnahme wurde die 2-NBDG-Nettoaufnahme für die einzelnen Zelllinien berechnet<sup>4</sup>. Je höher der Prozentwert für die 2-NBDG-Nettoaufnahme desto größer die Aufnahmekapazität (Tab. 4.3). Dieser Wert lässt Rückschlüsse auf den Glukosebedarf der Zellen zu.

<sup>3</sup> Zur Berechnung von  $\Delta$ MFI siehe Abb. 10.1 im Appendix

<sup>4</sup> Zur Berechnung der 2-NBDG-Nettoaufnahme wurde die 2-NBDG-Aufnahme bei 4°C als Grundumsatz und die 2-NBDG-Aufnahme bei 37°C als Leistungsumsatz der jeweiligen Zelllinie definiert. Als Referenzwert für die 2-NBDG-Nettoaufnahme wurde somit  $\Delta$ MFI (4°C) festgelegt. Die 2-NBDG-Nettoaufnahme in Prozent berechnet sich hieraus wie folgt: 2-NBDG-Nettoaufnahme =  $[(\Delta$ MFI (37°C) -  $\Delta$ MFI (4°C)) /  $\Delta$ MFI (37°C)] \* 100. Die Differenz der 2-NBDG-Nettoaufnahme nach 30 und 60 Minuten wurde als Faktor ausgedrückt: Faktor = 2-NBDG-Nettoaufnahme (60 Minuten) / 2-NBDG-Nettoaufnahme (30 Minuten).



**Abbildung 4.2: Die Aufnahme von 2-NBDG bei Tumorzellen und benignen Zellen nach 30-minütiger (oben) bzw. 60-minütiger (unten) Inkubation mit 2-NBDG bei 4°C und 37°C.** Alle Zelllinien zeigen eine temperaturabhängige Aufnahme von 2-NBDG (Ausnahme HUVEC). Die Messung der 2-NBDG-Aufnahme lässt Rückschlüsse auf den Glukosebedarf der entsprechenden Zellen zu. Der  $\Delta$ MFI ist logarithmisch dargestellt; zu seiner Berechnung siehe Abb. 10.1 im Appendix. Der Anteil 2-NBDG-positiver Zellen ist in Abb. 10.2 dargestellt.

Wie aus Tab. 4.3 zu entnehmen ist, wurde bei den meisten Tumorzelllinien eine 2-NBDG-Nettoaufnahme von 60 bis 70 % nach 30-minütiger Inkubation beobachtet. Die Zelllinien BXPC-3 bzw. HT-29 und MCF-7 fielen durch eine höhere (77,5 %) bzw. kleine (46,3 % und 15 %) 2-NBDG-Nettoaufnahme auf. Die Berechnung der 2-NBDG-Nettoaufnahme für 60 Minuten führte zur Identifizierung von Zellen mit einer hohen Aufnahmekapazität von 2-NBDG. Hierzu gehören die Tumorzelllinien HT-29 und 23132/87 und MCF-7 und die humane Fibroblastenzelllinie NHDF. Bei fünf Tumorzelllinien blieb die 2-NBDG-Nettoaufnahme auch nach 60-minütiger Inkubation nahezu konstant. Hierzu gehören MDAMB-231, MDAMB-468, BT-20, SKOV-3 und HRT-18. Lediglich die Pankreaskarzinomzelllinie BXPC-3 zeigte eine deutliche Abnahme der 2-NBDG-Nettoaufnahme nach 60 Minuten.

**Tabelle 4.3: Bestimmung der 2-NBDG-Nettoaufnahme für die 30- bzw. 60-minütige Inkubation.** Ein hoher Prozentsatz bedeutet eine hohe Glukoseaufnahme bei 37°C zu den jeweiligen Messzeitpunkten. Zelllinien mit einem Faktor  $\geq 1,0$  wird eine hohe Aufnahmekapazität für 2-NBDG zugesprochen. Zur Berechnung der 2-NBDG-Nettoaufnahme siehe Fußnote 4 auf Seite 21. Die zugrundeliegenden Messwerte der 2-NBDG-Aufnahme finden sich im Appendix.

| Zelllinie | 2-NBDG-Nettoaufnahme |            | Faktor der 2-NBDG-Nettoaufnahme nach 60 Minuten |
|-----------|----------------------|------------|---|
|           | 30 Minuten           | 60 Minuten |   |
| HT-29     | 46,3 %               | → 94,8 %   | 2,0   |
| 23132/87  | 65,4 %               | → 86,5 %   | 1,3   |
| MDAMB-231 | 59,9 %               | → 47,5 %   | 0,8   |
| MDAMB-468 | 65,0 %               | → 56,4 %   | 0,9   |
| MCF-7     | 15,0 %               | → 28,8 %   | 1,9   |
| BT-20     | 69,6 %               | → 71,9 %   | 1,0   |
| SKOV-3    | 63,7 %               | → 64,6 %   | 1,0   |
| BXPC-3    | 77,5 %               | → 36,0 %   | 0,5   |
| HRT-18    | 69,9 %               | → 72,6 %   | 1,0   |
| HUVEC     | 26,7 %               | → -14,9 %  | -0,6  |
| NHDF      | 30,0 %               | → 56,4 %   | 1,9   |
| J774.2    | 85,6 %               | → 51,8 %   | 0,6   |

Die Kontrollzelllinien HUVEC, NHDF und J774.2 nahmen ebenfalls alle 2-NBDG auf (Abb. 10.2). Auch sie zeigten eine Abhängigkeit der 2-NBDG-Nettoaufnahme von der Inkubationstemperatur (Tab. 4.2, Abb. 4.2). Da Fibroblasten (NHDF) und Makrophagen (J774.2) sich schneller teilen als HUVEC, scheint es einen Zusammenhang zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und Glukosebedarf zu geben.

Wie Tab. 4.4 zeigt, war die 2-NBDG-Nettoaufnahme durch Verlängerung der Inkubationszeit in Glukose-freiem Medium ( $\text{Glc}^- \text{Gln}^+$ ) (s. Kap. 3.3.3) von 15 Minuten auf bis zu 24 Stunden nicht zu steigern und bewegte sich in einem Bereich zwischen 31 % und 76 %.

**Tabelle 4.4: 2-NBDG-Nettoaufnahme nach Verlängerung der glukosefreien Inkubation bei ausgewählten Zelllinien.** Vor der Zugabe von 2-NBDG wurden die Zellen für 15 Minuten, 1 Stunde bzw. 24 Stunden in Glukose-freiem Medium inkubiert („Hunger“-Versuch). Die Inkubationsdauer mit 2-NBDG betrug 30 Minuten bei 4°C und 37°C. Anschließend wurde der Anteil an aufgenommenem 2-NBDG durchflusszytometrisch ermittelt. Die zugrundeliegenden Messwerte der 2-NBDG-Aufnahme finden sich im Appendix.

| Zelllinie | 2-NBDG-Nettoaufnahme nach Inkubation in Glukose-freiem Medium für |          |            |
|-----------|---|----------|------------|
|           | 15 Minuten  | 1 Stunde | 24 Stunden |
| 23132/87  | 65,4 %  | 75,5 %   | 71,8 %     |
| BT-20     | 69,6 %  | 64,2 %   | 74,0 %     |
| BXPC-3    | 77,5 %  | 30,9 %   | 52,5 %     |
| HUVEC     | 26,7 %  | -24,7 %  | 76,3 %     |
| NHDF      | 30,0 %  | -56,3 %  | 28,2 %     |

### 4.3 Nachweis der Expression der Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 auf Tumorzellen

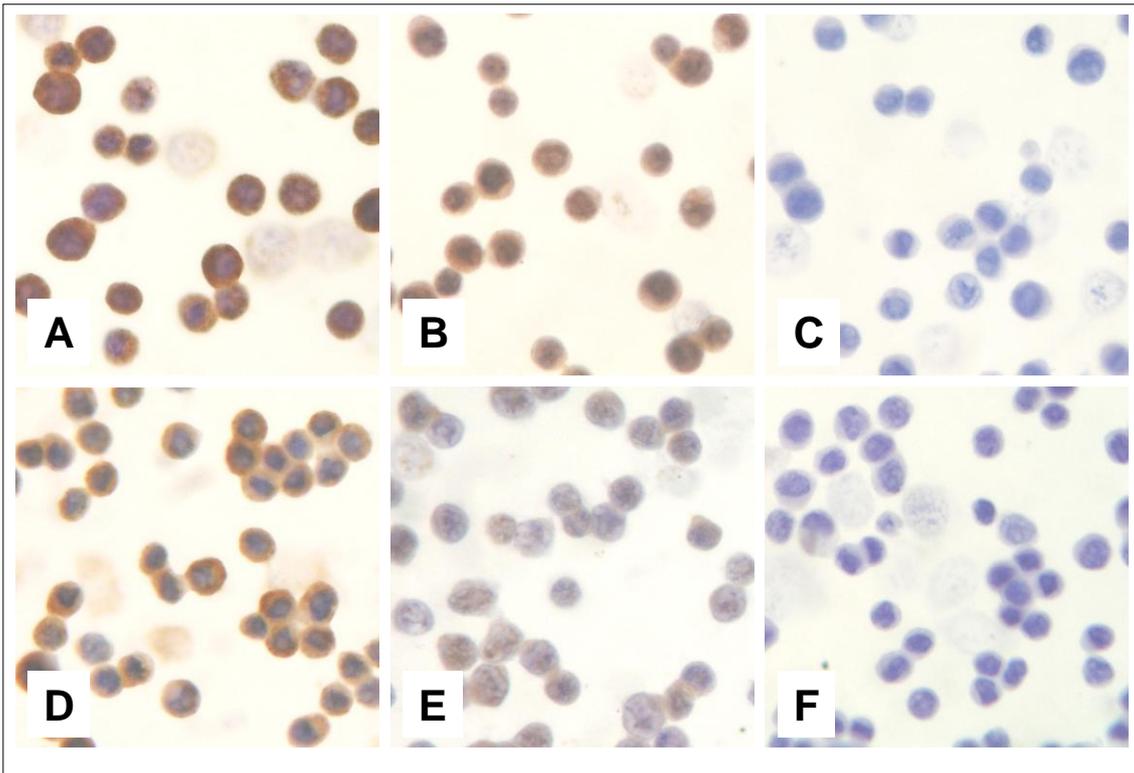
Glukose wird über spezifische Glukosetransporter (GLUT) in das Zellinnere aufgenommen (s. Einleitung). Deshalb wurden die in Tab. 3.2 aufgelisteten Tumorzelllinien hinsichtlich der Expression der Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 immunhistochemisch untersucht.

Wie Tab. 4.5 und Abb. 4.4 zu entnehmen ist, waren die Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 auf den Zellen aller getesteten Zelllinien nachzuweisen; dabei waren jeweils mehr als 80 % der Zellen positiv. Die Stärke der Expression wurde semiquantitativ über die Färbeintensität der immunhistochemischen Färbung bestimmt. Ein hoher Wert für die Färbeintensität bedeutet eine starke Expression von GLUT-1 bzw. GLUT-3. Demnach wurde GLUT-1 und GLUT-3 auf den meisten Tumorzelllinien mittelstark bis stark exprimiert. Auf den Zelllinien HT-29 und MDAMB-468 wurde GLUT-3 schwach exprimiert.

Auf den Kontrollzelllinien HUVEC, NHDF und J774.2 wurde GLUT-1 schwach exprimiert. GLUT-3 wurde auf den Zelllinien HUVEC und NHDF stark und auf der Zelllinie J774.2 schwach exprimiert.

**Tabelle 4.5: Semiquantitative Ergebnisse zur Expression der beiden Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3.** Zeichenerklärung: (+) = < 50 % positive Zellen, (++) = 50 - 80 % positive Zellen, (+++) = > 80 % positive Zellen, (1) = schwache Färbung, (2) = mittelstarke Färbung, (3) = starke Färbung. Vergleiche hierzu auch Abb. 4.4.

| Zelllinie | GLUT-1          |                 | GLUT-3          |                 |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|           | positive Zellen | Färbeintensität | positive Zellen | Färbeintensität |
| HT-29     | +++             | 2               | +++             | 1               |
| 23132/87  | +++             | 3               | +++             | 3               |
| MDAMB-231 | +++             | 2               | +++             | 3               |
| MDAMB-468 | +++             | 3               | +++             | 1 - 2           |
| MCF-7     | +++             | 3               | +++             | 3               |
| BT-20     | +++             | 2               | +++             | 2 - 3           |
| SKOV-3    | +++             | 3               | +++             | 2               |
| BXPC-3    | +++             | 3               | +++             | 3               |
| HRT-18    | +++             | 2               | +++             | 2               |
| HUVEC     | +++             | 1               | +++             | 3               |
| NHDF      | +++             | 1               | +++             | 3               |
| J774.2    | +++             | 1               | +++             | 1               |



**Abbildung 4.4:** Expression von GLUT-1 (A und D) und GLUT-3 (B und E) auf den Zelllinien 23132/87 (obere Reihe) und HT-29 (untere Reihe). Eine starke Färbeintensität bedeutet eine starke Expression von GLUT-1 bzw. GLUT-3. Negativkontrollen: (C) und (F). 200-fache Vergrößerung.

Das Ergebnis dieser immunhistochemischen Untersuchung ist, dass sämtliche untersuchten Zellen die beiden Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 exprimieren – ein Hinweis auf die Bedeutung von Glukose als Energieträger.

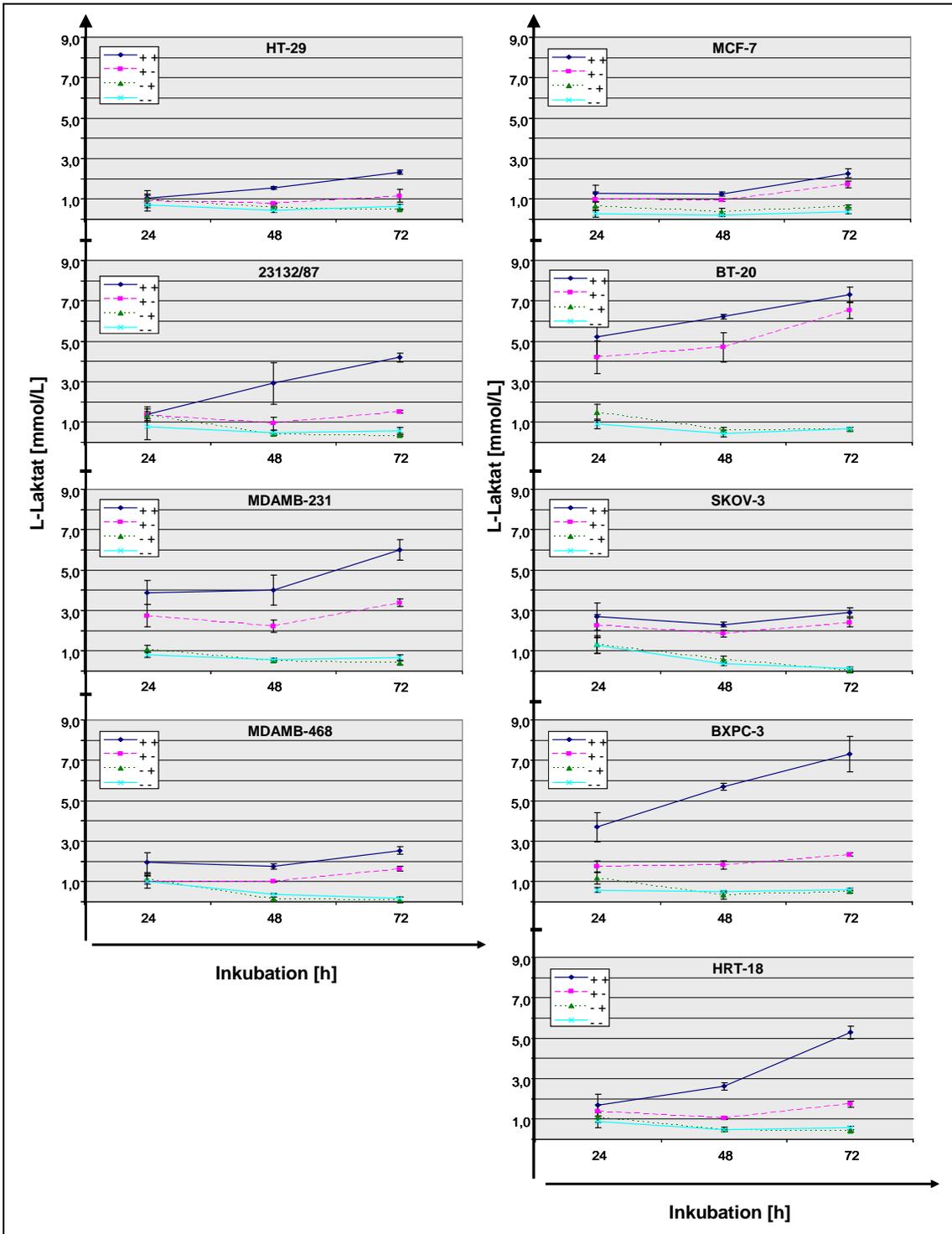
#### 4.4 Messung der Laktatbildung durch Tumorzellen

In Tumorzellen wird auch unter aeroben Bedingungen Glukose zu Laktat verstoffwechselt (Warburg-Effekt). Auch die nicht-essentielle Aminosäure Glutamin kann zu Laktat umgewandelt werden (s. Einleitung). Um untersuchen zu können, ob Laktat aus Glukose bzw. Glutamin gebildet wird, wurden die Tumorzellen in den folgenden Medien inkubiert (Tab. 3.1): Glukose- und Glutaminhaltiges Kulturmedium ( $\text{Glc}^+ \text{Gln}^+$ ), Glutamin-freies Medium ( $\text{Glc}^+ \text{Gln}^-$ ) und Glukose-freies Medium ( $\text{Glc}^- \text{Gln}^+$ ). Das Glukose- und Glutamin-freie Medium ( $\text{Glc}^- \text{Gln}^-$ ) wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

**Tabelle 4.6: Übersicht zur Bildung von Laktat durch Tumorzelllinien.** Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte finden sich im Appendix.

| Zelllinie | n | Messzeitpunkt (Stunden) | L-Laktat (mmol/L)                 |                                   |                                   |                                   |
|-----------|---|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|           |   |                         | Glc <sup>+</sup> Gln <sup>+</sup> | Glc <sup>+</sup> Gln <sup>-</sup> | Glc <sup>-</sup> Gln <sup>+</sup> | Glc <sup>-</sup> Gln <sup>-</sup> |
| HT-29     | 6 | 24                      | 1,04                              | 0,91                              | 0,97                              | 0,69                              |
|           | 6 | 48                      | 1,55                              | 0,78                              | 0,56                              | 0,43                              |
|           | 6 | 72                      | 2,32                              | 1,15                              | 0,48                              | 0,63                              |
| 23132/87  | 6 | 24                      | 1,38                              | 1,36                              | 1,35                              | 0,78                              |
|           | 6 | 48                      | 2,92                              | 0,93                              | 0,39                              | 0,48                              |
|           | 6 | 72                      | 4,21                              | 1,51                              | 0,35                              | 0,59                              |
| MDAMB-231 | 6 | 24                      | 3,88                              | 2,73                              | 1,10                              | 0,81                              |
|           | 6 | 48                      | 4,00                              | 2,23                              | 0,49                              | 0,58                              |
|           | 6 | 72                      | 6,01                              | 3,38                              | 0,40                              | 0,67                              |
| MDAMB-468 | 6 | 24                      | 1,95                              | 1,02                              | 1,10                              | 1,02                              |
|           | 6 | 48                      | 1,76                              | 0,99                              | 0,14                              | 0,36                              |
|           | 6 | 72                      | 2,54                              | 1,63                              | 0,10                              | 0,18                              |
| MCF-7     | 6 | 24                      | 1,27                              | 0,98                              | 0,64                              | 0,27                              |
|           | 6 | 48                      | 1,24                              | 0,95                              | 0,38                              | 0,20                              |
|           | 6 | 72                      | 2,27                              | 1,70                              | 0,65                              | 0,37                              |
| BT-20     | 6 | 24                      | 5,21                              | 4,20                              | 1,48                              | 0,90                              |
|           | 6 | 48                      | 6,22                              | 4,71                              | 0,60                              | 0,45                              |
|           | 6 | 72                      | 7,32                              | 6,53                              | 0,65                              | 0,68                              |
| SKOV-3    | 6 | 24                      | 2,68                              | 2,24                              | 1,31                              | 1,27                              |
|           | 6 | 48                      | 2,30                              | 1,87                              | 0,57                              | 0,35                              |
|           | 6 | 72                      | 2,92                              | 2,40                              | 0,02                              | 0,12                              |
| BXPC-3    | 6 | 24                      | 3,70                              | 1,75                              | 1,17                              | 0,59                              |
|           | 6 | 48                      | 5,70                              | 1,82                              | 0,33                              | 0,49                              |
|           | 6 | 72                      | 7,31                              | 2,34                              | 0,49                              | 0,61                              |
| HRT-18    | 6 | 24                      | 1,69                              | 1,37                              | 1,09                              | 0,86                              |
|           | 6 | 48                      | 2,62                              | 1,05                              | 0,48                              | 0,46                              |
|           | 6 | 72                      | 5,28                              | 1,74                              | 0,42                              | 0,56                              |

Je nach Nährmedium wurden unterschiedliche Laktatmengen im Überstand nachgewiesen (Tab. 4.6 und Abb. 4.5). Der Anteil toter Zellen im Überstand war bei allen Nährmedien in etwa gleich.



**Abbildung 4.5: Laktatbildung aller getesteten Tumorzelllinien nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation in verschiedenen Nährmedien.** Besonders starke Laktatbildner sind die Zellen der Zelllinien 23132/87, MDAMB-231, BT-20, BXP-3 und HRT-18. Zeichenerklärung: „+ +“ = Glc<sup>+</sup> Gln<sup>+</sup> = Kulturmedium, „+ -“ = Glc<sup>+</sup> Gln<sup>-</sup> = Glutamin-freies Medium, „- +“ = Glc<sup>-</sup> Gln<sup>+</sup> = Glukose-freies Medium, „- -“ = Glc<sup>-</sup> Gln<sup>-</sup> = Glukose- und Glutamin-freies Medium. Darstellung der Mittelwerte aus 6 unabhängigen Messungen pro Messzeitpunkt.

**Tabelle 4.7: Nachweis der Glutamin-abhängigen Laktatbildung.** Hierzu wurde die Differenz der gemittelten Laktatmengen nach 48- und 72-stündiger Inkubation in Glutamin-freiem Medium ( $\text{Glc}^+ \text{Gln}^-$ ) und Glutamin-haltigem Kulturmedium ( $\text{Glc}^+ \text{Gln}^+$ ) berechnet. Eine Differenz  $\geq 50\%$  wird als relevant angesehen, d.h. der entsprechenden Zelllinie wird eine Glutamin-abhängige Laktatbildung zugesprochen. Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte finden sich im Appendix.

| Zelllinie | Messzeitpunkt (Stunden) | L-Laktat (mmol/L)           |                             | Differenz |
|-----------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|
|           |                         | $\text{Glc}^+ \text{Gln}^+$ | $\text{Glc}^+ \text{Gln}^-$ |           |
| HT-29     | 48                      | 1,55                        | → 0,78                      | - 50 %    |
|           | 72                      | 2,32                        | → 1,15                      | - 51 %    |
| 23132/87  | 48                      | 2,92                        | → 0,93                      | - 68 %    |
|           | 72                      | 4,21                        | → 1,51                      | - 64 %    |
| MDAMB-231 | 48                      | 4,00                        | → 2,23                      | - 44 %    |
|           | 72                      | 6,01                        | → 3,38                      | - 44 %    |
| MDAMB-468 | 48                      | 1,76                        | → 0,99                      | - 44 %    |
|           | 72                      | 2,54                        | → 1,63                      | - 36 %    |
| MCF-7     | 48                      | 1,24                        | → 0,95                      | - 23 %    |
|           | 72                      | 2,27                        | → 1,70                      | -25 %     |
| BT-20     | 48                      | 6,22                        | → 4,71                      | - 24 %    |
|           | 72                      | 7,32                        | → 6,53                      | - 11 %    |
| SKOV-3    | 48                      | 2,30                        | → 1,87                      | - 19 %    |
|           | 72                      | 2,92                        | → 2,40                      | -18 %     |
| BXPC-3    | 48                      | 5,70                        | → 1,82                      | - 68 %    |
|           | 72                      | 7,31                        | → 1,74                      | -68 %     |
| HRT-18    | 48                      | 2,62                        | → 1,05                      | - 60 %    |
|           | 72                      | 5,28                        | → 2,34                      | -67 %     |

Im Glukose- und Glutamin-haltigen Kulturmedium ( $\text{Glc}^+ \text{Gln}^+$ ) wurde bei allen Tumorzelllinien netto die stärkste Laktatbildung gemessen. Besonders starke Laktatbildner waren die Zelllinien 23132/87, MDAMB-231, BT-20, BXPC-3 und HRT-18 mit  $> 2,5 \text{ mmol/L} / 2 \times 10^4$  Zellen nach 48-stündiger Inkubation bzw.  $> 4,0 \text{ mmol/L} / 2 \times 10^4$  Zellen nach 72-stündiger Inkubation, wobei dieses Ergebnis für die Zelllinie BT-20 nicht reproduzierbar war (Tab. 10.6). In Glukose-freiem Medium ( $\text{Glc}^- \text{Gln}^+$ ) wurde keine Laktatbildung gemessen.

Wie Tab. 4.7 zeigt, wurde die Laktatbildung bei den Tumorzelllinien HT-29, 23132/87, BXPC-3 und HRT-18 durch die Anwesenheit von Glutamin im Nährmedium beeinflusst. Bei diesen Zelllinien fiel die Menge an gebildetem Laktat nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation in Glutamin-freiem Medium ( $\text{Glc}^+ \text{Gln}^-$ ) im Vergleich zur 48- bzw. 72-stündigen Inkubation in Kulturmedium ( $\text{Glc}^+ \text{Gln}^+$ ) sehr stark ab (Abfall von  $\geq 50\%$ ). Bei den Tumorzelllinien MCF-7, BT-20 und SKOV-3 war die Laktatbildung eindeutig Glutamin-unabhängig (Abfall zwischen 11 % und 25 %). Die beiden Mammakarzinomzelllinien MDAMB-231 und MDAMB-468 nahmen hinsichtlich ihrer Laktatbildung eine Zwischenstellung ein. Die Bildung von Laktat scheint bei ihnen ebenfalls Glutamin-abhängig zu sein, wobei der Abfall ihrer Laktatbildung in Glutamin-freiem Medium ( $\text{Glc}^+ \text{Gln}^-$ ) weniger stark war (maximal 44 %). Aufgrund dieses geringen Abfalls wird ihnen in den Übersichtstabellen dennoch keine Glutamin-abhängige Laktatbildung zugesprochen (z.B. Tab. 4.8).

Es war auffallend, dass die fünf Zelllinien, die als starke Laktatbildner identifiziert wurden, in drei von fünf Fällen (Ausnahme: MDAMB-231 und BT-20) auch eine Glutamin-abhängige Laktatbildung aus Glukose zeigten.

Darüberhinaus exprimierten drei dieser fünf Zelllinien den Phänotyp 2 bzw. 3 (Ausnahme: 23132/87 und BT-20), wohingegen fast alle Zellen (Ausnahme: MDAMB-231) mit Glutamin-unabhängiger Laktatbildung aus Glukose den Phänotyp 1 aufwiesen (Tab. 4.8).

## 4.5 Übersicht der Ergebnisse

Tab. 4.8 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit gemessenen Charakteristika der in Tab. 3.2 aufgelisteten Zelllinien.

**Tabelle 4.8: Ergebnisse der CD44 / CD24-Phänotypisierung sowie der Untersuchung des Energiestoffwechsels aller getesteten Zelllinien.** Zeichenerklärung: Phänotyp 1 = CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>, Phänotyp 2 = CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, Phänotyp 3 = CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup>; Score zur immunhistochemischen Auswertung der GLUT-1 und GLUT-3 Expression: (1) = schwache Färbung, (2) = mittelstarke Färbung, (3) = starke Färbung. Als starke Laktatbildner werden solche Zelllinien bezeichnet, die mehr als 2,5 mmol/L nach 48-stündiger Inkubation bzw. mehr als 4,0 mmol/L nach 72-stündiger Inkubation im Glukose- und Glutamin-haltigen Kulturmedium (Glc<sup>+</sup>/Gln<sup>+</sup>) bilden. Zur Definition einer Glutamin-abhängigen Laktatbildung siehe Tab. 4.7.

| Zelllinie | Phänotyp | 2-NBDG-Nettoaufnahme |        |        | Expression von |        |      | Starke Laktatbildner (Tab. 4.6) | Glutamin-abh. Laktatbildung |
|-----------|----------|----------------------|--------|--------|----------------|--------|------|---------------------------------|-----------------------------|
|           |          | 30 Min               | 60 Min | Faktor | GLUT-1         | GLUT-3 |      |                                 |                             |
| HT-29     | 1        | 46,3%                | 94,8%  | 2,0    | 2              | 1      | Nein | Ja                              |                             |
| 23132/87  | 1        | 65,4%                | 86,5%  | 1,3    | 3              | 3      | Ja   | Ja                              |                             |
| MDMAB-231 | 2        | 59,9%                | 47,5%  | 0,8    | 2              | 3      | Ja   | Nein                            |                             |
| MDAMB-468 | 1        | 65,0%                | 56,4%  | 0,9    | 3              | 1 - 2  | Nein | Nein                            |                             |
| MCF-7     | 1        | 15,0%                | 28,8%  | 1,9    | 3              | 3      | Nein | Nein                            |                             |
| BT-20     | 1        | 69,6%                | 71,9%  | 1,0    | 2              | 2 - 3  | Ja   | Nein                            |                             |
| SKOV-3    | 1        | 63,7%                | 64,6%  | 1,0    | 3              | 2      | Nein | Nein                            |                             |
| BXPC-3    | 2        | 77,5%                | 36,0%  | 0,5    | 3              | 3      | Ja   | Ja                              |                             |
| HRT-18    | 3        | 69,9%                | 72,6%  | 1,0    | 2              | 2      | Ja   | Ja                              |                             |
| HUVEC     |          | 26,7%                | -14,9% | -0,6   | 1              | 3      |      |                                 |                             |
| NHDF      |          | 30,0%                | 56,4%  | 1,9    | 1              | 3      |      |                                 |                             |
| J774.2    |          | 85,6%                | 51,8%  | 0,6    | 1              | 1      |      |                                 |                             |

## 5 Beantwortung der Fragen

---

In der vorliegenden Arbeit wurden neun Tumorzelllinien in Hinblick auf ihr Oberflächenprofil und den Warburg-Effekt untersucht.

**1) Wie unterscheiden sich die getesteten Tumorzelllinien hinsichtlich der Verteilung von CD44 und CD24 auf ihrer Oberfläche?**

Innerhalb der neun untersuchten Tumorzelllinien wurden drei unterschiedliche Verteilungsmuster von CD44 und CD24 gefunden, die als Phänotypen bezeichnet werden (Tab. 4.1). Zum Phänotyp 1 ( $CD44^+ / CD24^+$ ) gehören die Zellen der Tumorzelllinien HT-29, 23132/87, MDAMB-468, MCF-7, BT-20 und SKOV-3. Die Zellen der Tumorzelllinien MDAMB-231 und BXP-3 weisen den Phänotyp 2 ( $CD44^+ / CD24^-$ ) auf. Zum Phänotyp 3 ( $CD44^- / CD24^+$ ) gehören die Zellen der Tumorzelllinie HRT-18.

**2) Welche Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten gibt es im Glukosestoffwechsel der untersuchten Tumorzelllinien? Welche Besonderheiten fallen bei der Messung der Glukoseaufnahme sowie der Laktatbildung auf?**

Bei allen neun Tumorzelllinien wurde eine temperaturabhängige Aufnahme des Glukoseanalogons 2-NBDG gemessen. Durch die Bestimmung der 2-NBDG-Nettoaufnahme wurden insgesamt 6 der 9 Tumorzelllinien mit einem hohen Glukosebedarf identifiziert. Ausschlaggebend für diese Einteilung ist der Faktor der 2-NBDG-Nettoaufnahme, der mindestens 1,0 zu betragen hat (Tab. 4.3). Lediglich die Zelllinien MDAMB-231, MDAMB-468 und BXP-3 wiesen eine geringere 2-NBDG-Nettoaufnahme auf.

Die Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 wurden auf der Oberfläche aller Tumorzelllinien nachgewiesen (Tab. 4.5), ohne dass die Stärke der Expression mit der 2-NBDG-Nettoaufnahme korrelierte.

Die Laktatbildung der getesteten Tumorzellen war abhängig vom Nährmedium, in dem sie kultiviert wurden. Unerwartet war, dass sich die Menge an gebildetem Laktat besonders stark verringerte, wenn die Zellen in Glukose-haltigem, aber Glutamin-freiem Medium ( $\text{Glc}^+ \text{Gln}^-$ ) kultiviert wurden. Dieses Phänomen wurde für die Tumorzelllinien HT-29, 23132/87, BXPC-3 und HRT-18 beobachtet (Tab. 4.7). Das Ergebnis wird dahingehend interpretiert, dass bei diesen Tumorzelllinien Glutamin in irgendeiner Form an der Laktatbildung beteiligt ist. Ob in diesen Zellen eine Glutamin-abhängige Laktatbildung in Form der Glutaminolyse abläuft, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur vermutet werden.

Nach Inkubation in Glukose-freiem Medium, aber Glutamin-haltigem Medium ( $\text{Glc}^- \text{Gln}^+$ ) bildete keine der getesteten Tumorzelllinien Laktat (Abb. 4.5). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die vollständige Abwesenheit von Glukose entweder keine physiologisch-relevanten Daten liefert, da Glukose *in vivo* niemals vollständig abwesend ist, oder dass in den untersuchten Tumorzellen keine Glutaminolyse abläuft. Dies spräche für einen anderweitig ausgeübten Effekt von Glutamin auf die Bildung von Laktat in Tumorzellen. Inwieweit physiologische Glukosekonzentrationen für die Glutaminolyse notwendig sind, kann derzeit nicht abschließend beurteilt werden.

Die Zelllinien 23132/87, MDAMB-231, BT-20, BXPC-3 und HRT-18 wurden als besonders starke Laktatbildner identifiziert (Abb. 4.5, Tab. 4.6).

### **3) Sind Tumorzelllinien nachzuweisen, deren Oberflächenprofil mit einem bestimmten Stoffwechsel korreliert?**

Zwei Drittel der Tumorzelllinien mit dem Oberflächenprofil  $\text{CD44}^+ / \text{CD24}^+$  (Phänotyp 1) wiesen eine Glutamin-unabhängige Laktatbildung auf (Tab. 4.8). Zudem produzierten diese Zelllinien in der Regel weniger Laktat als die Zellen der

beiden anderen Phänotypen. Die als starke Laktatbildner identifizierten Zelllinien (s. oben) zählen eher zum Phänotyp 2 (CD44<sup>+</sup> / CD24<sup>-</sup>) bzw. 3 (CD44<sup>-</sup> / CD24<sup>+</sup>).

## 6 Diskussion

---

Das Ziel dieser Arbeit war, neun Tumorzelllinien hinsichtlich ihrer Glukoseaufnahme und Laktatbildung zu untersuchen. Zudem wurde nach einem Zusammenhang zwischen der Expression der beiden Oberflächenmoleküle CD44 und CD24 auf diesen Zelllinien und deren Energiestoffwechsel gesucht.

### 6.1 Der Warburg-Effekt bei Tumorzelllinien

Im Gegensatz zu gesunden Körperzellen metabolisieren Tumorzellen auch in Gegenwart von Sauerstoff Glukose zu Laktat. Diese bioenergetische Besonderheit, die biochemisch eine Milchsäuregärung darstellt und die als „aerobe Glykolyse“ oder „Warburg-Effekt“ bezeichnet wird, liefert den Tumorzellen pro Molekül Glukose lediglich zwei Moleküle ATP (s. auch Kap. 6.3). Im Vergleich zur Atmung ist die Milchsäuregärung energetisch zwar ungünstig, doch sichern Tumoren ihren Energiebedarf durch eine gesteigerte Glukoseaufnahme (Gatenby RA und Gillies RJ, 2004). Diese Fähigkeit macht man sich in der klinischen Praxis zunutze, um mit der Positronen-Emissionstomographie (PET) onkologische Erkrankungen zu erkennen. Hierzu erhalten die Patienten radioaktive <sup>18</sup>F-2-Deoxy-D-Glukose (<sup>18</sup>F-2-DG), die von Tumoren wie „normale“ Glukose aufgenommen wird, sich aber in den Zellen anreichert, da sie nicht verstoffwechselt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, inwieweit bei den in Tab. 3.2 aufgelisteten Tumorzelllinien eine Korrelation zwischen Glukoseaufnahme und Laktatbildung besteht. Hierzu wurden die Zellen mit dem Glukoseanalogon 2-NBDG<sup>5</sup> inkubiert.

#### A) Untersuchungen zur Glukoseaufnahme

Das Glukoseanalogon 2-NBDG wurde 1996 von der Gruppe um Yoshioka et al. entwickelt, um die Vitalität von Zellen zu messen. So akkumuliert 2-NBDG in lebenden Zellen, nicht aber in toten Zellen (Yoshioka K et al., 1996a). Mehrere Studien haben gezeigt, dass 2-NBDG wie Glukose über spezifische Glukosetransporter (GLUT) von den Zellen aufgenommen wird (Gaudreault N et

---

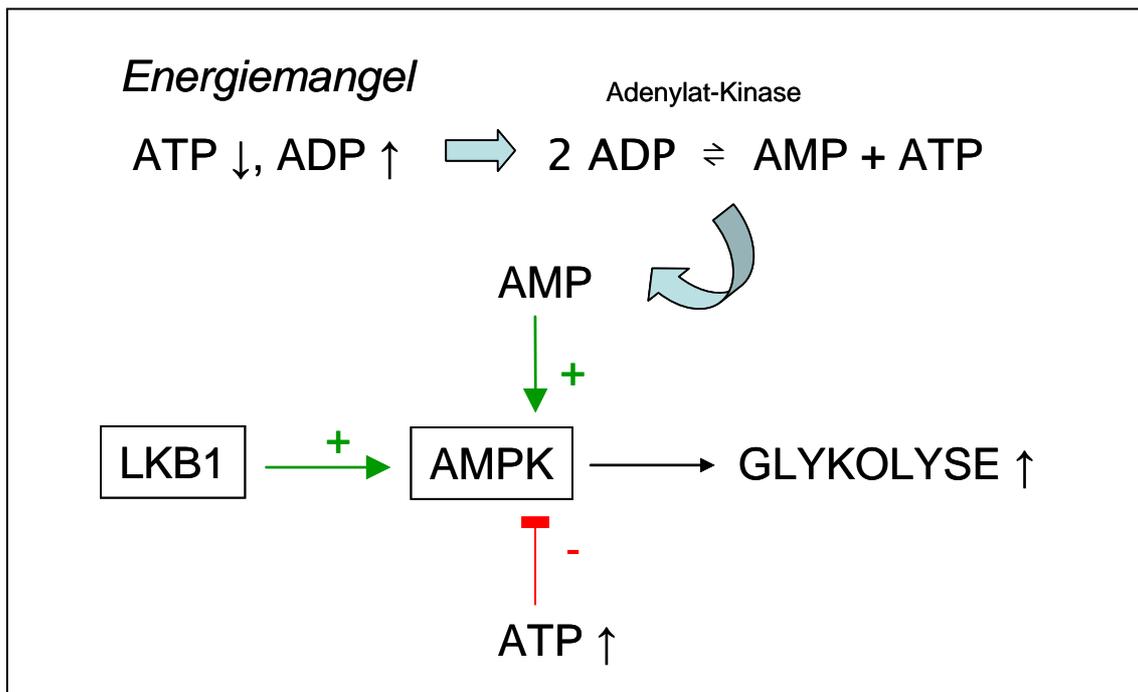
<sup>5</sup> 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglukose

al., 2008; Lloyd PG et al., 1999). Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch unklar, ob sich bei der Aufnahme von 2-NBDG ein Sättigungszustand einstellt. Dies ist abhängig davon, ob 2-NBDG von der Zelle verstoffwechselt wird oder nicht. Sollte eine Sättigung eintreten, dann kann mit 2-NBDG nur die Aufnahme durch die Zelle gemessen werden, nicht aber der Umsatz. Einige Arbeiten deuten tatsächlich darauf hin, dass 2-NBDG nach Phosphorylierung am C6-Atom (2-NBDG-6-P) in der Zelle akkumuliert und nicht weiter metabolisiert wird (Lloyd PG et al., 1999; Yoshioka K et al. 1996b). In neueren Arbeiten hingegen wurde ein kontinuierlicher Influx von 2-NBDG gemessen, der durch einen (partiellen) Abbau bzw. Einbau von 2-NBDG in Glykogen aufrechterhalten wird (Louzao MC et al., 2008; Zou C et al., 2005).

Sämtliche in dieser Arbeit getesteten Tumorzelllinien nahmen 2-NBDG auf; hierzu wurden die Zellen für 30 und 60 Minuten mit 2-NBDG inkubiert. Während sechs der neun Zelllinien bereits nach 30 Minuten ihr Maximum der 2-NBDG-Aufnahme erreichten, steigerten die Zellen der Linien HT-29, 23132/87 und MCF-7 die 2-NBDG-Aufnahme um den Faktor 1,3 bis 2 nach weiteren 30 Minuten Inkubation (Tab. 4.3). Ob diesem Verhalten ein biologisches Phänomen zugrunde liegt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht entschieden werden. Es scheint aber ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der Glukoseaufnahme und der Malignität von Tumoren einerseits (Gatenby RA und Gillies RJ, 2004; O'Neil RG et al., 2005) und der Lebenserwartung von Krebspatienten andererseits (Kunkel M et al., 2003; Mochiki E et al., 2004) zu bestehen. R. Gatenby und R. Gillies zeigten für die nicht-invasive Mammakarzinomzelllinie MCF-7 einen geringeren Glukoseverbrauch unter aeroben Bedingungen als für die aggressivere Mammakarzinomzelllinie MDAMB-231. Die Autoren führen dies darauf zurück, dass die Zellen von MCF-7 Glukose in den Mitochondrien vollständig zu Kohlendioxid und Wasser oxidieren, wohingegen die Zellen der Zelllinie MDAMB-231 Glukose zu Laktat reduzieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Vermutung (Tab. 4.3, Tab. 4.6). So nehmen die Zellen der Zelllinie MCF-7 viermal weniger Glukose auf als die Zellen der Zelllinie MDAMB-231. Zudem bilden die Zellen der Zelllinie MDAMB-231 mehr als doppelt soviel Laktat wie die Zellen der Zelllinie MCF-7.

Auch benigne Zellen nutzen Glukose als bevorzugtes Substrat zur Energiegewinnung. Unter aeroben Bedingungen wird Glukose vollständig zu Kohlendioxid und Wasser metabolisiert bzw. „veratmet“, wobei insgesamt 38 Moleküle ATP pro Molekül Glukose gebildet werden (Kap. 6.3). Der Glukoseverbrauch richtet sich dabei nach der Verfügbarkeit von Glukose bzw. dem Energiebedarf der Zellen. Proliferierende Zellen weisen einen erhöhten Glukoseverbrauch auf, wobei auch sie Glukose in Gegenwart von Sauerstoff in Laktat „vergären“ (Wang T et al., 1976). Dieser Weg der Glukoseverwertung hat für sie den Vorteil, dass – im Gegensatz zur Atmung – keine reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen, Hydroxylradikale oder Wasserstoffperoxid gebildet werden. Die sich teilenden Zellen schützen so ihre Erbinformation während der Zellteilung vor der schädigenden Wirkung dieser Sauerstoffderivate.

Der „richtige“ Glukosekatabolismus, also Atmung oder Gärung, zur richtigen Zeit ist somit auch für die benigne Zelle überaus lebenswichtig. Die vielfältigen Regulationsmechanismen hierzu wurden in den letzten Jahren teilweise aufgeklärt (Gogvadze V et al., 2008). Um die enge Interaktion zwischen bestimmten Genen, welche das Zellwachstum regulieren, und den Produkten des Energiestoffwechsels zu verdeutlichen, soll hier ein Mechanismus näher betrachtet werden. Verbraucht die Zelle mehr ATP als sie produziert, dann reichert sich Adenosinmonophosphat (AMP) an (Abb. 6.1). AMP beeinflusst die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (*AMPK = AMP-activated protein kinase*) in Kombination mit dem Tumorsuppressorgen LKB1, das für eine Serin-Threonin-Kinase kodiert. AMPK ihrerseits aktiviert die Phosphofruktokinase, ein wichtiges Enzym der Glykolyse, die den irreversiblen Schritt zur Bildung von Fructose-1,6-bisphosphat katalysiert und somit die Energieversorgung der Zelle durch den vermehrten Abbau von Glukose verbessert. AMPK fungiert in der proliferierenden Zelle somit als Energiesensor, der sie vor Energiemangel während der Proliferation schützt (Abb. 6.1) (Vander Heiden MG, 2009).



**Abbildung 6.1: Kontrolle der Zellproliferation durch das Tumorsuppressorgen LKB1 sowie die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK, AMP-activated protein kinase).** Proliferierende Zellen besitzen einen gesteigerten Energiebedarf. Fällt der ATP-Gehalt innerhalb der Zelle ab, wird durch Adenylat-Kinasen das vermehrt gebildete ADP in ATP und AMP umgewandelt. So wird dem fallenden ATP-Gehalt entgegengewirkt. Gleichzeitig wird durch AMP die AMPK aktiviert. Dies führt zu einer Steigerung der Glykolyse (s. Text) und damit zu einer verbesserten Energieversorgung der Zelle. Die Aktivierung von AMPK ist vom Tumorsuppressorgen LKB1 abhängig, das konstitutiv für eine Serin-Threonin-Proteinkinase kodiert. In proliferierenden Zellen fungiert der LKB1-AMPK-Signalweg somit als Energiesensor, der die Zellen vor einem Energiemangel während der Proliferation schützt. Für Tumorzellen wird diskutiert, dass dieser Signalweg für den Warburg-Effekt mitverantwortlich ist (Vander Heiden MG, 2009).

## B) Untersuchungen zur Bildung von Laktat

Wie bereits erläutert, bilden zahlreiche Tumoren in Anwesenheit von Sauerstoff aus Glukose Laktat (Shaw RJ, 2006). Durch die Abgabe in den Extrazellulärraum säuert Laktat die unmittelbare Umgebung der Tumoren an. Dies unterstützt den Abbau der extrazellulären Matrix und die Tumorzellen erhalten die Möglichkeit, in das umliegende Gewebe zu infiltrieren und zu metastasieren (Swietach P et al., 2007). Zusätzlich inhibiert Laktat die Funktion zytotoxischer T-Lymphozyten, was als eine Strategie der Tumorzellen gesehen wird, sich der körpereigenen Immunabwehr zu entziehen (Fischer K et al., 2007). Diese Beispiele verdeutlichen die besondere Bedeutung von Laktat für Tumoren. S. Walenta beobachtete für Kopf- und Nackentumoren eine Korrelation zwischen

Laktatbildung und Tumoraggressivität sowie Patientenüberleben (Walenta S et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit fiel die besonders starke Laktatbildung einiger Zelllinien auf, die darauf hindeutet, dass diese Zellen besonders „aggressiv“ sind. Unveröffentlichte Daten aus *in vivo* Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe unterstützen diese Annahme. In so genannten Xenograft-Experimenten wurde das Wachstum einiger der in dieser Arbeit verwendeten Tumorzellen nach subkutaner Injektion in immuninkompetenten Nacktmäusen gemessen. Danach wuchsen Tumorzellen mit starker Laktatbildung schneller als Tumorzellen mit geringer Laktatbildung. Diese bildeten im besten Fall auch nur kleine Tumoren (Tab. 6.1). Auch scheinen die Zelllinien mit dem Phänotyp 1 (CD44<sup>+</sup> / CD24<sup>+</sup>) eher durch eine geringere Malignität charakterisiert zu sein (Tab. 6.1). So bildeten Zellen der Linien MDAMB-468, MCF-7 und BT-20 keine Tumoren *in vivo*. Eine deutliche Ausnahme hiervon macht die Zelllinie 23132/87, die trotz eines Phänotyps 1 die größte Wachstumsrate *in vivo* aufwies (Tab. 6.1).

**Tabelle 6.1: Das Wachstum einiger Tumorzelllinien nach subkutaner Injektion in immuninkompetente Nacktmäusen.** Angegeben sind das Tumolvolumen und der entsprechende Versuchstag, an dem das Tumolvolumen bestimmt wurde. Die Daten deuten darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen dem Tumolvolumen und der Laktatbildung besteht. Als starke Laktatbildner werden in dieser Arbeit solche Zelllinien bezeichnet, die mehr als 2,5 bzw. 4 mmol/L Laktat nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation in Kulturmedium bilden (Tab. 4.8). Zur Messung der Laktatbildung wurden jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen eingesetzt (Kap. 3.4).

| Zelllinie | Tumolvolumen (mm <sup>3</sup> ) | Versuchstage | Wachstumsrate (mm <sup>3</sup> /Tag) | Starke Laktatbildner | Phänotyp |
|-----------|---------------------------------|--------------|--------------------------------------|----------------------|----------|
| 23132/87  | 760                             | 19           | 40,0                                 | Ja                   | 1        |
| MDAMB-231 | 352                             | 77           | 4,6                                  | Ja                   | 2        |
| MDAMB-468 | ---                             | 116          | ---                                  | Nein                 | 1        |
| MCF-7     | ---                             | 55           | ---                                  | Nein                 | 1        |
| BT-20     | --- *)                          | 19           | ---                                  | Ja **)               | 1        |
| SKOV-3    | 30                              | 79           | 0,4                                  | Nein                 | 1        |
| BXPC-3    | 467                             | 34           | 13,7                                 | Ja                   | 2        |
| HRT-18    | 317                             | 21           | 15,0                                 | Ja                   | 3        |

\*) nach subkutaner Injektion mit Matrigel (Firma BD Biosciences) betrug das Tumolvolumen nach 19 Versuchstagen 79 mm<sup>3</sup>; \*\*) in einer zweiten Messreihe (Vgl. Tab. 10.6) war die Laktatbildung dieser Zelllinie geringer und entsprach dem einer gering laktatbildenden Zelllinie.

## 6.2 Glutamin-abhängige Laktatbildung aus Glukose

Laktat wird sowohl beim Abbau von Glukose als auch von Glutamin gebildet (Kap. 1.3). In dieser Arbeit wurden Tumorzelllinien bezüglich ihrer Fähigkeit zur Laktatbildung untersucht. Hierzu wurden die Zellen in Nährmedien kultiviert, deren Glukose- bzw. Glutamingehalt variierte. Dabei wurde nur im Glukosehaltigen Nährmedium eine Laktatbildung gemessen, nicht aber im Glukosefreien Nährmedium (Tab. 4.6). Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass besonders schnell proliferierende Zelllinien wie HT-29, 23132/87, BXPC-3 und HRT-18 (Abb. 10.3) mit einem besonders starken Abfall der Laktatbildung auf den Entzug von Glutamin reagieren (Tab. 6.2). Dieses Ergebnis deutet auf eine Glutamin-abhängige Laktatbildung hin (Tab. 4.7). Dabei scheint die nicht-essentielle Aminosäure Glutamin bzw. ihre Abbauprodukte in diesen Tumorzelllinien eher die Laktatbildung aus Glukose zu beeinflussen, als dass in diesen Zellen Glutamin vermehrt über die Glutaminolyse abgebaut wird.

Der Abbau von Glutamin zu Laktat führt zu einem intrazellulären Anstieg von Stickstoff. Überschüssiger Stickstoff wird von den Tumorzellen in Form von Ammonium-Ionen ( $\text{NH}_4^+$ ) an die Umgebung abgegeben (Vgl. Abb. 1.1) (DeBerardinis RJ et al., 2008). Bereits 1924 berichtete Otto Heinrich Warburg in einer seiner fundamentalen Arbeiten über den Stoffwechsel von Tumorzellen davon, dass unter aeroben Bedingungen die von Tumorzellen gebildete Menge an Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) durch die Zugabe einer Zuckerlösung geringer wurde. Richtigerweise schlussfolgerte Warburg daraus, dass zwischen der Ammoniakbildung und der Größe der Glykolyse ein Zusammenhang bestehen muss (Warburg O et al., 1924). Nach heutigem Erkenntnisstand kann das von O. Warburg gemessene Ammoniak lediglich aus dem Abbau von Glutamin entstanden sein (DeBerardinis RJ et al., 2008; Sauer LA et al., 1982; Segura JA et al., 1989), und somit war Warburgs Beobachtung ein erster Hinweis auf das Zusammenwirken von Glutamin- und Glukosestoffwechsel.

In den 1980er Jahren versuchten verschiedene Arbeitsgruppen die Rolle von Glutamin im Stoffwechsel von Tumorzellen aufzuklären. Damals wurde vor allem der wechselseitige Einfluss von Glukose und Glutamin auf die Stoffwech-

seltrate des jeweils anderen Substrates untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei die Frage, welche Bedeutung Glutamin für den Energiestoffwechsel in transformierten Zellen besitzt (Ardawi MS und Newsholme EA, 1985; Kallinowski F et al., 1987; Medina MA et al. 1988; Reitzer LJ et al., 1979; Segura JA et al., 1989; Zielke HR et al., 1984). Insbesondere proliferierende Zellen weisen einen erhöhten Glutaminverbrauch auf (Medina MA und Núñez de Castro I, 1990; Zielke HR et al., 1984). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheint Glutamin bzw. hieraus gebildete Abbauprodukte die Glykolyse zu beeinflussen, indem es bei einigen Tumorzelllinien die Laktatbildung aus Glukose steigert (Tab. 4.7). Insbesondere die schnell wachsenden Zelllinien HT-29, 23132/87, BXPc-3 und HRT-18 weisen eine Glutamin-abhängige Laktatbildung aus Glukose auf (Tab. 6.2).

Somit erscheint es sinnvoll, solchen Tumorzellen das Glutamin zu entziehen, um so das Zellwachstum zu beeinflussen. In der klinischen Praxis bewirkte ein medikamentöser Glutamin-Entzug bei Tumorpatienten allerdings kaum eine Hemmung des Tumorwachstums. Zudem entstanden durch das verwendete Medikament vermehrt toxische Nebenwirkungen wie Zytopenien bzw. dosislimitierende reversible ZNS-Schädigungen (Hidalgo M et al. 1998). Im Gegensatz dazu beeinflusst eine Glutamin-haltige Diät das Wohlbefinden von Krebspatienten positiv und führt – wenn überhaupt – nur zu einem geringen Wachstum von Tumorzellen (Klimberg VS und McClellan JL, 1996). Diese Beobachtung wird u.a. auf die unterstützende Funktion des Glutamins auf die Entwicklung von Immunzellen zurückgeführt, die eine inhibierende Wirkung auf das Tumorwachstum ausüben (Newsholme EA, 1996). Darüber hinaus war die Infektionsrate bei hämatoonkologischen Patienten, die nach einer allogenen Knochenmark-Transplantation eine Glutamin-haltige parenterale Ernährung erhielten, geringer als bei Patienten, die Glutamin-frei parenteral ernährt wurden (Ziegler TR et al., 1998). Die durch eine Chemotherapie bedingten Nebenwirkungen wurden durch eine diätetische Supplementierung mit Glutamin (2 g/m<sup>2</sup>/Tag) geringer (Skubitz KM und Anderson PM, 1996; Savarese D et al., 1998).

**Tabelle 6.2: Proliferationsrate<sup>6</sup> und Glutamin-abhängige Laktatbildung aus Glukose bei Tumorzelllinien.** Die Proliferation der Tumorzellen wurde mit der Kristallviolett-Methode photometrisch bestimmt. Eine prozentuale Wachstumsrate von größer als 300 % wurde in dieser Arbeit als ein schnelles Zellwachstum definiert (Abb. 10.3). Die Daten lassen den Schluss zu, dass es einen Zusammenhang zwischen schnell wachsenden Tumorzelllinien und der Glutamin-abhängigen Laktatbildung aus Glukose gibt. Wie im Text diskutiert, sprechen bisherige Erkenntnisse eher für einen Einfluss von Glutamin auf die Glykolyse als für eine gesteigerte Glutaminolyse. Zur Bestimmung der Zelllinien mit Glutamin-abhängiger Laktatbildung siehe Tab. 4.7. Bei den beiden Zelllinien MDAMB-231 und MDAMB-468 ist dieser Effekt nicht gesichert nachgewiesen.

| Zelllinie | Proliferation | Glutamin-abh. Laktatbildung | Phänotyp (Tab. 4.1) |
|-----------|---------------|-----------------------------|---------------------|
| HT-29     | Schnell       | Ja                          | 1                   |
| 23132/87  | Schnell       | Ja                          | 1                   |
| MDAMB-231 | Langsam       | Nein                        | 2                   |
| MDAMB-468 | Schnell       | Nein                        | 1                   |
| MCF-7     | Langsam       | Nein                        | 1                   |
| BT-20     | Langsam       | Nein                        | 1                   |
| SKOV-3    | Langsam       | Nein                        | 1                   |
| BXPC-3    | Schnell       | Ja                          | 2                   |
| HRT-18    | Schnell       | Ja                          | 3                   |

### 6.3 Der Warburg-Effekt: „Aerobe Glykolyse“ oder Milchsäuregärung

Die Begriffe „aerobe Glykolyse“ sowie Milchsäuregärung sind zwar in der Einleitung bereits kurz erläutert worden, doch soll ihre exakte Bedeutung in diesem Kapitel eingehender diskutiert werden. Bereits Otto Warburg sah sich 1926 zu einer Mitteilung in der Klinischen Wochenschrift gezwungen, den Begriff der Glykolyse näher zu erläutern (Warburg O, 1926). Während er die Milchsäuregärung als Glykolyse bezeichnete, verstanden einige seiner Zeitgenossen unter der Glykolyse die „Abnahme des Gesamtkohlenhydrats in Organbreien“ im Rahmen der Zellatmung. Heute bezeichnet der Begriff Glykolyse den Abbau von Glukose zu Pyruvat.

Unter (Zell)-Atmung, Respiration, oxidativer Phosphorylierung, mitochondrialer oder oxidativer ATP-Gewinnung werden jeweils die in den Mitochondrien ablaufenden

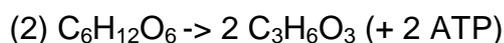
<sup>6</sup> Vgl. Abb. 10.3 im Appendix. Die zugrundeliegenden Messdaten wurden freundlicherweise von Kilian Eich und Ferdi Karaaslan zur Verfügung gestellt.

fenden Vorgänge verstanden, die zur vollständigen Oxidation von Glukose zu Kohlendioxid bzw. Wasser und somit zur maximal möglichen Energieausbeute führen. Die zugrundeliegenden Reaktionen laufen in dem in der Mitochondrien-Matrix befindlichen Citrat-Zyklus sowie in der Atmungskette – eine Ansammlung von insgesamt vier Enzymkomplexen in der inneren Mitochondrien-Membran – ab.

Der Begriff Milchsäuregärung beschreibt die Reduktion von Pyruvat zu Laktat. Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, ist dabei Substrat für zwei Enzyme bzw. Enzymsysteme, der Laktat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase. Von ihrer Aktivität hängt es ab, ob Pyruvat zu Laktat reduziert (hydriert) oder zu Acetyl-CoA decarboxyliert und dehydriert wird. In den Mitochondrien wird Acetyl-CoA im Citrat-Zyklus und anschließend in der Atmungskette vollständig zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert (oxidative Phosphorylierung). Abb. 6.2 stellt diesen Zusammenhang dar und verdeutlicht, dass am Anfang des Glukose-Katabolismus die Glykolyse mit ihrem Endprodukt Pyruvat steht. Erst danach entscheidet sich, ob man von Atmung oder Gärung spricht. Ausschlaggebend hierfür ist die An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff. Somit gilt für die Oxidation von Glukose folgende Summenformel:



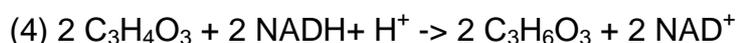
Für die Vergärung von Glukose zur Milchsäure ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ ) gilt folgende Summenformel:



Für die Glykolyse (Abbau von Glukose zu Pyruvat /  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$ ) gilt folgende Summenformel mit Reduktionsäquivalenten:

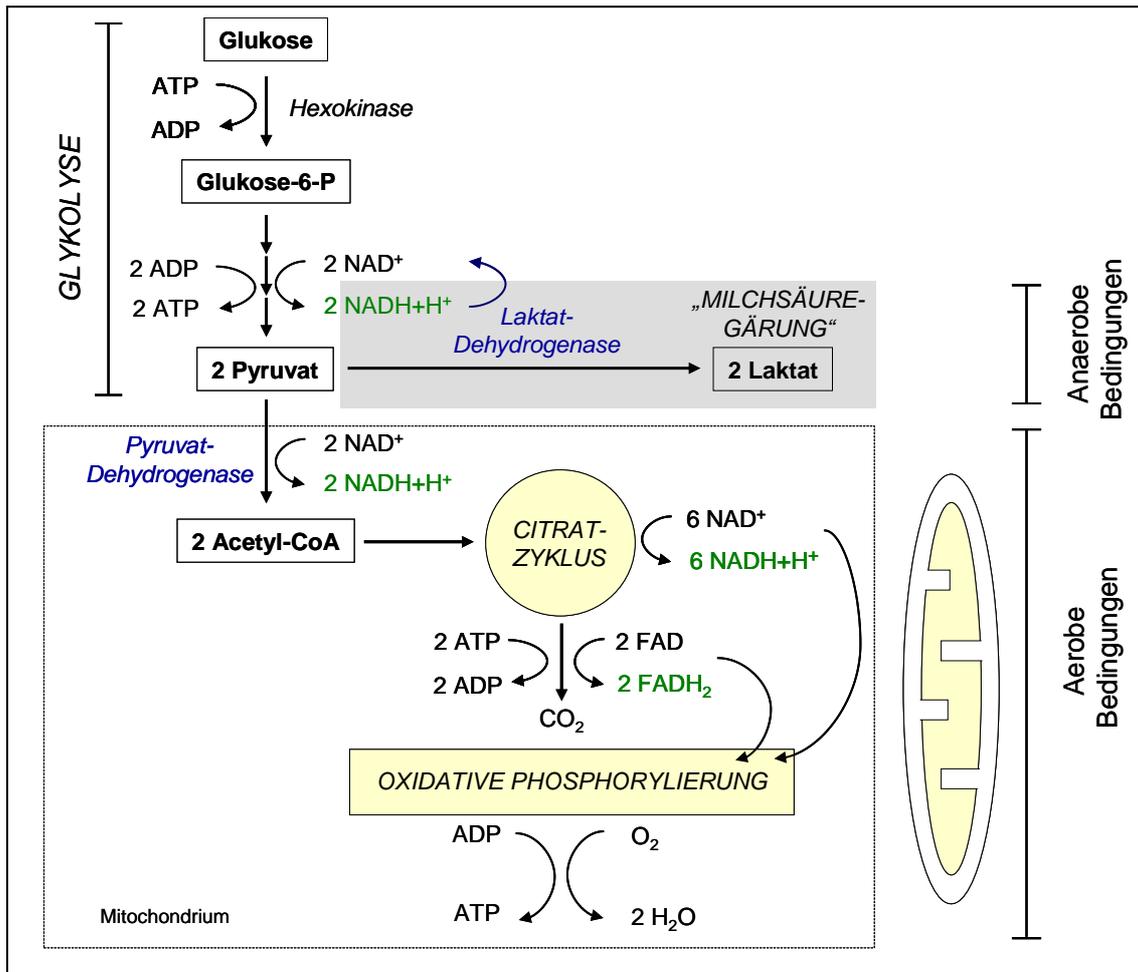


Für die Milchsäuregärung (Reduktion von Pyruvat zu Laktat) gilt folgende Summenformel mit Reduktionsäquivalenten:



Werden beiden Formeln (3, 4) entsprechend „gekürzt“, so erhält man die Summenformel der Milchsäuregärung (Formel 2). Der Vergleich mit der Glykolyse (Formel 3) zeigt, dass der ATP-Gewinn der Milchsäuregärung einzig und allein aus der Glykolyse stammt und die „eigentliche“ Milchsäuregärung (Formel 4) die Reduktion von Pyruvat ( $C_3H_4O_3$ ) zu Laktat ( $C_3H_6O_3$ ) beschreibt. Mit dieser Reaktion werden die Reduktionsäquivalente  $NADH + H^+$  regeneriert, ohne die die Glykolyse zum Stillstand käme. In der Regel oxidieren eukaryotische Zellen Glukose vollständig zu Wasser und Kohlendioxid, wobei die Energieausbeute in Form von ATP maximal ist (Kap. 1.3). Für diesen als Atmung bezeichneten Stoffwechselweg ist molekularer Sauerstoff als Elektronenakzeptor genauso wie der Citratzyklus und die Atmungskette notwendig. Es ist allgemein akzeptiert, dass sich die Vorfahren der „modernen“ Zelle in einer sauerstofffreien Atmosphäre entwickelten, weshalb sie den aus der Glukose stammenden Wasserstoff nur auf organische Moleküle übertragen konnten. Bei diesem Spalt- oder Gärungsstoffwechsel, bei dem Laktat entsteht, gewinnen die Zellen nur 5 % der in der Glukose befindlichen Energie (Kap. 1.3).

Louis Pasteur beschrieb bereits 1861, dass der Weg der Energiegewinnung in eukaryotischen Zellen durch die An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff bestimmt wird: in Gegenwart von Sauerstoff betreiben die Zellen Atmung, wohingegen bei Abwesenheit von Sauerstoff Gärung stattfindet. Parallel hierzu ändert sich der Glukoseumsatz: bei Zellatmung ist er gering bzw. bei Gärung ist er gesteigert (Pasteur L, 1861). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, erkannte Otto Heinrich Warburg 1923, dass Tumorzellen dieser Regel nicht entsprechen und auch in Gegenwart von Sauerstoff Glukose zu Laktat vergären. Während für die Bildung von Laktat in Abwesenheit von Sauerstoff die Begriffe Gärung bzw. Fermentation verbreitet sind, fehlte für die Bildung von Laktat in Gegenwart von Sauerstoff seinerzeit ein entsprechender Ausdruck. In Anlehnung an die damalige Bedeutung der Glykolyse, bezeichnete Otto Warburg seine Beobachtung als „aerobe Glykolyse“. Zu Ehren seines Entdeckers wird der Begriff „Warburg-Effekt“ heutzutage als Synonym verwendet (Vgl. Tab. 1.1).



**Abbildung 6.2: Der Glukose-Katabolismus.** Glukose wird in der Zelle durch die Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert und anschließend in mehreren Reaktionen (nicht gezeigt) in zwei Moleküle Pyruvat gespalten. Hierbei werden Netto 2 Moleküle ATP gewonnen. Unter anaeroben Bedingungen stellt dies die maximal mögliche Energieausbeute dar, da Pyruvat durch die Laktat-Dehydrogenase zu Milchsäure reduziert wird. Unter aeroben Bedingungen hingegen wird Pyruvat durch die Pyruvat-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA („aktivierte Essigsäure“) umgewandelt und in den Citrat-Zyklus eingeschleust, um dort schrittweise zu Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) und Reduktionsäquivalenten (NADH+H<sup>+</sup> bzw. FADH<sub>2</sub>) oxidiert zu werden. Diese Reduktionsäquivalente sind notwendig, um an der Atmungskette an der inneren Mitochondrienmembran einen Protonengradienten für die Synthese von ATP aufzubauen. Durch den oxidativen Abbau der Glukose werden 36 Moleküle ATP in den Mitochondrien gewonnen, sodass insgesamt – mit den 2 Molekülen ATP aus der Glykolyse – 38 Moleküle ATP durch den Abbau eines Moleküls Glukose gebildet werden. Das Schicksal von Pyruvat wird somit von der Aktivität zweier Schlüsselenzyme bestimmt: der Laktat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase. Maligne Zellen verfügen in aller Regel über eine geringe mitochondriale ATP-Produktion. Zeichenerklärung: Glukose-6-P = Glukose-6-Phosphat, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, NAD<sup>+</sup> = Nicotinamid-adenin-dinukleotid, FAD = Flavin-adenin-dinukleotid.

Beim Umgang mit dem Begriff „aerobe Glykolyse“ sollte man sich stets im Klaren sein, dass der erste Abschnitt des Glukose-Katabolismus stets anaerob abläuft und sich erst ab dem Pyruvat entscheidet, ob Laktat gebildet wird oder

Pyruvat zu Acetyl-CoA dehydriert und dieses im weiteren Verlauf zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert wird (Abb. 6.2).

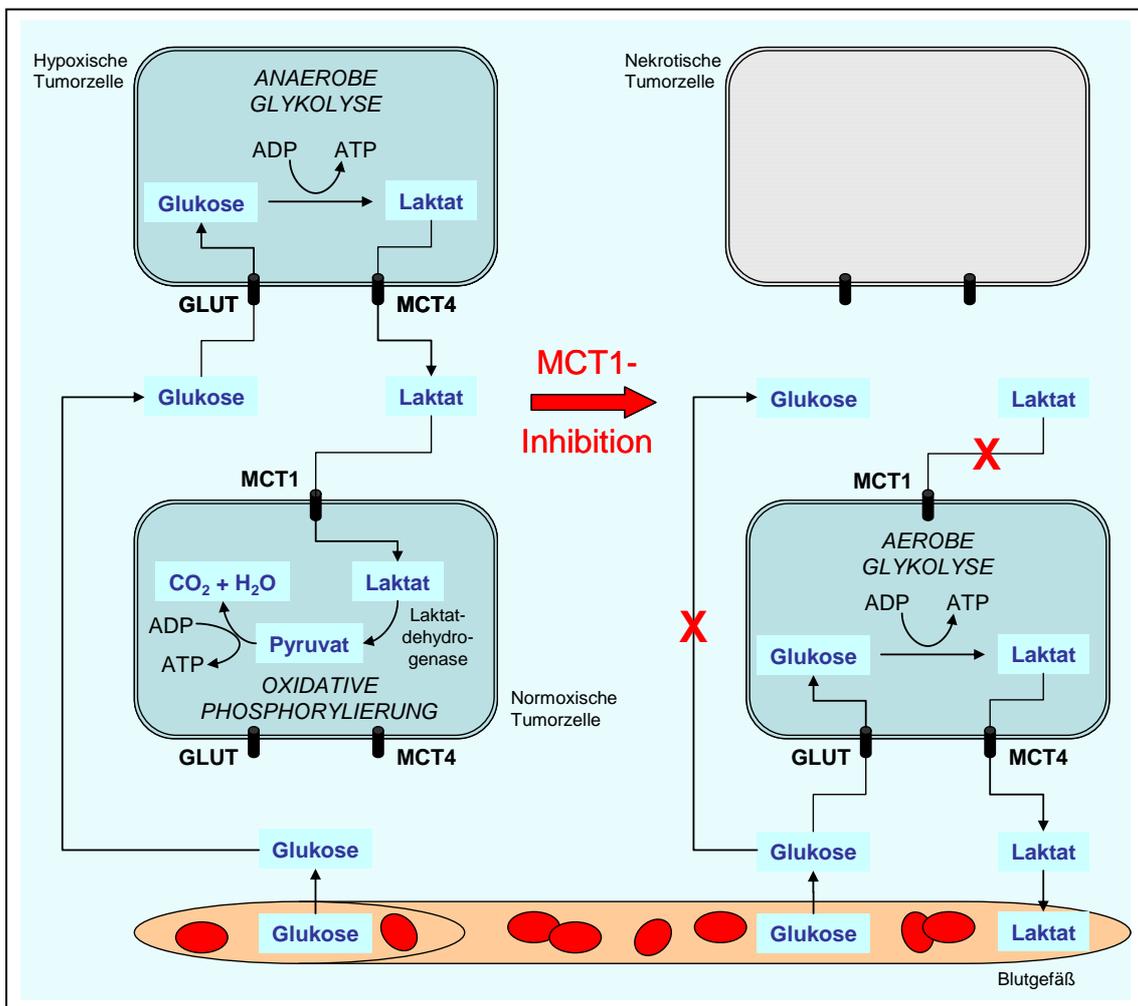
#### **6.4 Beeinflussung des Tumorwachstums durch Inhibition der glykolytischen ATP-Gewinnung**

Der amerikanische Krebsforscher Craig B. Thompson schätzt, dass zwischen 60 und 90 Prozent der Tumoren den Warburg-Effekt aufweisen (Garber K, 2006). Diese Art der Energiegewinnung bedeutet einen erhöhten Glukosebedarf und -umsatz (Gatenby RA und Gillies RJ, 2004). So ist bei Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe eine 20- bis 30-fach höhere Glukoseaufnahme vorzufinden. Diese Abhängigkeit von der glykolytischen ATP-Gewinnung bietet möglicherweise einen Angriffspunkt für therapeutische Strategien zur selektiven Hemmung des Tumorwachstums.

Die Strategie, Tumorzellen mit Inhibitoren der Glykolyse gezielt zu bekämpfen, erscheint hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von einem uneingeschränkten Glukoseangebot folgerichtig. Experimentelle Daten scheinen diese Hoffnung zu bestätigen (Mathupala SP et al., 2009). Doch zeigen umfangreiche Analysen *in vitro*, dass eine Vielzahl von Inhibitoren aufgrund ihrer geringen therapeutischen Breite auch toxisch für benigne Zellen sind (Pfetzer N, 2011). Somit bleibt abzuwarten, inwieweit Inhibitoren der Glykolyse jemals therapeutisch relevant werden.

Sonveaux beschreibt in seiner Publikation aus dem Jahr 2008 eine attraktive Strategie zur selektiven Hemmung des Tumorwachstums. Seine Gruppe zeigt an einer humanen Zervixkarzinom-Zelllinie, dass einige dieser Zellen in Gegenwart von Sauerstoff Laktat über spezielle Monocarboxylat-Transporter (MCT1) aufnehmen und dieses nach seiner Oxidation zu Pyruvat in den Mitochondrien energieliefernd metabolisieren. Diese Zellen bevorzugen dabei Laktat, auch wenn Glukose ausreichend vorhanden ist (Sonveaux P et al., 2008). Aus diesen Ergebnissen leiten die Autoren die Hypothese einer metabolischen Symbiose ab, wonach Tumorzellen unter Normoxie das von anderen

Tumorzellen unter Hypoxie gebildete Laktat für den Großteil ihrer eigenen Energieversorgung nutzen. Eine medikamentöse Blockade der MCT1-Transporter steigert den Glukoseverbrauch der Zellen unter Normoxie, da sie das benötigte Laktat nun nicht mehr aufnehmen können und ihren Stoffwechsel auf den Abbau von Glukose umstellen müssen. Dies führt zu einer Verringerung des Glukose-Angebots für die Zellen unter Hypoxie, da sie keine alternative Energiequelle besitzen und vermehrt absterben (Abb 6.3). Insgesamt verlangsamte sich das Tumorzellwachstum hierdurch und die Zellen des Resttumors zeigen eine größere Empfindlichkeit gegenüber einer Strahlentherapie (Sonveaux P et al., 2008).



**Abbildung 6.3: Metabolische Symbiose von Tumorzellen und Möglichkeiten zur medikamentösen Intervention** (modifiziert nach Sonveaux P et al., 2008). Für Erläuterungen zur Abbildung siehe Text. Zeichenerklärung: GLUT = Glukosetransporter, MCT = Monocarboxylat-Transporter, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat.

Eine Ergänzung zu einer solchen MCT1-Blockade wäre eine Ernährungsform, die den wichtigen Treibstoff Glukose für den Energiestoffwechsel von Tumoren begrenzt. Bei der ketogenen Diät werden Kohlenhydrate, insbesondere Zucker, verknappt, wodurch dem Tumor eine wichtige Energiequelle entzogen wird. Zudem werden durch die ausbleibenden postprandialen Glukosespitzen die Blutspiegel von Insulin und IGF-1 (*insulin-like growth factor*) verringert; beides wichtige Wachstumsfaktoren für zahlreiche Tumoren (Kaaks R und Lukanova A, 2001). Durch den hohen Fettgehalt dieser Diät wird während der  $\beta$ -Oxidation in den Körperzellen die Bildung von Ketonkörpern forciert. Da sowohl die  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren als auch der Abbau der Ketonkörper eine ausreichende Sauerstoffversorgung voraussetzt, kann das in der Regel hypoxische Tumorgewebe – im Gegensatz zum oxygenierten gesunden Gewebe – beide Substrate kaum verwenden (Grey NJ, 1975; Holm E et al., 1995). Zudem löst die Tumorerkrankung im peripheren Gewebe eine Insulinresistenz aus, wodurch die Körperzellen eine verminderte Fähigkeit zur Glukoseaufnahme und –verarbeitung aufweisen (Mulligan HD und Tisdale MJ, 1991). Eine ketogene Diät vermindert somit die Energieversorgung des Tumors, nicht aber die des gesunden Körpergewebes. Darüberhinaus stabilisiert sich bei onkologischen Patienten die Muskel- und Fettmasse, wodurch der Gewichtsverlust gestoppt wird (Holm E, 2007). Nach noch unveröffentlichten Daten der Frauenklinik Würzburg fördert diese Diät überdies die Lebensqualität von Krebspatienten (persönl. Mitteilung Frau Prof. U. Kämmerer). Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass sich durch den bei einer ketogenen Diät erzielten Energiemangel der Tumorzellen das Tumorwachstum verringert (Nebeling LC et al., 1995; Zhou W et al., 2007; Otto C et al., 2008).

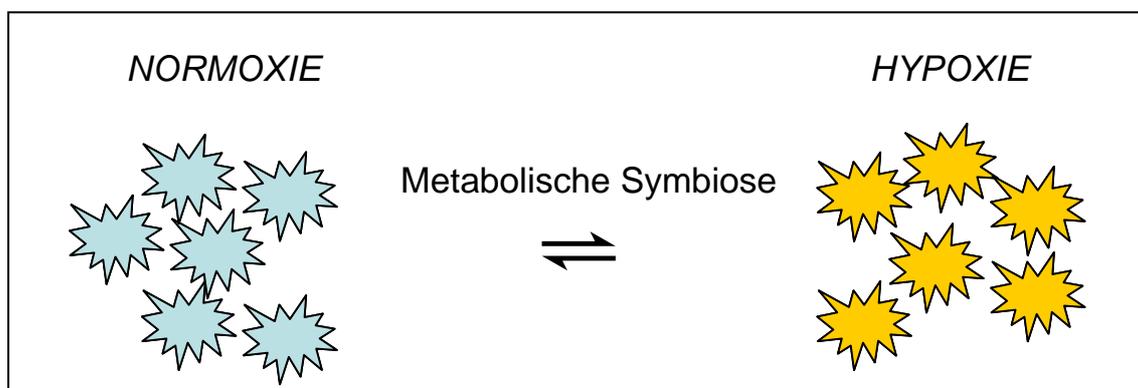
Basierend auf dem Konzept der metabolischen Symbiose von Sonveaux et al. erscheint eine Kombination der oben genannten Strategien sinnvoll. So könnte beispielsweise eine Blockade der MCT1-Transporter gemeinsam mit der diätetischen Reduktion des Glukose-Angebots zu einer noch wirkungsvolleren Hemmung des Tumorwachstums führen. Experimentelle Daten hierzu stehen zurzeit aber noch aus.

## 7 Ausblick

---

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis, dass die Bildung von Laktat aus Glukose in einigen Tumorzelllinien eindeutig von Glutamin abhängig ist. Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Tumorzelllinien sollten auch unter hypoxischen Bedingungen untersucht werden. Mit solchen Versuchen ließe sich klären, ob die Glutamin-abhängige Laktatbildung aus Glukose auch unter Hypoxie zu beobachten ist. Da Glutamin nur in Gegenwart von Sauerstoff abgebaut wird (Kallinowski F et al., 1987), wobei ebenfalls Laktat entsteht, sollte unter Hypoxie die Glutaminolyse nicht auftreten. Sollte dabei jedoch weiterhin ein Glutamin-abhängiger Effekt auf die Laktatbildung aus Glukose beobachtet werden, dann hieße dies, dass Glutamin z. B. die Aktivität von Enzymen der Glykolyse beeinflusst. Der in dieser Arbeit postulierte Effekt von Glutamin würde, sollte er sich bestätigen, eine bisher noch unbekannte Funktion von Glutamin für die Glykolyse beschreiben.

Die von Sonveaux et al. 2008 beschriebene metabolische Symbiose zwischen Tumorzellen unterschiedlicher Sauerstoffversorgung verdeutlicht, dass die Zellen der verschiedenen (Versorgungs-) Regionen eines Tumors miteinander interagieren (Abb. 7.1) und dem Laktat als Substrat eine wichtige Bedeutung zukommt. Sollte sich diese Beobachtung bestätigen, unterstreicht dies die vielfältigen biologisch relevanten Funktionen von Laktat.



**Abbildung 7.1: Metabolische Symbiose zwischen normoxischen und hypoxischen Tumorebenen.**

## 8 Zusammenfassung

---

Tumoren weisen oftmals einen veränderten Energiestoffwechsel auf, der durch den Begriff „Warburg-Effekt“ bzw. „aerobe Glykolyse“ charakterisiert ist. Hierunter wird die Stoffwechselsituation verstanden, auch in Gegenwart von Sauerstoff aus Glukose Laktat zu bilden. Benigne Zellen zeigen diesen Effekt in aller Regel nicht so stark wie Tumorzellen. In dieser Arbeit wurden neun Tumorzelllinien, die von unterschiedlichen humanen Tumoren etabliert wurden, hinsichtlich ihres Energiestoffwechsels untersucht. Da der Warburg-Effekt auf einem erhöhten Glukosemetabolismus beruht, wurde die Stärke der Glukoseaufnahme und Laktatbildung für die neun Tumorzelllinien bestimmt.

Wesentliches Ziel dieser Arbeit war, einen Zusammenhang zwischen dem Warburg-Effekt und weiteren Eigenschaften der Tumorzellen wie ihrem Oberflächenprofil bzw. ihrer Malignität nachzuweisen. Zur Phänotypisierung wurden die Oberflächenmoleküle CD44 und CD24 ausgewählt, da sie Zellinteraktionen, Zelladhäsion und Zellmigration von Tumorzellen vermitteln. Die Malignität wurde im Xenograft-Modell überprüft. Hierzu wurden Tumorzellen unter die Haut immuninkompetenter Mäuse injiziert und anschließend die Wachstumsgeschwindigkeit der entstehenden, soliden Tumoren gemessen.

Die Menge an produziertem Laktat durch Tumorzellen war eindeutig von der Anwesenheit von Glukose im Nährmedium abhängig. Insgesamt waren fünf der neun Tumorzelllinien starke Laktatbildner, was einer Laktatbildung von über 2,5 mmol/L innerhalb von 48 Stunden entspricht. Hierzu gehört u.a. die Mammakarzinomzelllinie MDAMB-231, wohingegen MCF-7, eine andere Mammakarzinomzelllinie, nur wenig Laktat bildete. Im Gegensatz zu MDAMB-231 wuchs MCF-7 zudem auch nicht im Xenograft-Modell. Dies scheint ein Hinweis darauf zu sein, dass starke Laktatbildner aggressiver, d.h. schneller wachsen, als schwache Laktatbildner. Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit eine temperaturabhängige Aufnahme des Glukoseanalogons 2-NBDG beobachtet. Auch hier fiel die Tumorzelllinie MCF-7 im Vergleich zur Tumorzelllinie MDAMB-231 durch eine geringere Aufnahme von 2-NBDG auf. Dies wird als

Hinweis darauf gedeutet, dass MCF-7 Glukose in erster Linie in den Mitochondrien veratmet, anstatt sie zu Laktat zu vergären. Die beiden Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 wurden hingegen auf den Zellen aller neun Tumorzelllinien gleichermaßen nachgewiesen. Lediglich auf den Zellen der Tumorzelllinien HT-29 und MDAMB-468 war GLUT-3 schwach exprimiert.

Sechs der neun Tumorzelllinien weisen den so genannten „Phänotyp 1“ auf. Hierunter wird in dieser Arbeit die gemeinsame Expression von CD44 und CD24 auf der Zelloberfläche verstanden. Zwei Zelllinien waren ausschließlich positiv für CD44 („Phänotyp 2“), eine Zelllinie ausschließlich positiv für CD24 („Phänotyp 3“). Keiner dieser Phänotypen wies eine charakteristische Glukoseaufnahme bzw. Laktatbildung auf, auch wenn drei der fünf Zelllinien mit besonders starker Laktatbildung zum Phänotyp 2 bzw. 3 gehörten.

Die im menschlichen Blut vorzufindende nicht-essentielle Aminosäure Glutamin ist auch in Kulturmedien unerlässlich. Deshalb wurde die Laktatbildung aus Glukose in neun Tumorzelllinien sowohl in An- als auch Abwesenheit von Glutamin gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Menge an gebildetem Laktat nach Inkubation in Glukose-haltigem, aber Glutamin-freiem Medium ( $\text{Glc}^+ \text{Gln}^-$ ) besonders stark verringerte. Dieses Phänomen wurde für die Tumorzelllinien HT-29, 23132/87, BXPC-3 und HRT-18 beobachtet und deutet darauf hin, dass Glutamin in diesen Tumorzelllinien in irgendeiner Form auf die Laktatbildung aus Glukose Einfluss nimmt. Denkbar wäre, dass Glutamin Enzyme der Glykolyse über einen allosterischen Effekt moduliert, wodurch die Laktatbildung ansteigt. Dass diese Zellen eine Glutamin-abhängige Laktatbildung in Form der Glutaminolyse aufweisen, konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Um diese Beobachtung abschließend zu klären, sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig.

## 9 Literaturverzeichnis

---

- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100 (7)**: 3983-3988.
- Ardawi MS, Newsholme EA. Fuel utilization in colonocytes of the rat. *Biochem J.* 1985; **231 (3)**: 713-719
- Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, Yagita H, Sleeman JP. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis *Cancer Res.* 2005, **65 (23)**: 10783-10793
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukaemia is organized as a hierarchy that originates from a primate haematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; **3 (7)**: 730-737.
- Bourguignon LY. CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; **6 (3)**: 287-297
- Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005; **65 (23)**: 10946-10951
- Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH, Brand-Miller J. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr.* 2005; **82 (2)**: 341-354
- DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; **18 (1)**: 54-61
- DeVita Jr. VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 2008; **68 (21)**: 8643-8653
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61 (5)**: 759-767
- Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2008; **10 (2)**: R25
- Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Krause SW, Kreutz M. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 2007; **109**: 3812-3819
- Garber K. Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science* 2006; **312 (5777)**: 1158-1159

- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; **4 (11)**: 891-899
- Gaudreault N, Scriven DR, Laher I, Moore ED. Subcellular characterization of glucose uptake in coronary endothelial cells. *Microvasc Res.* 2008; **75 (1)**: 73-82
- Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol.* 2008; **18 (4)**: 165-173
- Grey NJ, Karl I, Kipnis DM. Physiologic mechanisms in the development of starvation ketosis in man. *Diabetes* 1975; **24 (1)**: 10-16
- Hidalgo M, Rodriguez G, Kuhn JG, Brown T, Weiss G, MacGovren JP, Von Hoff DD, Rowinsky EK. A phase I and pharmacology study of the glutamine antagonist acivicin with the amino acid solution aminosyn in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res.* 1998; **4 (11)**: 2763-2770
- Holm E, Hagmüller E, Staedt U, Schlickeiser G, Günther HJ, Leweling H, Tokus M, Kollmar HB. Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Res.* 1995; **55 (6)**: 1373-1378
- Holm E. Stoffwechsel und Ernährung bei Tumorkrankheiten. Georg Thieme Verlag KG (2007, 1. Auflage) (ISBN 978-3131422019)
- Javier RT, Butel JS. The history of tumor virology. *Cancer Res.* 2008; **68 (19)**: 7693-7706
- Kaaks R, Lukanova A. Energy balance and cancer: the role of insulin and insulin-like growth factor-I. *Proc Nutr Soc.* 2001; **60 (1)**: 91-106
- Kallinowski F, Runkel S, Fortmeyer HP, Förster H, Vaupel P. L-Glutamine: a major substrate for tumor cells in vivo? *J Cancer Res Clin Oncol.* 1987; **113 (3)**: 209-215
- Klimberg VS, McClellan JL. Glutamine, cancer and its therapy. *Am J Surg.* 1996; **172 (5)**: 418-424
- Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism : cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 2008; **13 (6)**: 472-482
- Kunkel M, Reichert TE, Benz P, Lehr HA, Jeong JH, Wieand S, Bartenstein P, Wagner W, Whiteside TL. Overexpression of GLUT-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2003; **97 (4)**: 1015-1024
- Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Consumption of sugar and sugar-sweetened foods and the risk of pancreatic cancer in a prospective study. *Am J Clin Nutr.* 2006; **84 (5)**: 1171-1176
- Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol.* 1993; **54**: 271-335

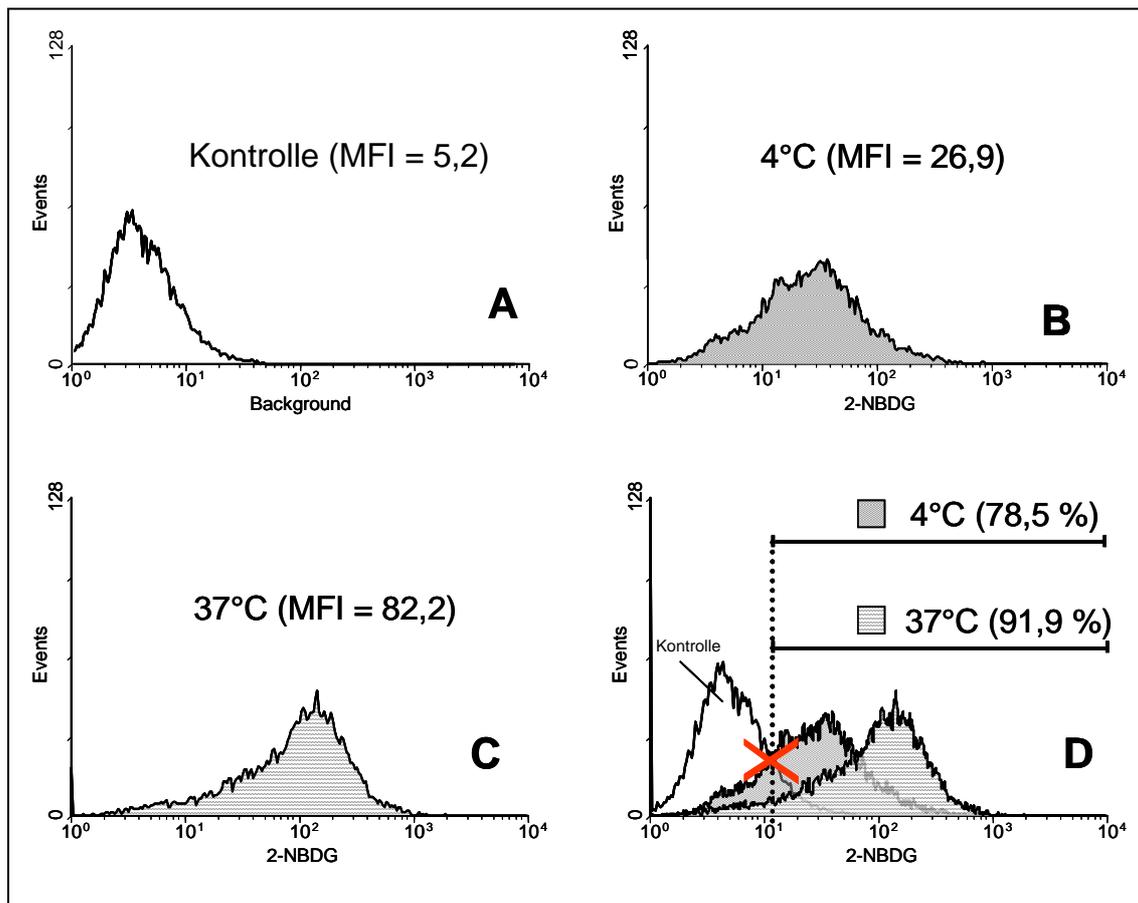
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007; **67 (3)**: 1030-1037
- Lippman SM, Hawk ET. Cancer prevention: from 1727 to milestones of the past 100 years. *Cancer Res.* 2009; **69 (13)**: 5269-5284
- Lloyd PG, Hardin CD, Sturek M. Examining glucose transport in single vascular smooth muscle cells with a fluorescent glucose analog. *Physiol Res.* 1999; **48 (6)**: 401-410
- Loeb LA, Harris CC. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Res.* 2008; **68 (17)**: 6863-6872
- Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV, Sands BJ, McDonald J, Schroeder JA. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res.* 2005; **65 (15)**: 6755-6763
- Louzao MC, Espiña B, Vieytes MR, Vega FV, Rubiolo JA, Baba O, Terashima T, Botana LM. "Fluorescent glycogen" formation with sensibility for *in vivo* and *in vitro* detection. *Glycoconj J.* 2008; **25 (6)**: 503-510
- Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol.* 2005; **202 (3)**: 654-662
- Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1alpha modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms. *Mini Rev Med Chem.* 2009; **9 (9)**: 1084-1101
- Matés JM, Segura JA, Campos-Sandoval JA, Lobo C, Alonso L, Alonso FJ, Márquez J. Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; **41 (10)**: 2051-2061
- Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol.* 2009; **19 (1)**: 17-24
- Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Márquez J, Pérez-Rodríguez J, Quesada AR, Núñez de Castro I. Glutamine and glucose as energy substrates for Ehrlich ascites tumour cells. *Biochem Int.* 1988; **16 (2)**: 339-347
- Medina MA, Núñez de Castro I. Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. *Int J Biochem.* 1990; **22 (7)**: 681-683
- Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Márquez J, Quesada AR, Núñez de Castro I. Relevance of glutamine metabolism to tumor cell growth. *Mol Cell Biochem.* 1992; **113 (1)**: 1-15

- Mochiki E, Kuwano H, Kato H, Asao T, Oriuchi N, Endo K. Evaluation of  $^{18}\text{F}$ -2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography for gastric cancer. *World J Surg.* 2004; **28 (3)**: 247-253
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 2007; **274 (6)**: 1393-1418
- Mulligan HD, Tisdale MJ. Metabolic substrate utilization by tumour and host tissues in cancer cachexia. *Biochem J.* 1991; **277 (Pt 2)**: 321-326
- Nebeling LC, Miraldi F, Shurin SB, Lerner E. Effects of a ketogenic diet on tumor metabolism and nutritional status in pediatric oncology patients: two case reports. *J Am Coll Nutr.* 1995; **14 (2)**: 202-208
- Newsholme EA. The possible role of glutamine in some cells of the immune system and the possible consequences for the whole animal. *Experientia* 1996; **52 (5)**: 455-459
- O'Neil RG, Wu L, Mullani N. Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Mol Imaging Biol.* 2005; **7 (6)**: 388-392
- Otto C, Kaemmerer U, Illert B, Muehling B, Pfetzer N, Wittig R, Voelker HU, Thiede A, Coy JF. Growth of human gastric cancer cells in nude mice is delayed by a ketogenic diet supplemented with omega-3 fatty acids and medium-chain triglycerides. *BMC Cancer* 2008; **8**: 122
- Pasteur L. Memoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère. Examen de la doctrine des générations spontanées. *Ann Sci Nat.* 1861; **16** : 5-98
- Pfetzer N. Identifizierung und Testung spezifischer Inhibitoren des Energiestoffwechsels von Tumorzellen. Promotionsschrift der Universität Würzburg, 2011.
- Pouysségur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006; **441 (7092)**: 437-443
- Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem.* 1979; **254 (8)**: 2669-2676
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; **414 (6859)**: 105-111
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; **445 (7123)**: 111-115
- Sauer LA, Stayman JW 3<sup>rd</sup>, Dauchy RT. Amino acid, glucose and lactic acid utilization *in vivo* by rat tumours. *Cancer Res.* 1982; **42 (10)**: 4090-4097
- Savarese D, Boucher J, Corey B. Glutamine treatment of paclitaxel-induced myalgias and arthralgias. *J Clin Oncol.* 1998; **16 (12)**: 3918-3919

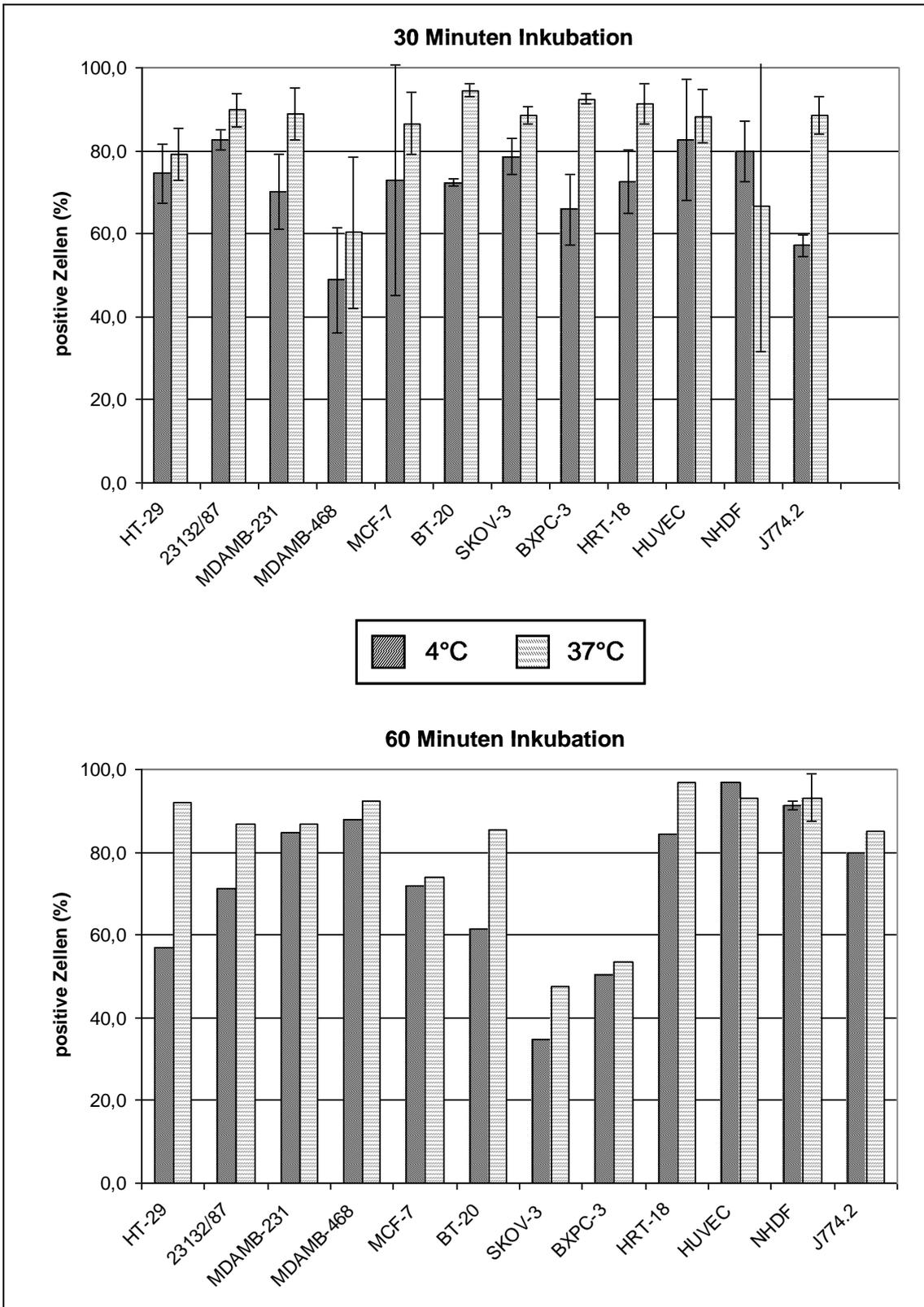
- Schabath H, Runz S, Joumaa S, Altevogt P. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J Cell Sci* 2006; **119 (Pt 2)**: 314-325
- Segura JA, Medina MA, Alonso FJ, Sanchez-Jimenez F, Núñez de Castro I. Glycolysis and glutaminolysis in perfused Ehrlich ascites tumour cells. *Cell Biochem Funct.* 1989; **7 (1)**: 7-10
- Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr. Opin Cell Biol.* 2006; **18 (6)**: 598-608
- Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet Jr R, Badve S, Nakshatri H. CD44<sup>+</sup> / CD24<sup>-</sup> breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res.* 2006; **8 (5)**: R59
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; **432 (7015)**: 396-401
- Skubitz KM, Anderson PM. Oral glutamine to prevent chemotherapy induced stomatitis: a pilot study. *J Lab Clin Med.* 1996; **127 (2)**: 223-228
- Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest.* 2008; **118 (12)**: 3930-3942
- Spillane JB, Henderson MA. Cancer stem cells: a review. *ANZ J Surg.* 2007; **77 (6)**: 464-468
- Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; **26 (2)**: 299-310
- Taipale J, Beachy PA. The hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001; **411 (6835)**: 349-354
- Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 2009; **27 (5)**: 1006-1020
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; **324 (5930)**: 1029-1033
- Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfør K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* 2000; **60 (4)**: 916-921
- Wang T, Marquardt C, Foker J. Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 1976; **261 (5562)**: 702-705

- Warburg O, Minami S. Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. *Klinische Wochenschrift* 1923; **2. Jahrgang Nr. 17**: 776-777
- Warburg O, Posener K, Negelein E. Über den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochem. Z.* 1924; **152**: 319-344
- Warburg O. Über Carcinomversuche. *Klinische Wochenschrift* 1926; **45**: 2119
- Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells : an old idea – a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006; **66 (4)**: 1883-1890
- Yoshioka K, Takahashi H, Homma T, Saito M, Oh KB, Nemoto Y, Matsuoka H. A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta.* 1996a; **1289 (1)**: 5-9
- Yoshioka K, Saito M, Oh KB, Nemoto Y, Matsuoka H, Natsume M, Abe H. Intracellular fate of 2-NBDG, a fluorescent probe for glucose uptake activity, in Escherichia coli cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1996b; **60 (11)**: 1899-1901
- Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res.* 2008; **68 (11)**: 4311-4320
- Zhou W, Mukherjee P, Kiebish MA, Markis WT, Mantis JG, Seyfried TN. The calorically restricted ketogenic diet, an effective alternative therapy for malignant brain cancer. *Nutr Metab (Lond).* 2007; **4**: 5
- Ziegler TR, Bye RL, Persinger RL, Young LS, Antin JH, Wilmore DW. Effects of glutamine supplementation on circulating lymphocytes after bone marrow transplantation: a pilot study. *Am J Med Sci.* 1998; **315 (1)**: 4-10
- Zielke HR, Zielke CL, Ozand PT. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. *Fed Proc.* 1984; **43 (1)**: 121-125
- Zou C, Wang Y, Shen Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Methods.* 2005; **64 (3)**: 207-215

## 10 Appendix



**Abbildung 10.1: Berechnung von  $\Delta$ MFI sowie der Anzahl 2-NBDG-positiver Zellen am Beispiel der Tumorzelllinie 23132/87.**  $\Delta$ MFI berechnet sich aus der Differenz zwischen der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) nach Inkubation mit 2-NBDG bei 4°C (B) bzw. 37°C (C) und der Kontrolle (Hintergrund-Fluoreszenz / Background) (A). Für die hier dargestellte Zelllinie 23132/87 berechnet sich  $\Delta$ MFI (4°C) bzw.  $\Delta$ MFI (37°C) wie folgt:  $\Delta$ MFI (4°C) = 26,9 – 5,2 = 21,7 bzw.  $\Delta$ MFI (37°C) = 82,2 – 5,2 = 77,0. Der Anteil der 2-NBDG-positiven Zellen wurde aus dem gemeinsamen Graphen aller drei Kurven abgelesen (D). Als Cut-Off-Wert wurde in allen Fällen der Schnittpunkt der Kontroll-Kurve mit der 4°C-Kurve gewählt (rote Markierung).



**Abbildung 10.2:** Der Anteil 2-NBDG-positiver Zellen in Prozent nach 30-minütiger (oben) bzw. 60-minütiger Inkubation mit 2-NBDG bei 4°C und 37°C. Der Anteil positiver Zellen beträgt in aller Regel circa 60 Prozent und mehr.

**Tabelle 10.1: Der Anteil 2-NBDG-positiver Zellen in Prozent nach 30-minütiger bzw. 60-minütiger Inkubation mit 2-NBDG bei 4°C und 37°C.** Dargestellt sind die Ergebnisse der einzelnen Messreihen. Für die 60-minütige Inkubationszeit wurde mit Ausnahme für NHDF nur eine Messung durchgeführt. Zeichenerklärung: Stabw. = Standardabweichung, 7-AAD-pos. Zellen = tote Zellen, mean = Mittelwert.

| <b>30 Minuten</b> |                                  |         |                     |        |      |        |                       |
|-------------------|----------------------------------|---------|---------------------|--------|------|--------|-----------------------|
| Zelllinie         | Datum                            | Passage | positive Zellen (%) |        |      |        | 7-AAD-pos. Zellen (%) |
|                   |                                  |         | 4°C                 | Stabw. | 37°C | Stabw. |                       |
| HT-29             | 01.04.08<br>22.04.08             | p9      | 79,6                |        | 74,8 |        | 0,9                   |
|                   |                                  | p11     | 69,5                |        | 83,5 |        | 29,8                  |
|                   |                                  | mean    | 74,5                | 7,1    | 79,1 | 6,2    |                       |
| 23132/87          | 19.03.08<br>22.04.08             | p7      | 84,3                |        | 92,7 |        | 1,9                   |
|                   |                                  | p12     | 80,9                |        | 87,0 |        | 43,5                  |
|                   |                                  | mean    | 82,6                | 2,5    | 89,8 | 4,0    |                       |
| MDAMB-231         | 05.03.08<br>13.03.08             | p4      | 63,6                |        | 93,4 |        | 0,4                   |
|                   |                                  | p6      | 76,4                |        | 84,5 |        | 1,5                   |
|                   |                                  | mean    | 70,0                | 9,1    | 88,9 | 6,3    |                       |
| MDAMB-468         | 20.03.08<br>01.04.08             | p6      | 57,9                |        | 73,2 |        | 1,0                   |
|                   |                                  | p7      | 40,0                |        | 47,4 |        | 0,2                   |
|                   |                                  | mean    | 48,9                | 12,7   | 60,3 | 18,2   |                       |
| MCF-7             | 06.03.08<br>20.03.08             | p5      | 53,3                |        | 81,4 |        | 2,0                   |
|                   |                                  | p7      | 92,5                |        | 91,8 |        | 0,8                   |
|                   |                                  | mean    | 72,9                | 27,7   | 86,6 | 7,3    |                       |
| BT-20             | 05.03.08<br>20.03.08             | p4      | 71,7                |        | 95,7 |        | 0,2                   |
|                   |                                  | p6      | 72,9                |        | 93,5 |        | 2,5                   |
|                   |                                  | mean    | 72,3                | 0,8    | 94,6 | 1,5    |                       |
| SKOV-3            | 06.03.08<br>19.03.08             | p4      | 81,6                |        | 89,9 |        | 2,2                   |
|                   |                                  | p7      | 75,4                |        | 87,1 |        | 0,8                   |
|                   |                                  | mean    | 78,5                | 4,4    | 88,5 | 2,0    |                       |
| BXPC-3            | 04.03.08<br>13.03.08             | p5      | 59,9                |        | 93,3 |        | 0,9                   |
|                   |                                  | p8      | 72,0                |        | 91,6 |        | 2,5                   |
|                   |                                  | mean    | 66,0                | 8,5    | 92,5 | 1,2    |                       |
| HRT-18            | 04.03.08<br>13.03.08             | p4      | 67,0                |        | 88,0 |        | 1,6                   |
|                   |                                  | p7      | 77,9                |        | 94,8 |        | 0,9                   |
|                   |                                  | mean    | 72,4                | 7,7    | 91,4 | 4,8    |                       |
| HUVEC             | 21.05.08<br>31.05.08<br>11.11.08 | p3      | 65,8                |        | 87,4 |        | 40,3                  |
|                   |                                  | p4      | 89,7                |        | 95,2 |        | 17,2                  |
|                   |                                  | p6      | 92,3                |        | 82,3 |        | 43,5                  |
|                   |                                  | mean    | 82,6                | 14,6   | 88,3 | 6,5    |                       |
| NHDF              | 18.11.08<br>16.09.08             | p8      | 74,6                |        | 41,8 |        | n.a.                  |
|                   |                                  | p12     | 85,1                |        | 91,7 |        | 18,3                  |
|                   |                                  | mean    | 79,9                | 7,4    | 66,8 | 35,3   |                       |
| J774.2            | 23.09.08<br>23.09.08             | p4      | 59,0                |        | 91,6 |        | 9,3                   |
|                   |                                  | p4      | 55,2                |        | 85,3 |        | 13,7                  |
|                   |                                  | mean    | 57,1                | 2,7    | 88,4 | 4,5    |                       |
| <b>60 Minuten</b> |                                  |         |                     |        |      |        |                       |
| Zelllinie         | Datum                            | Passage | positive Zellen (%) |        |      |        | 7-AAD-pos. Zellen (%) |
|                   |                                  |         | 4°C                 | Stabw. | 37°C | Stabw. |                       |
| HT-29             | 22.04.08                         | p11     | 56,8                |        | 92,0 |        | 42,1                  |
| 23132/87          | 22.04.08                         | p12     | 71,4                |        | 86,9 |        | 32,9                  |
| MDAMB-231         | 09.04.08                         | p10     | 84,8                |        | 86,7 |        | 0,7                   |
| MDAMB-468         | 17.09.08                         | p1      | 87,8                |        | 92,3 |        | 31,7                  |
| MCF-7             | 22.04.08                         | p13     | 71,7                |        | 73,8 |        | 46,4                  |
| BT-20             | 09.04.08                         | p9      | 61,4                |        | 85,4 |        | 0,5                   |
| SKOV-3            | 08.04.08                         | p10     | 34,8                |        | 47,4 |        | 0,2                   |
| BXPC-3            | 08.04.08                         | p13     | 50,3                |        | 53,5 |        | 0,9                   |
| HRT-18            | 09.04.08                         | p13     | 84,4                |        | 96,9 |        | 0,7                   |
| HUVEC             | 11.11.08                         | p6      | 96,8                |        | 93,1 |        | 43,5                  |
| NHDF              | 18.11.08                         | p8      | 92,1                |        | 86,6 |        | n.a.                  |
|                   | 16.09.08                         | p12     | 90,3                |        | 95,4 |        | 17,7                  |
|                   | 16.09.08                         | p12     | 91,6                |        | 97,4 |        | 16,5                  |
|                   |                                  | mean    | 91,3                | 0,9    | 93,1 | 5,7    |                       |
| J774.2            | 23.09.08                         | p4      | 79,8                |        | 85,0 |        | 14,8                  |

**Tabelle 10.2: MFI und  $\Delta$ MFI der 2-NBDG-Aufnahme nach 30-minütiger (oben) und 60-minütiger (unten) Inkubation mit 2-NBDG bei 4°C und 37°C. Zeichenerklärung: Stabw. = Standardabweichung, 7-AAD-pos. Zellen = tote Zellen, mean = Mittelwert.**

| <b>30 Minuten</b> |                                  |          |      |      |      |              |        |      |        |                       |
|-------------------|----------------------------------|----------|------|------|------|--------------|--------|------|--------|-----------------------|
| Zelllinie         | Datum                            | Pas-sage | MFI  |      |      | $\Delta$ MFI |        |      |        | 7-AAD-pos. Zellen (%) |
|                   |                                  |          | Solo | 4°C  | 37°C | 4°C          | Stabw. | 37°C | Stabw. |                       |
| HT-29             | 01.04.08<br>22.04.08             | p9       | 2,1  | 14,8 | 22,3 | 12,8         |        | 20,2 |        | 0,9                   |
|                   |                                  | p11      | 3,3  | 10,1 | 19,6 | 6,9          |        | 16,3 |        | 29,8                  |
|                   |                                  | mean     | 2,7  | 12,5 | 21,0 | 9,8          | 4,2    | 18,3 | 2,8    |                       |
| 23132/87          | 19.03.08<br>22.04.08             | p7       | 2,5  | 11,9 | 44,0 | 9,4          |        | 41,5 |        | 1,9                   |
|                   |                                  | p12      | 2,3  | 12,9 | 18,5 | 10,6         |        | 16,3 |        | 43,5                  |
|                   |                                  | mean     | 2,4  | 12,4 | 31,3 | 10,0         | 0,9    | 28,9 | 17,8   |                       |
| MDAMB-231         | 05.03.08<br>13.03.08             | p4       | 2,2  | 5,3  | 14,8 | 3,2          |        | 12,7 |        | 0,4                   |
|                   |                                  | p6       | 3,0  | 16,7 | 32,4 | 13,7         |        | 29,4 |        | 1,5                   |
|                   |                                  | mean     | 2,6  | 11,0 | 23,6 | 8,4          | 7,5    | 21,0 | 11,9   |                       |
| MDAMB-468         | 20.03.08<br>01.04.08             | p6       | 2,5  | 6,8  | 17,0 | 4,3          |        | 14,4 |        | 1,0                   |
|                   |                                  | p7       | 1,4  | 3,9  | 6,3  | 2,5          |        | 4,9  |        | 0,2                   |
|                   |                                  | mean     | 2,0  | 5,4  | 11,6 | 3,4          | 1,3    | 9,7  | 6,7    |                       |
| MCF-7             | 06.03.08<br>20.03.08             | p5       | 3,1  | 6,9  | 14,5 | 3,9          |        | 11,4 |        | 2,0                   |
|                   |                                  | p7       | 3,4  | 29,6 | 27,3 | 26,2         |        | 23,9 |        | 0,8                   |
|                   |                                  | mean     | 3,2  | 18,3 | 20,9 | 15,0         | 15,8   | 17,7 | 8,8    |                       |
| BT-20             | 05.03.08<br>20.03.08             | p4       | 2,4  | 5,7  | 18,7 | 3,4          |        | 16,3 |        | 0,2                   |
|                   |                                  | p6       | 3,5  | 14,5 | 34,6 | 11,1         |        | 31,1 |        | 2,5                   |
|                   |                                  | mean     | 2,9  | 10,1 | 26,7 | 7,2          | 5,5    | 23,7 | 10,5   |                       |
| SKOV-3            | 06.03.08<br>19.03.08             | p4       | 1,7  | 7,7  | 19,1 | 5,9          |        | 17,4 |        | 2,2                   |
|                   |                                  | p7       | 1,9  | 8,6  | 19,4 | 6,7          |        | 17,5 |        | 0,8                   |
|                   |                                  | mean     | 1,8  | 8,1  | 19,3 | 6,3          | 0,6    | 17,4 | 0,1    |                       |
| BXPC-3            | 04.03.08<br>13.03.08             | p5       | 2,1  | 5,4  | 19,0 | 3,3          |        | 17,0 |        | 0,9                   |
|                   |                                  | p8       | 2,9  | 11,8 | 40,6 | 9,0          |        | 37,7 |        | 2,5                   |
|                   |                                  | mean     | 2,5  | 8,6  | 29,8 | 6,1          | 4,0    | 27,3 | 14,7   |                       |
| HRT-18            | 04.03.08<br>13.03.08             | p4       | 1,7  | 3,0  | 8,9  | 1,3          |        | 7,2  |        | 1,6                   |
|                   |                                  | p7       | 2,2  | 8,9  | 21,6 | 6,7          |        | 19,4 |        | 0,9                   |
|                   |                                  | mean     | 2,0  | 5,9  | 15,2 | 4,0          | 3,8    | 13,3 | 8,6    |                       |
| HUVEC             | 21.05.08<br>31.05.08<br>11.11.08 | p3       | 2,6  | 7,3  | 27,3 | 4,7          |        | 24,7 |        | 40,3                  |
|                   |                                  | p4       | 2,0  | 17,6 | 49,1 | 15,7         |        | 47,2 |        | 17,2                  |
|                   |                                  | p6       | 2,1  | 52,5 | 26,7 | 50,4         |        | 24,6 |        | 43,5                  |
|                   |                                  | mean     | 2,2  | 25,8 | 34,4 | 23,6         | 23,9   | 32,2 | 13,0   |                       |
| NHDF              | 18.11.08<br>16.09.08             | p8       | 1,8  | 11,8 | 6,2  | 10,0         |        | 4,4  |        | n.a.                  |
|                   |                                  | p12      | 3,9  | 30,7 | 52,1 | 26,8         |        | 48,2 |        | 18,3                  |
|                   |                                  | mean     | 2,9  | 21,3 | 29,1 | 18,4         | 11,9   | 26,3 | 31,0   |                       |
| J774.2            | 23.09.08<br>23.09.08             | p4       | 4,2  | 5,6  | 19,8 | 1,4          |        | 15,7 |        | 9,3                   |
|                   |                                  | p4       | 3,8  | 6,1  | 14,2 | 2,3          |        | 10,4 |        | 13,7                  |
|                   |                                  | mean     | 4,0  | 5,9  | 17,0 | 1,9          | 0,6    | 13,0 | 3,7    |                       |

| <b>60 Minuten</b> |                                  |          |      |       |       |              |        |       |        |                       |
|-------------------|----------------------------------|----------|------|-------|-------|--------------|--------|-------|--------|-----------------------|
| Zelllinie         | Datum                            | Pas-sage | MFI  |       |       | $\Delta$ MFI |        |       |        | 7-AAD-pos. Zellen (%) |
|                   |                                  |          | Solo | 4°C   | 37°C  | 4°C          | Stabw. | 37°C  | Stabw. |                       |
| HT-29             | 22.04.08                         | p11      | 3,7  | 8,1   | 87,7  | 4,4          |        | 84,0  |        | 42,1                  |
| 23132/87          | 22.04.08                         | p12      | 2,8  | 11,3  | 65,6  | 8,5          |        | 62,8  |        | 32,9                  |
| MDAMB-231         | 09.04.08                         | p10      | 2,9  | 18,8  | 33,2  | 15,9         |        | 30,2  |        | 0,7                   |
| MDAMB-468         | 17.09.08                         | p1       | 2,6  | 31,0  | 67,8  | 28,4         |        | 65,1  |        | 31,7                  |
| MCF-7             | 22.04.08                         | p13      | 2,6  | 14,7  | 19,6  | 12,2         |        | 17,1  |        | 46,4                  |
| BT-20             | 09.04.08                         | p9       | 3,6  | 11,2  | 30,6  | 7,6          |        | 27,1  |        | 0,5                   |
| SKOV-3            | 08.04.08                         | p10      | 1,3  | 3,0   | 6,2   | 1,8          |        | 5,0   |        | 0,2                   |
| BXPC-3            | 08.04.08                         | p13      | 1,5  | 6,4   | 9,2   | 4,9          |        | 7,6   |        | 0,9                   |
| HRT-18            | 09.04.08                         | p13      | 2,7  | 13,0  | 40,1  | 10,3         |        | 37,5  |        | 0,7                   |
| HUVEC             | 11.11.08                         | p6       | 2,1  | 98,6  | 86,1  | 96,6         |        | 84,1  |        | 43,5                  |
| NHDF              | 18.11.08<br>16.09.08<br>16.09.08 | p8       | 1,8  | 54,1  | 48,2  | 52,3         |        | 46,4  |        | n.a.                  |
|                   |                                  | p12      | 4,9  | 123,2 | 216,0 | 118,3        |        | 211,1 |        | 17,7                  |
|                   |                                  | p12      | 5,4  | 75,4  | 300,2 | 70,1         |        | 294,8 |        | 16,5                  |
|                   |                                  | mean     | 4,0  | 84,2  | 188,1 | 80,2         | 34,2   | 184,1 | 126,4  |                       |
| J774.2            | 23.09.08                         | p4       | 3,9  | 11,0  | 18,7  | 7,1          |        | 14,8  |        | 14,8                  |

**Tabelle 10.3: Der Anteil 2-NBDG-positiver Zellen in Prozent nach einstündiger und 24-stündiger Inkubation in Glukose-freiem Medium („Hunger“-Versuch).** Die Aufnahme von 2-NBDG wurde nach einer anschließenden Inkubation mit 2-NBDG bei 4°C und 37°C für 30 Minuten durchflusszytometrisch ermittelt. Die Messwerte nach 15-minütiger Glukose-freier Inkubation finden sich in Tab. 10.1. Zeichenerklärung: Stabw. = Standardabweichung, 7-AAD-pos. Zellen = tote Zellen, mean = Mittelwert.

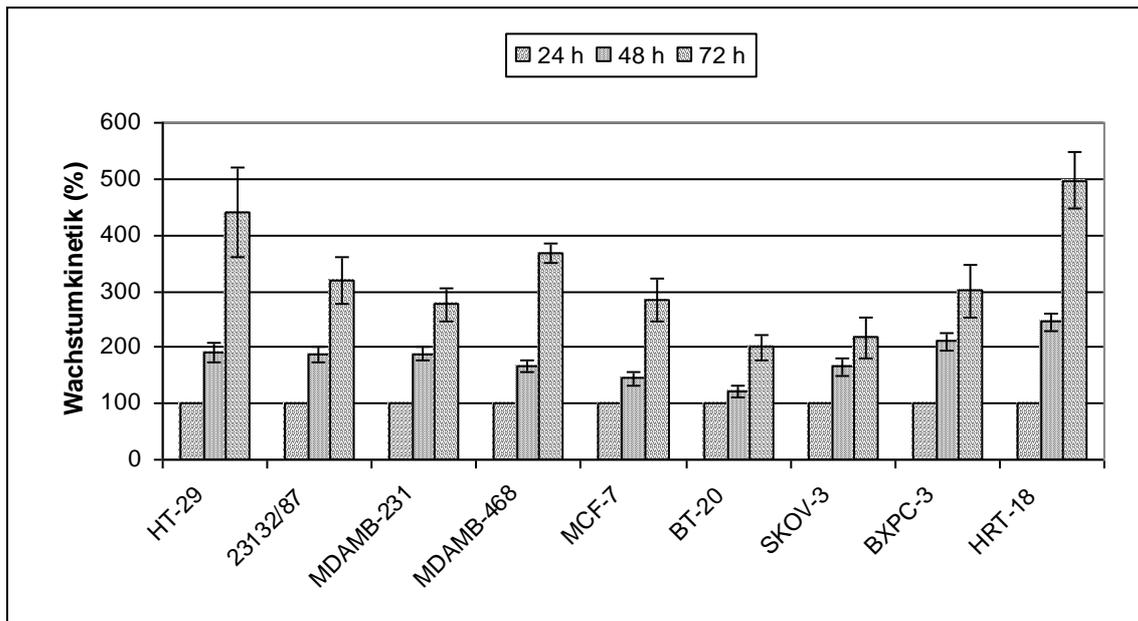
| <b>1 Stunde „Hungern“</b> |          |             |                     |        |      |        |                       |
|---------------------------|----------|-------------|---------------------|--------|------|--------|-----------------------|
| Zelllinie                 | Datum    | Passage     | positive Zellen (%) |        |      |        | 7-AAD-pos. Zellen (%) |
|                           |          |             | 4°C                 | Stabw. | 37°C | Stabw. |                       |
| 23132/87                  | 26.04.08 | p2          | 82,0                |        | 97,0 |        | 24,4                  |
| BT-20                     | 01.05.08 | p2          | 65,9                |        | 78,8 |        | 11,2                  |
| BXPC-3                    | 01.05.08 | p5          | 79,2                |        | 79,6 |        | 8,4                   |
| HUVEC                     | 11.11.08 | p6          | 96,0                |        | 94,6 |        | 43,5                  |
| NHDF                      | 18.11.08 | p8          | 83,2                |        | 81,8 |        | n.a.                  |
|                           | 17.09.08 | p12         | 95,1                |        | 94,5 |        | 29,2                  |
|                           |          | <b>mean</b> | 89,1                | 8,4    | 88,1 | 9,0    |                       |

| <b>24 Stunden „Hungern“</b> |          |             |                     |        |      |        |                       |
|-----------------------------|----------|-------------|---------------------|--------|------|--------|-----------------------|
| Zelllinie                   | Datum    | Passage     | positive Zellen (%) |        |      |        | 7-AAD-pos. Zellen (%) |
|                             |          |             | 4°C                 | Stabw. | 37°C | Stabw. |                       |
| 23132/87                    | 27.04.08 | p2          | 78,5                |        | 91,9 |        | 26,5                  |
| BT-20                       | 02.05.08 | p2          | 71,8                |        | 89,0 |        | 10,4                  |
| BXPC-3                      | 02.05.08 | p5          | 71,5                |        | 76,5 |        | 10,7                  |
| HUVEC                       | 12.11.08 | p6          | 86,7                |        | 93,7 |        | 35,7                  |
| NHDF                        | 19.11.08 | p8          | 94,7                |        | 93,4 |        | 20,3                  |
|                             | 18.09.08 | p12         | 94,7                |        | 97,5 |        | 18,8                  |
|                             |          | <b>mean</b> | 94,7                | 0,0    | 95,4 | 2,9    |                       |

**Tabelle 10.4: MFI und  $\Delta$ MFI der 2-NBDG-Aufnahme nach einstündiger und 24-stündiger Glukose-freier Inkubation („Hunger“-Versuch).** Der Anteil 2-NBDG-positiver Zellen wurde nach einer anschließenden Inkubation mit 2-NBDG bei 4°C und 37°C für 30 Minuten durchflusszytometrisch ermittelt. Die Messwerte nach 15-minütiger Glukose-freier Inkubation („Hungern“) finden sich in Tab. 10.2. Zeichenerklärung: Stabw. = Standardabweichung, 7-AAD-pos. Zellen = tote Zellen, mean = Mittelwert.

| <b>1 Stunde „Hungern“</b> |          |             |      |      |      |              |        |      |        |                       |
|---------------------------|----------|-------------|------|------|------|--------------|--------|------|--------|-----------------------|
| Zelllinie                 | Datum    | Pas-sage    | MFI  |      |      | $\Delta$ MFI |        |      |        | 7-AAD-pos. Zellen (%) |
|                           |          |             | Solo | 4°C  | 37°C | 4°C          | Stabw. | 37°C | Stabw. |                       |
| 23132/87                  | 26.04.08 | p2          | 4,2  | 25,6 | 91,2 | 21,3         |        | 87,0 |        | 24,4                  |
| BT-20                     | 01.05.08 | p2          | 3,1  | 10,5 | 23,8 | 7,4          |        | 20,7 |        | 11,2                  |
| BXPC-3                    | 01.05.08 | p5          | 2,1  | 15,4 | 21,4 | 13,4         |        | 19,3 |        | 8,4                   |
| HUVEC                     | 11.11.08 | p6          | 2,1  | 89,0 | 71,7 | 86,9         |        | 69,7 |        | 43,5                  |
| NHDF                      | 18.11.08 | p8          | 1,8  | 21,6 | 18,1 | 19,8         |        | 16,3 |        | n.a.                  |
|                           | 17.09.08 | p12         | 5,9  | 92,8 | 57,9 | 86,9         |        | 52,0 |        | 29,2                  |
|                           |          | <b>mean</b> | 3,9  | 57,2 | 38,0 | 53,3         | 47,4   | 34,1 | 25,3   |                       |

| <b>24 Stunden „Hungern“</b> |          |             |      |       |       |              |        |       |        |                       |
|-----------------------------|----------|-------------|------|-------|-------|--------------|--------|-------|--------|-----------------------|
| Zelllinie                   | Datum    | Pas-sage    | MFI  |       |       | $\Delta$ MFI |        |       |        | 7-AAD-pos. Zellen (%) |
|                             |          |             | Solo | 4°C   | 37°C  | 4°C          | Stabw. | 37°C  | Stabw. |                       |
| 23132/87                    | 27.04.08 | p2          | 5,2  | 26,9  | 82,2  | 21,7         |        | 77,0  |        | 26,5                  |
| BT-20                       | 02.05.08 | p2          | 3,9  | 13,6  | 41,1  | 9,7          |        | 37,2  |        | 10,4                  |
| BXPC-3                      | 02.05.08 | p5          | 3,7  | 12,9  | 23,0  | 9,2          |        | 19,3  |        | 10,7                  |
| HUVEC                       | 12.11.08 | p6          | 2,8  | 23,1  | 88,6  | 20,3         |        | 85,8  |        | 35,7                  |
| NHDF                        | 19.11.08 | p8          | 2,3  | 51,9  | 76,3  | 49,6         |        | 74,0  |        | 20,3                  |
|                             | 18.09.08 | p12         | 4,9  | 112,7 | 149,9 | 107,8        |        | 145,0 |        | 18,8                  |
|                             |          | <b>mean</b> | 3,6  | 82,3  | 113,1 | 78,7         | 41,2   | 109,5 | 50,2   |                       |



**Abbildung 10.3: Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit (Zellteilungsaktivität) der Tumorzelllinien nach 48- bzw. 72-stündiger Inkubation.** Die Proliferation der einzelnen Zelllinien wurde mit dem Kristallviolett-Assay photometrisch bestimmt. Als Referenz diente der Zellanteil nach 24-stündiger Inkubation in Kulturmedium; dieser wurde gleich 100 Prozent gesetzt. Die Proliferationsrate für die 48- bzw. 72-stündige Inkubation wurde entsprechend nach folgender Formel umgerechnet: Wachstumsgeschwindigkeit =  $[\text{Extinktionswert}_{(48 \text{ bzw. } 72 \text{ Stunden})} / \text{Extinktionswert}_{(24 \text{ Stunden})}] * 100$ . Eine prozentuale Wachstumsgeschwindigkeit von 300 % und größer nach 72 Stunden wird in dieser Arbeit als schnelles Wachstum definiert. Pro Messzeitpunkt wurden jeweils 10 unabhängige Messungen durchgeführt. Dieses Kriterium erfüllen die Zelllinien HT-29, 23132/87, MDAMB-468, BXPC-3 und HRT-18. Die Wachstumsgeschwindigkeit der anderen Zelllinien wird als langsam definiert. Die zugrundeliegenden Messwerte wurden freundlicherweise von Kilian Eich und Ferdi Karaaslan zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 10.5: Messwerte der durchflusszytometrischen CD44 / CD24-Phänotypisierung.**  
 Zeichenerklärung: 7-AAD-pos. Zellen = tote Zellen.

| Zelllinie | Datum    | Pas-<br>sage | CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>+</sup><br>(%) | CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup><br>(%) | CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>+</sup><br>(%) | CD44 <sup>-</sup> /CD24 <sup>-</sup><br>(%) | 7-AAD-pos.<br>Zellen (%) |
|-----------|----------|--------------|---|---|---|---|--------------------------|
| HT-29     | 27.03.08 | p8           | 4,1   | 60,3  | 3,6   | 32,0  | 0,8                      |
|           | 31.03.08 | p9           | 9,0   | 46,8  | 4,1   | 40,1  | 1,4                      |
| 23132/87  | 19.02.08 | p3           | 0,1   | 96,1  | 2,9   | 0,8   | 2,7                      |
|           | 27.02.08 | p4           | 0,3   | 93,1  | 5,7   | 0,9   | 0,6                      |
|           | 05.03.08 | p5           | 0,1   | 95,3  | 4,1   | 0,5   | 0,1                      |
| MDAMB-231 | 13.02.08 | p1           | 95,2  | 0,3   | 0,1   | 4,5   | 11,0                     |
|           | 26.02.08 | p3           | 91,4  | 0,2   | 0,1   | 8,4   | 11,6                     |
|           | 10.03.08 | p5           | 92,8  | 0,6   | 0,1   | 6,7   | 8,9                      |
| MDAMB-468 | 18.02.08 | p2           | 0,1   | 95,5  | 4,3   | 0,2   | 9,4                      |
|           | 27.02.08 | p3           | 0,1   | 80,6  | 19,0  | 0,3   | 1,8                      |
| MCF-7     | 27.02.08 | p4           | 0,2   | 85,9  | 12,1  | 1,8   | 4,8                      |
|           | 19.03.08 | p7           | 0,4   | 80,4  | 17,8  | 1,4   | 3,7                      |
| BT-20     | 25.02.08 | p3           | 5,9   | 89,3  | 2,2   | 2,7   | 4,8                      |
|           | 19.03.08 | p6           | 4,0   | 90,5  | 3,3   | 2,3   | 1,4                      |
| SKOV-3    | 20.02.08 | p2           | 0,6   | 59,7  | 38,7  | 1,2   | 12,1                     |
|           | 28.02.08 | p3           | 0,5   | 43,7  | 18,7  | 37,1  | n.a.                     |
| BXPC-3    | 14.02.08 | p1           | 98,4  | 0,1   | 0,1   | 1,5   | 2,0                      |
|           | 26.02.08 | p4           | 96,1  | 0,1   | 0,1   | 3,9   | 3,3                      |
|           | 03.03.08 | p5           | 98,7  | 0,1   | 0,1   | 1,3   | 0,7                      |
| HRT-18    | 15.02.08 | p1           | 2,2   | 17,0  | 70,9  | 9,9   | 0,4                      |
|           | 26.02.08 | p3           | 1,1   | 14,8  | 62,9  | 21,1  | 15,9                     |

**Tabelle 10.6: Bestimmung der Menge an gebildetem Laktat nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation in Glukose- und Gluamin-haltigem Kulturmedium (Glc<sup>+</sup> Gln<sup>+</sup>).** Die z.T. negativen Messwerte der Messreihe am 15.12.2008 resultieren aus einem zu hohen Hintergrund. Zur Berechnung der gebildeten Menge an Laktat siehe auch Kap. 3.4. Zeichenerklärung: n = Anzahl der Messungen, Min = Minimalwert / Messreihe, Max = Maximalwert / Messreihe.

| Zelllinie | n | Datum      | Messzeitpunkt | Passage | L-Laktat            |                 |              |              |
|-----------|---|------------|---------------|---------|---------------------|-----------------|--------------|--------------|
|           |   |            |               |         | Mittelwert [mmol/L] | Stabw. [mmol/L] | Min [mmol/L] | Max [mmol/L] |
| HT-29     | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,04                | 0,37            | 0,63         | 1,52         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,30                | 0,22            | -0,03        | 0,43         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 1,55                | 0,06            | 1,49         | 1,65         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 1,71                | 0,30            | 1,36         | 1,97         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 2,32                | 0,11            | 2,11         | 2,41         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 2,18                | 0,23            | 1,88         | 2,42         |
| 23132/87  | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,38                | 0,38            | 0,98         | 1,86         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,44                | 0,12            | 0,36         | 0,62         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 2,92                | 1,02            | 2,15         | 4,96         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 1,90                | 0,16            | 1,66         | 2,01         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 4,21                | 0,21            | 3,98         | 4,42         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 2,29                | 0,41            | 1,68         | 2,54         |
| MDAMB-231 | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 3,88                | 0,59            | 3,15         | 4,55         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,20               | 0,25            | -0,42        | 0,09         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 4,00                | 0,74            | 2,52         | 4,54         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,72                | 0,04            | 0,69         | 0,77         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 6,01                | 0,51            | 5,44         | 6,69         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 2,06                | 0,03            | 2,02         | 2,10         |
| MDAMB-468 | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,95                | 0,49            | 1,36         | 2,41         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,70               | 0,07            | -0,79        | -0,62        |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 1,76                | 0,14            | 1,61         | 1,97         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,50               | 0,03            | -0,54        | -0,46        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 2,54                | 0,20            | 2,26         | 2,77         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,43               | 0,07            | -0,49        | -0,34        |
| MCF-7     | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,27                | 0,41            | 0,78         | 1,82         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,21               | 0,08            | -0,33        | -0,15        |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 1,24                | 0,11            | 1,03         | 1,34         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,98                | 0,04            | 0,93         | 1,03         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 2,27                | 0,21            | 1,94         | 2,45         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 1,82                | 0,11            | 1,65         | 1,88         |
| BT-20     | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 5,21                | 0,93            | 3,89         | 6,20         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,22               | 0,26            | -0,54        | 0,02         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 6,22                | 0,10            | 6,08         | 6,36         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,37                | 0,05            | 0,33         | 0,41         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 7,32                | 0,38            | 6,70         | 7,71         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 1,15                | 0,19            | 0,90         | 1,29         |
| SKOV-3    | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 2,68                | 0,67            | 1,85         | 3,62         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,30                | 0,23            | 0,01         | 0,53         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 2,30                | 0,13            | 2,16         | 2,47         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 1,47                | 0,09            | 1,35         | 1,55         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 2,92                | 0,21            | 2,68         | 3,22         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 2,94                | 0,19            | 2,76         | 3,14         |
| BXPC-3    | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 3,70                | 0,73            | 2,84         | 4,54         |
|           | 3 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 1,77                | 0,03            | 1,74         | 1,79         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 5,70                | 0,16            | 5,38         | 5,82         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 4,82                | 0,33            | 4,48         | 5,22         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 7,31                | 0,88            | 5,98         | 8,13         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 5,68                | 0,31            | 5,44         | 6,12         |
| HRT-18    | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,69                | 0,55            | 0,97         | 2,32         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,86                | 0,31            | 0,49         | 1,24         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 2,62                | 0,18            | 2,41         | 2,83         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 3,00                | 0,18            | 2,82         | 3,24         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 5,28                | 0,32            | 4,77         | 5,58         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 4,34                | 0,40            | 3,86         | 4,73         |

**Tabelle 10.7: Bestimmung der Menge an gebildetem Laktat nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation in Glukose-haltigem und Glutamin-freiem Medium (Glc<sup>+</sup> Gln).** Die z.T. negativen Messwerte der Messreihe am 15.12.2008 resultieren aus einem zu hohen Hintergrund. Zur Berechnung der gebildeten Menge an Laktat siehe auch Kap. 3.4. Zeichenerklärung: n = Anzahl der Messungen, Min = Minimalwert / Messreihe, Max = Maximalwert / Messreihe.

| Zelllinie | n | Datum      | Messzeitpunkt | Passage | L-Laktat            |                 |              |              |
|-----------|---|------------|---------------|---------|---------------------|-----------------|--------------|--------------|
|           |   |            |               |         | Mittelwert [mmol/L] | Stabw. [mmol/L] | Min [mmol/L] | Max [mmol/L] |
| HT-29     | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 0,91                | 0,33            | 0,53         | 1,46         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,14                | 0,43            | -0,45        | 0,55         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,78                | 0,04            | 0,72         | 0,84         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,69                | 0,14            | 0,49         | 0,81         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 1,15                | 0,32            | 0,56         | 1,53         |
| 23132/87  | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 1,43                | 0,23            | 1,17         | 1,67         |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,36                | 0,28            | 0,86         | 1,62         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,16                | 0,23            | -0,06        | 0,41         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,93                | 0,31            | 0,46         | 1,26         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,58                | 0,11            | 0,50         | 0,73         |
| MDAMB-231 | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 1,51                | 0,06            | 1,45         | 1,62         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 1,22                | 0,02            | 1,19         | 1,25         |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 2,73                | 0,55            | 2,10         | 3,39         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,15               | 0,04            | -0,20        | -0,10        |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 2,23                | 0,30            | 1,78         | 2,61         |
| MDAMB-468 | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,49                | 0,18            | 0,32         | 0,74         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 3,38                | 0,19            | 3,14         | 3,57         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 1,08                | 0,14            | 0,87         | 1,17         |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,02                | 0,35            | 0,60         | 1,53         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,03                | 0,19            | -0,14        | 0,26         |
| MCF-7     | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,99                | 0,03            | 0,95         | 1,02         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,67                | 0,44            | 0,04         | 1,00         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 1,63                | 0,11            | 1,52         | 1,77         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 1,95                | 0,25            | 1,69         | 2,23         |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 0,98                | 0,37            | 0,52         | 1,54         |
| BT-20     | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,14               | 0,37            | -0,39        | 0,40         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,95                | 0,06            | 0,84         | 1,01         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,27                | 0,07            | 0,18         | 0,35         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 1,70                | 0,17            | 1,55         | 1,95         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 0,95                | 0,10            | 0,83         | 1,06         |
| SKOV-3    | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 4,20                | 0,81            | 3,02         | 5,15         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,35               | 0,32            | -0,57        | 0,12         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 4,71                | 0,72            | 3,69         | 5,25         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,15               | 0,19            | -0,39        | 0,03         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 6,53                | 0,39            | 5,84         | 6,92         |
| BXPC-3    | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 0,41                | 0,05            | 0,36         | 0,46         |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 2,24                | 0,55            | 1,62         | 2,99         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,26                | 0,14            | 0,10         | 0,40         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 1,87                | 0,17            | 1,65         | 2,06         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,56                | 0,16            | 0,35         | 0,73         |
| HRT-18    | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 2,40                | 0,22            | 2,11         | 2,67         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 1,41                | 0,41            | 0,84         | 1,75         |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,75                | 0,27            | 1,33         | 2,12         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,49                | 0,65            | -0,04        | 1,40         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 1,82                | 0,21            | 1,61         | 2,06         |
| HRT-18    | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,67                | 0,09            | 0,56         | 0,77         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 2,34                | 0,09            | 2,22         | 2,45         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 1,25                | 0,31            | 1,01         | 1,67         |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,37                | 0,34            | 0,93         | 1,85         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,61                | 0,24            | 0,33         | 0,90         |
| HRT-18    | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 1,05                | 0,06            | 0,95         | 1,12         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,60                | 0,21            | 0,38         | 0,88         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 1,74                | 0,14            | 1,50         | 1,89         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | 1,47                | 0,24            | 1,13         | 1,66         |

**Tabelle 10.8: Bestimmung der Menge an gebildetem Laktat nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation in Glukose-freiem, Glutamin-haltigem Medium (Glc<sup>-</sup> Gln<sup>+</sup>).** Die z.T. negativen Messwerte der Messreihe am 15.12.2008 resultieren aus einem zu hohen Hintergrund. Zur Berechnung der gebildeten Menge an Laktat siehe auch Kap. 3.4. Zeichenerklärung: n = Anzahl der Messungen, Min = Minimalwert / Messreihe, Max = Maximalwert / Messreihe.

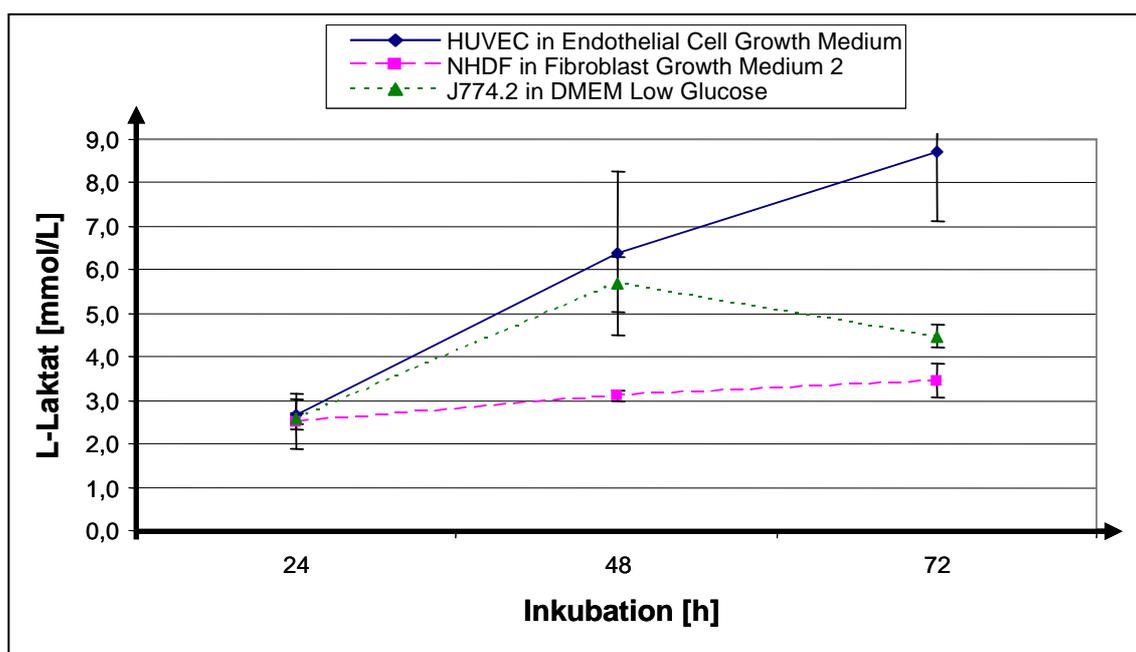
| Zelllinie | n | Datum      | Messzeitpunkt | Passage | L-Laktat            |                 |              |              |
|-----------|---|------------|---------------|---------|---------------------|-----------------|--------------|--------------|
|           |   |            |               |         | Mittelwert [mmol/L] | Stabw. [mmol/L] | Min [mmol/L] | Max [mmol/L] |
| HT-29     | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 0,97                | 0,30            | 0,59         | 1,34         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,11                | 0,13            | -0,03        | 0,22         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,56                | 0,10            | 0,39         | 0,68         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,07               | 0,06            | -0,15        | -0,02        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,48                | 0,12            | 0,27         | 0,64         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,45               | 0,04            | -0,51        | -0,41        |
| 23132/87  | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,35                | 0,66            | 0,89         | 2,65         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,22                | 0,15            | 0,07         | 0,37         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,39                | 0,12            | 0,23         | 0,50         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,29               | 0,07            | -0,36        | -0,19        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,35                | 0,15            | 0,20         | 0,51         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,77               | 0,05            | -0,85        | -0,73        |
| MDAMB-231 | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,10                | 0,20            | 0,87         | 1,43         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,02                | 0,07            | -0,07        | 0,09         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,49                | 0,06            | 0,41         | 0,58         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | 0,02                | 0,12            | -0,10        | 0,15         |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,40                | 0,09            | 0,28         | 0,51         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,23               | 0,03            | -0,27        | -0,20        |
| MDAMB-468 | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,10                | 0,23            | 0,88         | 1,46         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,15               | 0,51            | -0,62        | 0,51         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,14                | 0,08            | 0,07         | 0,30         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,49               | 0,05            | -0,57        | -0,46        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,10                | 0,12            | -0,03        | 0,23         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,65               | 0,11            | -0,80        | -0,55        |
| MCF-7     | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 0,64                | 0,21            | 0,42         | 0,93         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,02                | 0,43            | -0,46        | 0,43         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,38                | 0,18            | 0,12         | 0,59         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,09               | 0,10            | -0,24        | -0,03        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,65                | 0,06            | 0,57         | 0,72         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,41               | 0,17            | -0,60        | -0,19        |
| BT-20     | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,48                | 0,41            | 1,01         | 2,20         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,31               | 0,10            | -0,40        | -0,21        |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,60                | 0,13            | 0,45         | 0,79         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,23               | 0,05            | -0,29        | -0,17        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,65                | 0,09            | 0,50         | 0,78         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,29               | 0,05            | -0,35        | -0,26        |
| SKOV-3    | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,31                | 0,43            | 0,90         | 2,06         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,28                | 0,25            | 0,02         | 0,52         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,57                | 0,18            | 0,41         | 0,91         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,24               | 0,35            | -0,77        | -0,02        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,02                | 0,08            | -0,08        | 0,14         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,44               | 0,06            | -0,50        | -0,36        |
| BXPC-3    | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,17                | 0,29            | 0,62         | 1,39         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,04                | 0,23            | -0,24        | 0,31         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,33                | 0,18            | 0,14         | 0,55         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,28               | 0,07            | -0,34        | -0,19        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,49                | 0,06            | 0,43         | 0,61         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,43               | 0,11            | -0,58        | -0,33        |
| HRT-18    | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,09                | 0,23            | 0,72         | 1,26         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | 0,07                | 0,27            | -0,23        | 0,35         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,48                | 0,13            | 0,24         | 0,58         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,25               | 0,04            | -0,29        | -0,21        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,42                | 0,06            | 0,32         | 0,50         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,25               | 0,06            | -0,34        | -0,21        |

**Tabelle 10.9: Bestimmung der Menge an gebildetem Laktat nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation in Glukose- und Glutamin-freiem Medium (Glc<sup>-</sup> Gln<sup>-</sup>).** Die z.T. negativen Messwerte der Messreihe am 15.12.2008 resultieren aus einem zu hohen Hintergrund. Zur Berechnung der gebildeten Menge an Laktat siehe auch Kap. 3.4. Zeichenerklärung: n = Anzahl der Messungen, Min = Minimalwert / Messreihe, Max = Maximalwert / Messreihe.

| Zelllinie | n | Datum      | Messzeitpunkt | Passage | L-Laktat            |                 |              |              |
|-----------|---|------------|---------------|---------|---------------------|-----------------|--------------|--------------|
|           |   |            |               |         | Mittelwert [mmol/L] | Stabw. [mmol/L] | Min [mmol/L] | Max [mmol/L] |
| HT-29     | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 0,69                | 0,21            | 0,41         | 0,90         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,46               | 0,17            | -0,63        | -0,25        |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,43                | 0,09            | 0,35         | 0,57         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,61               | 0,19            | -0,89        | -0,47        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,63                | 0,04            | 0,58         | 0,67         |
| 23132/87  | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,60               | 0,11            | -0,75        | -0,48        |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 0,78                | 0,17            | 0,54         | 0,98         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,23               | 0,13            | -0,34        | -0,07        |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,48                | 0,05            | 0,44         | 0,57         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,54               | 0,19            | -0,72        | -0,34        |
| MDAMB-231 | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,59                | 0,04            | 0,54         | 0,64         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,51               | 0,15            | -0,63        | -0,29        |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 0,81                | 0,14            | 0,61         | 0,98         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,64               | 0,17            | -0,88        | -0,47        |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,58                | 0,08            | 0,45         | 0,66         |
| MDAMB-468 | 3 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,60               | 0,03            | -0,63        | -0,57        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,67                | 0,14            | 0,41         | 0,82         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,71               | 0,07            | -0,80        | -0,65        |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,02                | 0,26            | 0,68         | 1,28         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,86               | 0,21            | -1,12        | -0,60        |
| MCF-7     | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,36                | 0,04            | 0,30         | 0,42         |
|           | 3 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,85               | 0,02            | -0,87        | -0,82        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,18                | 0,04            | 0,14         | 0,25         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -1,35               | 0,07            | -1,42        | -1,26        |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 0,27                | 0,16            | 0,12         | 0,56         |
| BT-20     | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,98               | 0,07            | -1,06        | -0,88        |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,20                | 0,06            | 0,13         | 0,26         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,77               | 0,06            | -0,83        | -0,70        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,37                | 0,09            | 0,23         | 0,47         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -1,05               | 0,04            | -1,08        | -1,00        |
| SKOV-3    | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 0,90                | 0,23            | 0,58         | 1,25         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,58               | 0,63            | -1,03        | 0,34         |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,45                | 0,17            | 0,13         | 0,62         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,82               | 0,09            | -0,93        | -0,72        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,68                | 0,08            | 0,54         | 0,76         |
| BXPC-3    | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,86               | 0,14            | -1,01        | -0,73        |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 1,27                | 0,38            | 0,71         | 1,73         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,25               | 0,08            | -0,38        | -0,21        |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,35                | 0,10            | 0,15         | 0,42         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,81               | 0,16            | -0,98        | -0,64        |
| HRT-18    | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,12                | 0,09            | -0,01        | 0,23         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -1,09               | 0,13            | -1,20        | -0,90        |
|           | 2 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 0,59                | 0,13            | 0,50         | 0,68         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,40               | 0,14            | -0,59        | -0,27        |
|           | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,49                | 0,05            | 0,39         | 0,54         |
| HRT-18    | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,84               | 0,07            | -0,93        | -0,78        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,61                | 0,07            | 0,52         | 0,69         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,69               | 0,14            | -0,84        | -0,55        |
|           | 6 | 06.10.2008 | 24 h          | p4      | 0,86                | 0,28            | 0,47         | 1,22         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p6      | -0,16               | 0,18            | -0,40        | 0,02         |
| HRT-18    | 6 | 07.10.2008 | 48 h          | p4      | 0,46                | 0,04            | 0,39         | 0,51         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p6      | -0,83               | 0,09            | -0,94        | -0,73        |
|           | 6 | 08.10.2008 | 72 h          | p4      | 0,56                | 0,08            | 0,42         | 0,63         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p6      | -0,74               | 0,38            | -1,29        | -0,47        |

**Tabelle 10.10: Bestimmung der Menge an gebildetem Laktat nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation in den jeweiligen Spezial-Nährmedien für die benignen Zelllinien.** Zeichenklärung: n = Anzahl der Messungen, Min = Minimalwert / Messreihe, Max = Maximalwert / Messreihe.

| Zelllinie | n | Datum      | Messzeitpunkt | Passage | L-Laktat            |                 |              |              |
|-----------|---|------------|---------------|---------|---------------------|-----------------|--------------|--------------|
|           |   |            |               |         | Mittelwert [mmol/L] | Stabw. [mmol/L] | Min [mmol/L] | Max [mmol/L] |
| HUVEC     | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p7      | 2,68                | 0,34            | 2,17         | 2,93         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p7      | 6,38                | 1,88            | 4,82         | 9,11         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p7      | 8,72                | 1,58            | 7,82         | 11,08        |
| NHDF      | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p8      | 2,50                | 0,13            | 2,40         | 2,68         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p8      | 3,11                | 0,62            | 2,44         | 3,76         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p8      | 3,44                | 0,26            | 3,08         | 3,71         |
| J774.2    | 4 | 15.12.2008 | 24 h          | p4      | 2,59                | 0,64            | 2,10         | 3,51         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 48 h          | p4      | 5,67                | 0,11            | 5,53         | 5,78         |
|           | 4 | 15.12.2008 | 72 h          | p4      | 4,48                | 0,39            | 3,91         | 4,82         |



**Abbildung 10.4: Graphische Auswertung der Laktatbildung nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation für die benignen Zellen in den jeweiligen Spezial-Nährmedien.** Darstellung der Mittelwerte aus 4 unabhängigen Messungen pro Messzeitpunkt.

**Tabelle 10.11: Geräteinstellungen für die durchflusszytometrische CD44 / CD24-Phänotypisierung (oben) sowie für die Messung der 2-NBDG-Aufnahme nach 30-minütiger (Mitte) bzw. 60-minütiger (unten) Inkubation mit 2-NBDG. Verwendet wurde ein FACScan™ der Firma Becton Dickinson.**

| <b>CD44 / CD24-Phänotypisierung</b> |                        |               |     |     |     |             |             |             |             |
|-------------------------------------|------------------------|---------------|-----|-----|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Zelllinie                           | FSC / AmpGain          | SSC / AmpGain | FL1 | FL2 | FL3 | FL1:FL2 (%) | FL2:FL1 (%) | FL2:FL3 (%) | FL3:FL2 (%) |
| HT-29                               | E <sup>-1</sup> / 2,93 | 317 / 1,00    | 432 | 476 | 621 | 0,5         | 35,7        | 0,0         | 41,7        |
| 23132/87                            | E <sup>-1</sup> / 5,24 | 313 / 1,00    | 413 | 441 | 540 | 0,4         | 25,3        | 0,0         | 24,0        |
| MDAMB-231                           | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 426 | 474 | 595 | 0,3         | 35,2        | 0,0         | 29,4        |
| MDAMB-468                           | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 402 | 450 | 559 | 0,9         | 36,8        | 4,8         | 45,4        |
| MCF-7                               | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 283 / 1,00    | 423 | 465 | 587 | 1,0         | 32,9        | 0,0         | 29,9        |
| BT-20                               | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 420 | 481 | 595 | 0,6         | 47,8        | 4,8         | 56,3        |
| SKOV-3                              | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 372 | 414 | 534 | 0,2         | 34,6        | 0,0         | 40,9        |
| BXPC-3                              | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 414 | 476 | 618 | 0,3         | 41,7        | 0,0         | 45,1        |
| HRT-18                              | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 429 | 481 | 621 | 0,1         | 36,7        | 0,0         | 41,7        |

| <b>2-NBDG-Aufnahme nach 30-minütiger Inkubation mit 2-NBDG</b> |                        |               |     |     |     |             |             |             |             |
|--|------------------------|---------------|-----|-----|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Zelllinie  | FSC / AmpGain          | SSC / AmpGain | FL1 | FL2 | FL3 | FL1:FL2 (%) | FL2:FL1 (%) | FL2:FL3 (%) | FL3:FL2 (%) |
| HT-29  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 448 | 549 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| 23132/87   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 448 | 549 | 0,4         | 29,0        | 4,8         | 45,5        |
| MDAMB-231  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 431 | 458 | 549 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| MDAMB-468  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 448 | 549 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| MCF-7  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 448 | 549 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| BT-20  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 448 | 549 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| SKOV-3   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 474 | 549 | 0,4         | 94,4        | 4,8         | 45,5        |
| BXPC-3   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 457 | 560 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| HRT-18   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 427 | 469 | 549 | 0,4         | 29,0        | 4,8         | 45,5        |
| HUVEC  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 436 | 455 | 549 | 0,4         | 29,0        | 4,8         | 45,5        |
| NHDF   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 436 | 455 | 549 | 0,4         | 29,0        | 4,8         | 45,5        |
| J774.2   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 416 | 434 | 502 | 0,4         | 27,2        | 4,8         | 39,0        |

| <b>2-NBDG-Aufnahme nach 60-minütiger Inkubation mit 2-NBDG</b> |                        |               |     |     |     |             |             |             |             |
|--|------------------------|---------------|-----|-----|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Zelllinie  | FSC / AmpGain          | SSC / AmpGain | FL1 | FL2 | FL3 | FL1:FL2 (%) | FL2:FL1 (%) | FL2:FL3 (%) | FL3:FL2 (%) |
| HT-29  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 448 | 549 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| 23132/87   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 448 | 549 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| MDAMB-231  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 431 | 458 | 549 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| MDAMB-468  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 448 | 549 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| MCF-7  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 448 | 549 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| BT-20  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 448 | 549 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| SKOV-3   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 474 | 549 | 0,4         | 94,4        | 4,8         | 45,5        |
| BXPC-3   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 423 | 457 | 560 | 0,4         | 21,7        | 4,8         | 45,5        |
| HRT-18   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 460 | 501 | 549 | 0,4         | 29,0        | 4,8         | 45,5        |
| HUVEC  | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 436 | 455 | 549 | 0,4         | 29,0        | 4,8         | 45,5        |
| NHDF   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 436 | 455 | 549 | 0,4         | 29,0        | 4,8         | 45,5        |
| J774.2   | E <sup>-1</sup> / 2,74 | 294 / 1,00    | 416 | 434 | 502 | 0,4         | 27,2        | 4,8         | 39,0        |

## Danksagung

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Experimentellen Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Klinik I der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto durchgeführt. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. C.-T. Germer, Direktor der Klinik, bedanken.

Frau Prof. em. Dr. rer. nat. K. Ulrichs, ehemalige Leiterin der Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantationsimmunologie, danke ich für die Schaffung der hervorragenden Arbeitsbedingungen und für die wertvollen Hinweise zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. rer. nat. Christoph Otto für die Überlassung des Themas und die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Mit seiner Geduld und Erfahrung hat er mir das wissenschaftliche Arbeiten vermittelt sowie durch die vielen fruchtbaren Diskussionen diese Doktorarbeit ermöglicht.

Den Mitarbeitern und Doktoranden der Experimentellen Transplantationsimmunologie danke ich für die freundliche Unterstützung sowie die angenehme Atmosphäre vor Ort. Für die geduldige Anleitung und hervorragende Unterstützung während der praktischen Durchführung der Versuche möchte ich mich insbesondere bei Frau S. Gahn, Frau M. Koospal, Frau B. Mühling und Frau M. Schneider, Technische Assistentinnen in der Experimentellen Transplantationsimmunologie, bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau N. Pfetzer, Doktorandin der Biologie in der Universitäts-Frauenklinik Würzburg, für die Überlassung ihres Labor-Arbeitsplatzes zur Durchführung der Laktatmessungen sowie für die gute Verpflegung vor Ort.