

Glukosestoffwechsel und Strahlentherapie solider, maligner Tumoren

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sandra S. Meyer
Geb. am 12.04.1981 in Wiesbaden

Mainz, 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
2.1	Der Tumorstoffwechsel.....	4
2.2	Die Glykolyse in Tumorzellen	5
2.3	Laktat in soliden Tumoren.....	8
2.4	Tumordiagnose.....	10
2.5	Tumorthapie.....	11
2.6	Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs.....	14
2.7	Aufgaben und Ziele	14
3	Material und Methoden	17
3.1	Tumormaterial.....	17
3.2	Biolumineszenz.....	19
3.2.1	ATP	21
3.2.2	Laktat.....	22
3.2.3	Glukose.....	22
3.2.4	Standards.....	23
3.2.5	Optimierung und Validierung der Laktatmessung.....	24
3.2.6	Optimierung der Glukosemessung.....	26
3.2.7	Auswertung.....	27
3.2.8	Biolumineszenzmessung von Tumorschnitten	28
3.2.9	Falschfarbenkalibrierung.....	29
3.2.10	Photometrische Vergleichsmessung.....	29
3.3	Histochemie und Immunhistochemie.....	30
3.3.1	Hämatoxylin und Eosin Färbung	30
3.3.2	Cytokeratinfärbung	30
3.3.3	CD-45 Färbung	31
3.4	Zellkultur	31
3.4.1	Zellpräparate für immunhistochemische Färbungen.....	32
3.4.2	Laktatproduktionsraten.....	32
3.5	RealTime-PCR.....	33
3.5.1	RealTime-PCR der 10 humanen HNSCC-Linien	33
3.5.2	RealTime-PCR der fraktioniert bestrahlten Tumoren	33
3.6	Western Blot.....	34

3.7	Inhibitionsversuche.....	34
3.7.1	Einmalige Gabe	34
3.7.2	Einwöchige Gabe.....	35
3.8	Vergleich der Laktatmessung mittels MRT und Biolumineszenz.....	36
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Validierung und Optimierung der Biolumineszenz.....	37
4.2	Studie an 10 humanen HNSCC-Linien	50
4.2.1	Biolumineszenzmessungen.....	50
4.2.2	Expressionsanalysen	53
4.2.3	CD45 Färbung	54
4.3	Vergleich von 2 HNSCC-Linien während fraktionierter Strahlentherapie.....	56
4.3.1	Expressionsanalyse glykolyse-assoziiertes Gene	56
4.3.2	Biolumineszenzmessungen.....	58
4.3.3	CD45-Färbung	62
4.4	Inhibitionsversuche.....	64
4.4.1	Einmalige Gabe von DCA und BrPA.....	64
4.4.2	Einwöchige Gabe von DCA und CHC	65
4.5	Biolumineszenz-Messungen von Nadelbiopsien	68
4.6	Vergleich der Laktatmessung mittels MRT und Biolumineszenz.....	69
5	Diskussion	73
5.1	Validierung und Optimierung der Biolumineszenz.....	73
5.2	Studie an 10 humanen HNSCC-Linien	79
5.3	Vergleich von 2 HNSCC-Linien während fraktionierter Strahlentherapie.....	83
5.4	Inhibitionsversuche.....	88
5.5	Messung von Nadelbiopsien	90
5.6	Vergleich von MRT und Biolumineszenz.....	91
5.7	Fazit.....	93
6	Danksagung.....	95
7	Literatur	97
8	Lebenslauf.....	107
9	Anhang.....	109
9.1	Biolumineszenzdaten der fraktionierten Bestrahlungsstudie.....	109
9.2	RealTime-PCR-Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlungsstudie.....	113
9.3	Inhibitionsversuche.....	115
9.3.1	Einmalige Gabe	115

9.3.2	Einwöchige Gabe.....	117
9.4	Nadelbiopsiemessungen	119
9.5	Verwendete Geräte	120
9.6	Verbrauchsmaterial	120
9.7	Kits	121
9.8	Reagenzien, Chemikalien, Enzyme und Antikörper	121
9.9	Software	122
9.10	Puffer für die Biolumineszenz.....	122

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BrPA	3-Brompyruvat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHC	α -Cyano-4-Hydroxycinnamat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
DCA	Dichloressigsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fetales Kälberserum
FDG	¹⁸ Fluor-Desoxyglukose
FMN	Flavinmononukleotid
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
GPI	Glukosephosphatisomerase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
HK	Hexokinase
HNSCC	Head and neck squamous-cell carcinoma
LDH	Laktatdehydrogenase
MCT	Monocarboxylattransporter
MRS	Magnetresonanztomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFO	NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK	Pyruvat Dehydrogenase-Kinase
PET	Positronenemissionstomographie
PFK	Phosphofruktokinase
PK	Pyruvatkinase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Radikale Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBP	TATA box binding Protein
TCD ₅₀	Tumorkontrolldosis 50 %

1 Zusammenfassung

Der Tumorstoffwechsel ist charakterisiert durch eine erhöhte Glykolyserate und die Anreicherung von Laktat auch in Anwesenheit von Sauerstoff. In früheren Arbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ein hoher Laktatgehalt in Primärtumoren signifikant mit einem gesteigerten Metastasierungsverhalten und einer schlechteren Patientenprognose verknüpft ist. Ein wichtiges Verfahren zur Bestimmung des Metabolitstatus in kryokonservierten Tumorschnitten ist die induzierte, metabolische Biolumineszenz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues, digitales Kamerasystem für Biolumineszenzmessungen etabliert. Außerdem wurde der für die Laktat- und Glukosemessungen benötigte Enzymmix optimiert, so dass eine bessere Lichtausbeute und eine Kosteneinsparung von etwa 50 % erzielt werden konnten. Durch die Einführung von Kontrollmessungen und die Verwendung eines neu entwickelten ImageJ-Plugins für eine halbautomatisierte Auswertung, konnte ein zuverlässiges Messsystem etabliert werden, das Ergebnisse mit einer verbesserten Reproduzierbarkeit liefert.

Dieses neue Messsystem wurde in einer Studie an zehn humanen xenotransplantierten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches erfolgreich eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikante, positive Korrelation zwischen dem Laktatgehalt in soliden Primärtumoren und der Resistenz gegenüber einer fraktionierten Strahlentherapie besteht.

In einer weiterführenden Studie wurde im gleichen Xenograftmodell der Einfluss einer fraktionierten Strahlentherapie auf den Tumorstoffwechsel untersucht. Der Vergleich von zwei humanen Plattenepithelkarzinomlinien des Kopf-Hals-Bereichs im Verlauf einer fraktionierten Strahlentherapie zeigt deutliche Unterschiede zwischen strahlenresistenten und strahlensensiblen Tumoren. In der strahlenempfindlichen Tumورlinie UT-SCC 14 treten nach Bestrahlung mit drei Fraktionen in der Expression glykolyse-assoziiierter Gene und nach zehn Fraktionen im ATP- und Laktatgehalt signifikante Veränderungen auf. Im Gegensatz dazu wird bei der strahlenresistenten Linie UT-SCC 5 lediglich eine Absenkung des Laktatgehaltes nach zehn Fraktionen beobachtet, nicht jedoch des ATP-Gehalts. Die mRNA-Expression wird in UT-SCC 5 nicht durch eine fraktionierte Bestrahlung verändert. Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise, dass das mRNA-Expressionslevel und der Metabolitgehalt frühe Marker für das Ansprechen auf eine Strahlentherapie sein können.

2 Einleitung

Tumoren werden je nach Entität und Dignität klassifiziert. Benigne Tumoren sind durch ein lokal abgegrenztes, nicht-invasives Wachstum gekennzeichnet und in der Regel gut therapierbar. Maligne Tumoren weisen im Gegensatz dazu ein das umliegende Gewebe infiltrierendes und metastasierendes Wachstumsverhalten auf. Diese allgemein als Krebs bezeichnete Krankheit wird verursacht durch Veränderungen der DNA. Die zu einer Krebserkrankung führenden DNA-Mutationen können durch verschiedene Ursachen, etwa genetische Disposition, Umwelt- und Ernährungseinflüsse sowie Infektionen ausgelöst werden. Nach Schätzungen werden 25-30 % der weltweit registrierten Krebserkrankungen durch Tabakkonsum verursacht (WHO, 2008). Weitere 18 % der Krebserkrankungen werden Infektionen zugeschrieben, insbesondere *Helicobacter pylorie* sowie Hepatitis B-, C- und humane Papillomaviren lösen häufig Krebs aus (Parkin, 2006).

Die von Mutationen betroffenen Gene, die Tumorerkrankungen auslösen, werden eingeteilt in zwei Gruppen: Onkogene und Tumorsuppressorgene. Im Zusammenspiel führen das Ausschalten von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von Onkogenen zu einer gestörten Regulation von Zellteilung und Zelltod und damit zum Verlust des Proliferationsgleichgewichts (Kanz, 2001). Hanahan und Weinberg klassifizierten sechs durch genetische Instabilität erworbene Eigenschaften maligner Tumoren, die als „Hallmarks of Cancer“ bezeichnet werden: 1) Self-sufficiency in growth signals: Tumorzellen benötigen zur Proliferation keine externen Wachstumsfaktoren. 2) Insensitivity to Antigrowth Signals: Tumorzellen sind unempfindlich gegenüber wachstumshemmenden Signalen des umgebenden Gewebes. 3) Evading Apoptosis: Tumorzellen umgehen den programmierten Zelltod. 4) Limitless Replicative Potential: Tumorzellen sind unbegrenzt teilungsfähig. 5) Sustained Angiogenesis: Tumorzellen verursachen die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese), um die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu verbessern. 6) Tissue Invasion and Metastasis: Tumorzellen können das umliegende Gewebe infiltrieren und an verschiedenen Stellen im Körper Metastasen bilden (Hanahan and Weinberg, 2000).

Die Abfolge, in der Zellen diese Eigenschaft erwerben und zu Krebszellen werden, scheint nicht festgelegt. Es ist davon auszugehen, dass es sich um einen mehrstufigen Transformationsprozeß handelt, bei dem das Genom der Zellen mutiert und aufgrund des sie umgebenden Mikromilieus die Zellen selektiert werden, die die von Hanahan und

Weinberg postulierten Eigenschaften aufweisen (Gillies et al., 2008). Tennant et al. ergänzten aufgrund zahlreicher neuerer Erkenntnisse diese Hallmarks of Cancer um eine weitere wichtige Veränderung, die Tumorzellen von normalen Körperzellen unterscheidet: einen Shift des zellulären Stoffwechsels. Dieser ermöglicht es den Zellen im sauer- und nährstoffarmen und toxischen Tumormikromillieu zu überleben und zu proliferieren (Tennant et al., 2009).

2.1 Der Tumorstoffwechsel

Zuerst untersucht und beschrieben wurden Unterschiede des Stoffwechsels zwischen Tumor- und Normalgewebe von Otto Warburg in den Zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts. Ausgehend von der Beobachtung, dass die Atmung von Zellen während der Entwicklung deutlich höher ist als in Ruhe, verglich er zunächst die Atmung eines Rattenkarzinoms mit der von Niere und Leber. Entgegen der Erwartung, dass Tumoren als rasch wachsendes Gewebe eine hohe Atmung aufweisen, war diese geringer als die des Normalgewebes. Deshalb untersuchte Warburg die Glykolyseaktivität von Rattenkarzinomen unter anaeroben und aeroben Bedingungen und stellte fest, dass Tumoren auch in Anwesenheit von Sauerstoff große Mengen Laktat bilden. Er wiederholte diese Versuche mit verschiedenen humanen Tumoren und fand bei Karzinomen eine 3 bis 4 mal höhere Milchsäureproduktion als bei benignen Tumoren (Alle Informationen: Warburg, 1924).

Mittlerweile belegen zahlreiche Studien, dass Tumorzellen auch in Anwesenheit von Sauerstoff Glukose zu Laktat umsetzten, was als aerobe Glykolyse oder Warburg-Effekt bezeichnet wird (Ferreira, 2010; Hsu and Sabatini, 2008; Koppenol et al., 2011). Allerdings erscheint die Beobachtung, dass Tumoren einen großen Teil ihres hohen Energiebedarfs durch die Glykolyse decken, auch wenn Sauerstoff für einen oxidativen Abbau zur Verfügung stünde, zunächst paradox. Die Energiebilanz der unvollständigen Oxidierung von Glukose zu Laktat beträgt 2 ATP, während durch die vollständige Oxidierung 36 ATP generiert werden (Gillies et al., 2008). Der veränderte Metabolismus bietet Tumoren jedoch Überlebens- und Wachstumsvorteile, die diese nachteilige Energiebilanz mehr als ausgleichen: Zunächst ist die Energiegewinnung durch die Verstoffwechslung von Glukose zu Laktat ein deutlich schnellerer Prozess als die vollständige Oxidation. Weiterhin verfügen Zellen, die aerobe Glykolyse betreiben, in einer Umgebung mit schwankender Sauerstoffversorgung über einen Überlebensvorteil gegenüber Zellen, die allein die oxidative Energiegewinnung nutzen (Pouysségur et al.,

2006). Außerdem ist ein erhöhter Glukoseverbrauch durch die Bildung von Laktat und auch CO_2 mit einer Ansäuerung des Mikromillieus verbunden, was die Invasion der Tumorzellen in umliegendes Normalgewebe und die Tumorprogression begünstigt (Gillies et al., 2008; Swietach et al., 2007). Ein weiterer gewichtiger Vorteil der gesteigerten Glykolyse ist die Bereitstellung von Stoffwechsel-Intermediaten zur Synthese von Nukleotiden, Lipiden und Aminosäuren, was eine rasche Proliferation der Zellen ermöglicht (Vander Heiden et al., 2009).

Eine Schlüsselstellung in dieser Stoffwechsellanpassung nimmt der Hypoxie induzierter Faktor 1 (HIF-1) ein, der eine Vielzahl von regulatorischen Funktionen zur Anpassung an sauerstoffarme (hypoxische) Bedingungen besitzt (Gatenby and Gillies, 2004). Wahrscheinlich wird HIF bereits in der frühen Phase der Krebsentstehung aktiviert, wenn durch das unstrukturierte und rasche Wachstum des Tumors die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen in von Blutgefäßen weiter entfernten Bereichen vermindert wird (Hsu and Sabatini, 2008). Darüber hinaus kann die Aktivität von HIF jedoch auch unabhängig vom Sauerstoffgehalt durch andere Faktoren ausgelöst oder aufrecht erhalten werden (Kim et al., 2007a; Robey et al., 2005). Unter den zahlreichen Targets, die durch HIF reguliert werden, befinden sich sowohl der Glukose-Transporter 1 (GLUT1) als auch jeweils mindestens eine Isoform jedes Enzyms der Glykolyse (Denko, 2008; Godinot et al., 2007). Außerdem sind mittlerweile zahlreiche Interaktionen des Tumorstoffwechsels mit anderen Hallmarks of cancer beschrieben worden (einen Überblick geben Kroemer and Pouyssegur, 2008), und auch Mutationen einiger Onkogene (Phosphatidylinositol 3-Kinase, ras, myc) und Tumorsuppressorgene (p53) führen zu einer erhöhten Glykolyseaktivität (DeBerardinis, 2008).

2.2 Die Glykolyse in Tumorzellen

Der glykolytische Flux in normalen Säugerzellen wird hauptsächlich durch Glukosetransporter (GLUT), Hexokinasen (HK) und die Phosphofruktokinase-1 (PFK1) gesteuert, neben diesen haben aber auch noch weitere Schritte einen Einfluss (Moreno-Sánchez et al., 2007). In Tumorzellen führen die veränderte Expression, Mutation und post-translationale Inaktivierung metabolischer Enzyme sowie die Substitution durch andere Isoformen zu einem abweichenden Metabolismus (Tennant et al., 2010). Im folgenden werden GLUT, HK und PFK1 und einige weitere Enzyme vorgestellt, die zentrale Stellen in der Glykolyse oder mit ihr verknüpften Stoffwechselwegen

einnehmen und bei denen tumorspezifische Veränderungen in verschiedenen Entitäten erkannt wurden. Eine Übersicht über die geschilderten Abläufe gibt Abb. 1.

Die Umwandlung von Glukose zu Glukose-6- Phosphat (G-6-P) unter Verbrauch eines ATPs, wird durch die **Hexokinase** (HK) katalysiert. Das anionische G-6-P kann die Zellmembran nicht mehr passieren und wird nachfolgend entweder in der Glykolyse oder dem Pentosephosphatweg abgebaut oder zur Glykogensynthese genutzt (Pelicano et al., 2006). Es sind vier verschiedene Hexokinase-Isoformen bekannt. Die Typen I, II, und III besitzen eine hohe Glukoseaffinität und werden allosterisch durch G-6-P inhibiert. Im Gegensatz dazu wird die HK IV nicht durch G-6-P inhibiert und weist eine deutlich niedrigere Glukoseaffinität auf (Pedersen et al., 2002).

Die **Glukosephosphatisomerase** (GPI) wandelt G-6-P in Fruktose-6-Phosphat um. Dieses ubiquitäre Enzym ist in anderer Funktion außerdem als Autokriner Motilitätsfaktor bekannt (Yanagawa et al., 2004). Tsutsumi et al. berichten von einer erhöhten Expression der GPI in Colonkarzinombiopsien und vermerken eine gesteigerte Glukoseaufnahme sowie eine erhöhte Laktatproduktion in GPI-überexprimierenden Colonkarzinomzellen. In Xenograft-Experimenten bildeten diese Zellen außerdem vermehrt Metastasen (Tsutsumi et al., 2009).

Die **Phosphofruktokinase 1** (PFK1) katalysiert die ATP-verbrauchende, irreversible Umwandlung von Fruktose-6-Phosphat in Fruktose-1,6-Bisphosphat von der drei humane Isoformen, die Typen M, L, und P, existieren (Pelicano et al., 2006). Die Aktivität der PFK1 wird allosterisch reguliert: ATP inhibiert das Enzym, Fruktose-2,6-Bisphosphat ist ein starker Aktivator und hebt auch eine Inaktivierung durch ATP auf, wodurch Glukoseaufnahme und Glykolyserate gesteigert werden können (Yalcin et al., 2009). Gebildet und auch abgebaut wird Fruktose-2,6-Bisphosphat durch das bifunktionale Enzym **6-Phosphofrukto-2-kinase/Fruktose-2,6-bisphosphatase** (PFK2), so daß diesem Enzym eine wichtige Regulationsfunktion zukommt (Yalcin et al., 2009). Eine Überexpression der PFK2 wurde in verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem bei Darm- und Brustkrebs, festgestellt (Kessler et al., 2008).

Die **Pyruvatkinase** (PK) wandelt im letzten Schritt der Glykolyse Phosphoenolpyruvat in Pyruvat um und überträgt dabei die Phosphatgruppe auf ADP, so dass ein ATP gebildet wird. Es gibt vier verschiedene Isoformen der PK, die Typen L und R, die durch das *PKLR*-Gen codiert werden, sowie die durch das *PKM2*-Gen codierten Typen M1 und M2 (Luo and Semenza, 2011). In Tumoren tritt die PKM2 Isoform neben der aktiven, tetrameren Form, die auch in proliferierenden Geweben vorkommt, vor allem in einer inaktiven, dimeren Form auf; dies führt zu einer Anreicherung von Zwischenprodukten

der Glykolyse, die dann für die Synthese von Nucleinsäuren, Phospholipiden und Aminosäuren zur Verfügung stehen (Mazurek et al., 2005).

Die **Laktatdehydrogenase** (LDH) katalysiert die Umwandlung von Pyruvat in Laktat, wobei ein NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Das tetramere Enzym setzt sich aus M- und/oder H- Untereinheiten zusammen, daraus ergeben sich fünf verschiedene Isoformen (Pelicano et al., 2006). Codiert werden die beiden Untereinheiten durch die Gene *LDH-A* und *LDH-B*, wobei die Transkription von *LDH-A* durch HIF-1 α gesteuert wird. In Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ist eine erhöhte Expression der LDH5-Isoform mit einer schlechteren Prognose und vermehrter Metastasierung verknüpft (Koukourakis et al., 2009).

Die **Pyruvat-Dehydrogenase** (PDH) katalysiert die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA, welches dann in den Citratzyklus eintritt. Phosphorylierung durch die **Pyruvat Dehydrogenase-Kinase 1** (PDK-1) inaktiviert die PDH (Koukourakis et al., 2005). Die PDK-1 steht unter direkter Regulation von HIF1, weshalb in vielen Tumoren der Eintritt von Pyruvat in die Mitochondrien vermindert oder inhibiert ist (Kim et al., 2007b). Wigfield et al. ermittelten für Patienten mit einer hohen PDK-1 Expression ein signifikant schlechteres Überleben als für Patienten mit niedriger Expression. Außerdem erzielten sie durch einen PDK-1 Knockdown eine verminderte Laktatproduktion *in vitro* (Wigfield et al., 2008).

Der Import und Export von Molekülen des Stoffwechsels erfolgt bei Tumorzellen über die Transporter, die auch in normalen Körperzellen aktiv sind. Allerdings weichen die Expressionsmuster dieser Transporter zum Teil ab, was auf eine besondere Bedeutung für die Funktion des Tumorstoffwechsels hindeutet. Der **Glukosetransporter 1** (Glut1) wird in nahezu allen Geweben exprimiert und ermöglicht den Transport von Glukose und anderen Hexosen durch die Zellmembran entlang eines Konzentrationsgefälles (Amann and Hellerbrand, 2009). Die Überexpression von Glut1 wurde bei verschiedenen Tumorentitäten berichtet, außerdem besteht eine inverse Korrelation zwischen dem Glut1-Expressionslevel und dem Überleben von Krebspatienten (Ganapathy et al., 2009).

Die Familie der Monocarboxylattransporter bewerkstelligt den gekoppelten Transport von Laktat, Pyruvat und anderer Ketonkörper mit je einem Proton zwischen extrazellulärem Raum und Zellinnerem. Der **Monocarboxylattransporter 1** (MCT1) wird normaler Weise ubiquitär exprimiert, vor allem aber in Muskel- und Herzzellen (Halestrap and Price, 1999). Eine Überexpression des MCT1 wurde in Mammakarzinomen und Neuroblastomen festgestellt (Fang et al., 2006; Pinheiro et al., 2010).

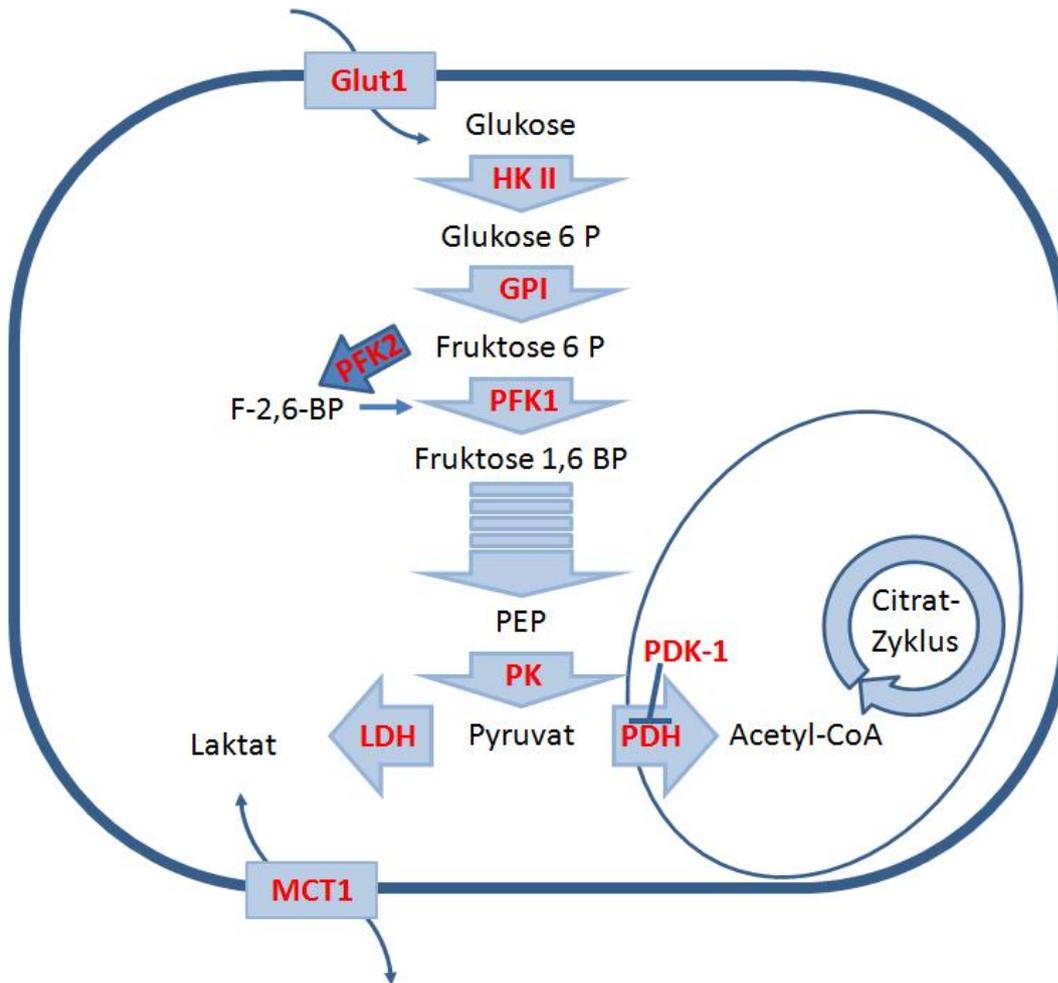


Abb. 1: Die Glykolyse in der Tumorzelle. Rot markierte Enzyme werden im Text behandelt.

Alle hier beschriebenen Veränderungen wurden in verschiedenen Tumorentitäten vorgefunden, jedoch handelt es sich nicht um einen universellen Mechanismus, der in allen Tumoren und Entitäten gleich abläuft. Vielmehr ist davon auszugehen, dass in jedem Tumor und in jeder Tumorzelllinie eine individuelle Kombination von Merkmalen und Mechanismen vorliegt, die zu einer gesteigerten Glykolyse führt (Moreno-Sánchez et al., 2007). Das Produkt dieser Stoffwechseländerungen ist aber in allen Fällen gleich: eine erhöhte Glykolyseaktivität führt zu einer Anreicherung von Laktat.

2.3 Laktat in soliden Tumoren

Mit einer methodischen Weiterentwicklung der bildgebenden Biolumineszenz rückte die Erforschung des Tumorstoffwechsels durch die Messung von Metaboliten in Gewebeschnitten in den Neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts in den Fokus dieser Arbeitsgruppe (Mueller-Klieser and Walenta, 1993). Erste Pilotstudien, in denen in

Zervixkarzinomen sowie Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs der ATP-, Glukose- und Laktatgehalt gemessen wurde, wiesen auf die Sonderstellung des Laktates hin, da in beiden Entitäten das Auftreten von Metastasen mit einem hohen Laktatgehalt korrelierte (Schwickert et al., 1995; Walenta et al., 1997).

Diese Beobachtungen konnten in umfangreicheren Studien bestätigt werden. Bei der Datenauswertung von 34 Patienten mit Zervixkarzinomen wurde ein signifikant höherer Laktatgehalt bei metastasierenden als bei nicht-metastasierenden Tumoren festgestellt. Außerdem wurde für die Patienten, deren Biopsien niedrige Laktatgehalte aufwiesen, eine signifikant längere Überlebenswahrscheinlichkeit ermittelt (Walenta et al., 2000). Bei 34 Patienten mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich waren Zwei-Jahres-Überleben sowie Metastasierungsverhalten signifikant schlechter, wenn die Primärtumoren einen hohen Laktatgehalt aufwiesen (Brizel et al., 2001). In 24 Patienten mit rektalen Adenokarzinomen konnte ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen dem metastasierendem Verhalten und dem Laktatgehalt des Primärtumors nachgewiesen werden (Walenta et al., 2003).

Zusammenfassend war der Laktatgehalt in den untersuchten Entitäten ein guter Maßstab für den Malignitätsgrad der Tumoren, so dass eine klinische Diagnose des Laktats zu einer verbesserten Prognose und Therapie führen könnte (Walenta et al., 2004). Allerdings erscheint es plausibel, dass ein hoher Laktatgehalt in soliden Tumoren nicht nur eine Folge des veränderten Stoffwechsels und Malignitätsmarker ist, sondern selbst eine aktive Rolle beim Fortschreiten der Erkrankung spielt (Walenta and Mueller-Klieser, 2004).

Nachdem Laktat lange Zeit als reines Abfallprodukt des Stoffwechsel angesehen wurde, mehren sich nun die Hinweise, dass diesem Metaboliten eine aktivere Rolle zukommt. Laktat besitzt selbst eine regulatorische Funktion im Glukosestoffwechsel (Sola-Penna, 2008), und die Laktatabgabe von Tumoren unterdrückt die Proliferation und Cytokinfreisetzung humaner cytotoxischer T-Zellen (Fischer et al., 2007). Zudem erhöht Laktat die Motilität von Tumorzellen, was das gesteigerte Metastasierungsverhalten von Primärtumoren mit hohem Laktatgehalt erklären könnte (Goetze et al., 2011). Auch das Ansprechen auf verschiedene Tumorthapien kann durch Metabolite beeinflusst werden. Für Pyruvat und auch Laktat wurde eine Scavenging-Funktion nachgewiesen, die die Bildung radikaler Sauerstoffspezies verringern und so den Erfolg einer Chemo- und vor allem auch Strahlentherapie vermindern könnte (eine Übersicht geben Sattler and Mueller-Klieser, 2009).

Erste Ergebnisse einer DFG-geförderten Studie an 5 xenotransplantierten humanen Tumorlinien des Kopf-Hals-Bereichs zeigen eine signifikant positive Korrelation zwischen Laktatgehalt und Strahlenresistenz und sprechen für eine strahlenprotektive Wirkung dieses Metabolits (Quennet et al. 2006). Allerdings war diese Korrelation nicht geeignet, anhand des Laktatgehaltes eine prädiktive Aussage über den Erfolg einer fraktionierten Strahlentherapie zu treffen. Mögliche Gründe dafür könnten in einer durch die Bestrahlung variierenden Expression glykolytischer Enzyme und einem veränderten Stoffwechselstatus liegen. Auch wenn noch viele Fragen zur Ursache und Wirkung des Laktates in soliden Tumoren ungeklärt sind, so zeigen die Studien dieser Arbeitsgruppe doch eine potentielle Anwendbarkeit des Laktatgehaltes in der klinischen Diagnose.

2.4 Tumordiagnose

Jedes Jahr werden in Deutschland etwa 425.000 neue Krebserkrankungen diagnostiziert (Stand 2006, KID, 2010). Am häufigsten treten bei Männern und Frauen Krebserkrankungen der Verdauungsorgane auf, an zweiter Stelle folgt bei Männern Lungen- und bei Frauen Brustkrebs (Statistisches Bundesamt, 2010). Wurde bei einem Patienten Krebs diagnostiziert, wird das Stadium der Erkrankung ermittelt. Dieses als Staging bezeichnete Bewerten des Tumors stellt die Grundlage für die Therapieplanung dar und bezieht verschiedene Faktoren ein. Das am weitesten verbreitete System zur Klassifizierung solider Tumoren ist das TNM-System, bei dem neben der Ausdehnung des Primärtumors (T), die Zahl der Lymphknotenmetastasen (N = engl. node) sowie das Vorhandensein oder Fehlen von Fernmetastasen (M) bewertet wird (Wittekind and Meyer, 2010).

Zur Ermittlung des TNM-Status werden verschiedene bildgebende Verfahren eingesetzt. Neben dem Ultraschall zur ersten Absicherung des Befundes kommen vor allem klassische Röntgenuntersuchung und Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT), sowie Positronenemissionstomografie (PET) zum Einsatz (Claussen and Horger, 2010). Zusätzlich können Stanzbiopsien oder Feinnadelpunktionen herangezogen werden, um unklare Befunde auch histologisch oder zytologisch zu untersuchen (Siewert and Vogelsang, 2010).

Neben der Erfassung anatomischer Gegebenheiten spielt die Darstellung metabolischer Abläufe eine zunehmend wichtigere Rolle in der Krebsdiagnostik. Klinisch relevant ist vor allem das PET-Imaging mit dem Glukoseanalogon ¹⁸Fluor-Desoxyglukose (FDG). Dieses wird, ebenso wie normale Glukose, rasch in die Tumorzellen

aufgenommen und zu FDG-6-Phosphat umgesetzt, das dann nicht weiter verstoffwechselt werden kann und sich in den Zellen anreichert. Seit der Kombination von PET- und CT-Geräten Ende der Neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts nimmt das FDG-PET Imaging eine herausragende Stellung bei Tumordiagnose und –staging, sowie dem Aufspüren von Metastasen ein. Im Jahre 2010 waren mehr als 2000 Therapieeinrichtungen mit kombinierten PET/CT –Geräten ausgestattet (Alle Informationen: Czernin et al., 2010; Zhu et al., 2011).

Auch mit verschiedenen Verfahren der Magnetresonanztomographie (MRS) lassen sich Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe oder auch verschiedenen malignen Tumoren darstellen.

2.5 Tumorthherapie

Je nach Stadium der Erkrankung und Entität werden verschiedene kurative Therapieverfahren angewendet. Eine Operation ist nach wie vor das erfolgreichste Mittel zur Behandlung solider Tumoren (Pfeifer et al., 2006). Dabei ist das Ziel des chirurgischen Eingriffs die vollständige Entfernung des Tumorgewebes und befallener, umliegender Lymphknoten, eine sogenannte RO-Resektion (Siewert and Vogelsang, 2010).

Nach der operativen Entfernung eines soliden Tumors ist die Bestrahlung das zweiterfolgreichste Therapieverfahren (Pfeifer et al., 2006). Die permanente lokale Tumorkontrolle, also die Vernichtung aller teilungsfähigen Tumorzellen (auch als Tumorstammzellen oder tumor-initiiierende Zellen bezeichnet) ist das angestrebte Ziel einer Strahlentherapie (Baumann et al., 2008). Dazu werden zwei grundlegend unterschiedliche Verfahren angewandt: In der Brachytherapie werden radioaktive Substanzen in den Körper in die unmittelbare Nähe des Tumors eingebracht, in der Teletherapie befindet sich die Strahlenquelle in einigem Abstand zum Patienten (Pötter et al., 2010).

In einer Teletherapie können verschiedene Arten von ionisierender Strahlung eingesetzt werden: Photonen, Elektronen, Protonen und Schwerionen, die sich in der Energieabgabe an und der Eindringtiefe in das Gewebe unterscheiden. Allen gemeinsam und namensgebend ist, dass die Strahlung soviel Energie besitzt, dass beim Auftreffen der Strahlung ein Elektron aus der Elektronenhülle eines Atoms gelöst wird (Ionisation). Durch diese Radikalbildung werden einige Moleküle in einer Zelle direkt geschädigt. Deutlich häufiger werden Zellbestandteile aber indirekt beschädigt, indem zunächst

durch die Reaktion mit Wassermolekülen freie Radikale gebildet werden, die dann mit weiteren Molekülen interagieren. Prinzipiell können Schäden in allen Zellbestandteilen (Proteinen, RNA und DNA) ausgelöst werden. Das Hauptziel einer Strahlentherapie ist jedoch die Schädigung der DNA, die zum Zelltod führt (Alle Informationen: Bristow and Hill, 2005). Einen großen Einfluss auf den Erfolg einer Röntgentherapie hat der Sauerstoffgehalt im zu bestrahlenden Gewebe, da durch radikale Sauerstoffspezies (ROS) Strahlenschäden in der DNA fixiert werden. Die Strahlenempfindlichkeit von Zellen ist deshalb unter aeroben Bedingungen drei mal höher als in Hypoxie (Moeller and Dewhirst, 2006).

Die zentrale Messgröße bei der Planung und Durchführung einer Strahlentherapie ist die Energiedosis, die vom Gewebe absorbiert wird. Sie wird unabhängig von der Strahlenquelle in Gray (Gy) angegeben, wobei 1 Gy einer Energie von einem Joule pro Kilogramm entspricht (Pötter et al., 2010). Die in Gy angegebene Tumorkontrolldosis 50 % (TCD_{50}) ist ein wichtiges, experimentell bestimmtes Maß für die Strahlensensitivität von Tumoren. Diese gibt an, wieviel Strahlenergie nötig ist, um in 50 % der Tumoren eines Probenkollektivs das Wachstum zu kontrollieren (Baumann et al., 2008). Als Nebenwirkung einer Strahlentherapie treten Schädigungen des umgebenden Normalgewebes auf, die in zwei Kategorien eingeteilt werden: Frühe Reaktionen treten in Geweben mit hohen Zellteilungsraten, z. B. Haut und Schleimhäuten auf, während späte Reaktionen in Geweben mit einer langsamen Zellerneuerung, z. B. der Niere beobachtet werden (Wilson, 2007). Meistens sind die späten Normalgewebsreaktionen, die frühestens 3 Monate nach der Bestrahlung auftreten, der limitierende Faktor für die in einer Strahlentherapie einsetzbare Energiedosis (Hill and Bristow, 2005). Um die für eine Tumorkontrolle nötige Energiedosis zu applizieren, aber das umliegende Normalgewebe bestmöglich zu schonen, werden Strahlentherapien fraktioniert durchgeführt. Bei einer konventionellen, klinische Strahlentherapie werden Patienten mit 1,5 bis 2 Gy an fünf Tagen in der Woche über einen Zeitraum von bis zu acht Wochen bestrahlt (Pötter et al., 2010).

Im Gegensatz zur Chirurgie und Strahlentherapie, deren Wirkung genau lokalisiert ist, werden bei Chemotherapien verschiedene Zytostatika systemisch eingesetzt, um nicht nur den Primärtumor, sondern auch ausgewanderte Tumorzellen und Metastasen zu behandeln (Schütte and Bath, 2010). Häufig werden in der Behandlung von Krebspatienten auch Kombinationen von Operation, Strahlen- und Chemotherapie eingesetzt.

Neben den gerade erläuterten, klassischen Behandlungen werden mittlerweile verstärkt Therapieansätze erforscht und zum Teil bereits in der Klinik eingesetzt, die die Tumorzellen gezielter angreifen sollen, sogenannte Targeted Therapies. Dazu zählen etwa die Gabe von monoklonalen Antikörpern und verschiedene andere Immuntherapien.

Auch der gegenüber Normalgeweben veränderte Glukosemetabolismus von Tumorzellen wird in den letzten Jahren zunehmend als Angriffsfläche für verschiedene neue Therapieansätze erkannt. In zahlreichen Studien wird sowohl die indirekte Hemmung des Stoffwechsel durch den Eingriff in Signalwege als auch die direkte Manipulation von metabolischen Enzymen untersucht (Sattler et al., 2010a; Tennant et al., 2010).

Mit einigen Stoffwechsellinhibitoren wurden in präklinischen Studien in den letzten Jahren beachtliche Erfolge erzielt: Dichloressigsäure (DCA) ist ein 150 Da kleines Molekül, das die mitochondriale Pyruvatdehydrogenase-Kinase inhibiert und damit zu einer Verringerung der Glykolyse und einer gesteigerten oxydativen Phosphorylierung führt (Stacpoole et al., 2003). Bonnet et al. (2007) erreichten durch die Gabe von DCA im Trinkwasser von Ratten ein signifikant verzögertes Tumorwachstum sowie eine verminderte Proliferation und gesteigerte Apoptose. α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (CHC) ist ein Inhibitor des Monocarboxylattransporters-1. Sonveaux et al. erzielten durch die Injektion von CHC eine Verzögerung des Tumorwachstums und eine Strahlensensibilisierung in Mäusen (Sonveaux et al., 2008). 3-Brompyruvat (3-BrPA) ist ein Inhibitor der Hexokinase II und damit der Glykolyse (Xu et al., 2005). In einer Studie von Ko et al. konnte in 19 Ratten eine vollständige Rückbildung von Xenografts aus hepatozellulären Karzinomzellen beobachtet werden (2004). Die direkte Wirkung dieser Inhibitoren auf den Tumorstoffwechsel und die Erfolge bei der Tumorbehandlung lassen diese Inhibitoren sowohl für die Grundlagenforschung, als auch für die klinische Anwendung interessant erscheinen.

Ist eine kurative Krebsbehandlung erfolglos oder nicht möglich, wird mit einer Palliativtherapie versucht, Krankheitssymptome zu lindern und die Lebensqualität des Patienten so lange wie möglich aufrecht zu erhalten (Hanekop et al., 2010). Im Jahr 2008 starben in Deutschland 216.000 Menschen an Krebs, was einem Viertel aller Todesfälle entspricht. Damit ist Krebs nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache insgesamt und bei Personen zwischen 40 und 60 Jahren sogar die häufigste Ursache (Statistisches Bundesamt, 2010).

2.6 Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereichs

Als Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (engl. head and neck squamous-cell carcinoma, HNSCC) werden Krebserkrankung des Oropharynx, der Mundhöhle, des Hypopharynx und des Larynx zusammengefasst. Jährlich wird diese Krankheit weltweit bei etwa einer halben Million Menschen diagnostiziert (Haddad and Shin, 2008). Die größten Risikofaktoren für die Entstehung sind Tabak- und Alkoholkonsum (Pfeifer et al., 2006). Allerdings wird zunehmend auch eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) als Auslöser für die Krebsentstehung erkannt. In verschiedenen Studien wurde in 40 – 60 % der HNSCCs des Oropharynx dieses Virus nachgewiesen (Fakhry et al., 2008). Da die Patienten dieser Gruppe ein verbessertes Gesamtüberleben gegenüber Patienten mit HPV-negativem Befund hatten, löst eine HPV-Infektion wahrscheinlich eine Krebserkrankung aus, die sich grundlegend von der durch Tabakkonsum verursachten unterscheidet (Ragin and Taioli, 2007). Insgesamt liegt jedoch das altersbereinigte 5-Jahres-Überleben nur bei etwa 50 % und ist seit mehreren Jahrzehnten nahezu unverändert (Brockton et al., 2011). Neben der chirurgischen Entfernung ist die Strahlentherapie die wichtigste Therapieform für frühe Stadien und lokal fortgeschrittene Kopf-Hals-Tumoren, meist in Kombination mit einer Operation oder Chemotherapie (Mazeron et al., 2009). Das Standardschema zur fraktionierten Röntgentherapie von Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs beträgt eine Gesamtdosis von 66 bis 72 Gy mit Einzeldosen von 2 Gy an fünf Tagen in der Woche (Pfeifer et al., 2006)

2.7 Aufgaben und Ziele

Im Fokus der vorliegenden Doktorarbeit standen drei Schwerpunkte: 1. Die Etablierung und Validierung eines neu angeschafften digitalen Kamerasystems und damit einhergehend eine Optimierung des Enzymmixes für die Biolumineszenzmessungen und der zeitintensiven Auswertung. 2. Die erneute Messung einiger Tumorlinien im Rahmen eines DFG-geförderten Projektes zur Erforschung des Zusammenhanges von Tumormilieu und Strahlentherapie. Mit dieser Studie sollte die zentrale Frage beantwortet werden, ob verschiedene Aspekte des Tumormilieus vor Beginn einer fraktionierten Strahlentherapie als prognostischer Marker für deren Erfolg verwendet werden könnten. 3. Die Charakterisierung des Tumorstoffwechsels im Verlauf einer fraktionierten Strahlentherapie, die Aufschluss darüber geben soll, inwieweit der Stoffwechsel und insbesondere der Laktatgehalt in soliden Tumoren durch eine

Röntgentherapie beeinflusst werden, was Anhaltspunkte für eine verbesserte Tumorthherapie bieten könnte.

Darüber hinaus wurden einige Aspekte untersucht, die vor allem klinische Relevanz besitzen. Die Quantifizierung des Laktatgehaltes in Nadelbiopsieschnitten stellt eine erstrebenswerte methodische Erweiterung der Biolumineszenzmethode dar, um Tumoren vor der Behandlung zu klassifizieren und den Erfolg verschiedener Therapieansätze abzuschätzen. Ein ähnliches Ziel verfolgt der Ansatz, den Laktatgehalt in soliden Tumoren *in vivo* mittels MRT nachzuweisen. Verfahren zum Nachweis von Laktat mittels Magnetresonanz werden von verschiedenen Arbeitsgruppen weltweit angewandt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch das in Würzburg entwickelte Magnetresonanztomographie-Verfahren in einer gepaarten Studie mit dem Ergebnissen und der prognostischen Aussage der bildgebenden Biolumineszenz verglichen werden.

In einem letzten Schritt sollten die Möglichkeiten zur Stoffwechsel-Intervention ausgetestet werden. Dazu sollte mittels bildgebender Biolumineszenz der Einfluss von drei Stoffwechselmanipulatoren DCA, CHC und BrPA, die aufgrund aktueller Literatur vielversprechend erscheinen, auf den ATP- und Laktatgehalt behandelter Xenograft-Tumoren untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Tumormaterial

Alle Untersuchungen in dieser Arbeit wurden im Rahmen eines DFG-geförderten Forschungsprojektes durchgeführt, das seit 2003 besteht und Forschungsvorhaben aus Arbeitsgruppen aus Dresden, Würzburg, München und Mainz bündelt (Zips et al., 2004). Das in dieser Arbeit verwendete Tumormaterial und die Zellkulturlinien wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Baumann in Dresden zur Verfügung gestellt. Ausgangspunkt waren die zehn Plattenepithelkarzinom-Zelllinien UT-SCC 5, UT-SCC 8, UT-SCC 14, UT-SCC 15, UT-SCC 45, FaDu, HSC4, CAL33, SAS und XF354. Details zur Herkunft dieser Zelllinien und zu ihren strahlenbiologischen Eigenschaften wurden publiziert von Yaromina et al. (2007; 2010; 2006).

Für alle *in vivo*-Experimente wurden 7-14 Wochen alte, weibliche und männliche NMRI (nu/nu) Mäuse aus der spezifisch-pathogenfreien Zucht des Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät der TU Dresden verwendet. Alle Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Dresden genehmigt. Die Mäuse wurden bei einer Raumtemperatur von 26°C und 50-60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Zur weiteren Immunsuppression wurden die Tiere zwei Tage vor der Tumortransplantation mit 4 Gy (200kV Röntgenstrahlung, 0.5mm Cu, 1.2 Gy/min) ganzkörper-bestrahlt. Zur Erzeugung der Xenografts wurden zunächst je 10^7 Zellen einer der 10 Linien in die Achselhöhle dreier Tiere injiziert. Der sich bildende Tumor mit medianer Wachstumsgeschwindigkeit wurde in kleine Stücke zerteilt, die 15 Mäusen subkutan auf den Rücken transplantiert wurden. Von Tumoren dieser Passage, die eine mittlere Wachstumsgeschwindigkeit aufwiesen, wurden kleine Tumorstücke in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für alle weiteren Experimente wurden diese kryokonservierten Tumorstücke subkutan auf den Mäuserücken transplantiert. Zur Erhöhung der Tumorausbeute wurden jeweils Stücke von Tumoren mit typischer Verdopplungszeit seriell auf 10 weiteren Mäuserücken transplantiert. Tumoren mit extrem kurzen oder langen Verdopplungszeiten wurden nicht weiter verwendet. Die übrigen Tumoren dieser Passage wurden in Stücke mit einer Kantenlänge von 1 bis 2 mm zerteilt und subkutan auf das Hinterbein der Versuchstiere transplantiert.

Ab einem Durchmesser von 4 mm wurden Tumoren der Linie UT-SCC 5 und FaDu für die Inhibitionsexperimente mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt. Für die

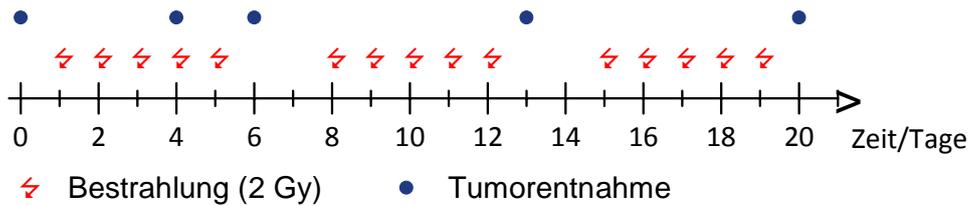


Abb. 2: Schema der fraktionierten Bestrahlung für Tumoren der Linien UT-SCC 5 und UT-SCC 14.

Studie aller 10 HNSCC-Linien wurden Tumoren ab einem Durchmesser von 7 mm verwendet. Ebenfalls ab einem Durchmesser von 7 mm wurden Tumoren der Linien UT-SCC 5 und UT-SCC 14 für die Studie zur Untersuchung des Einflusses einer fraktionierten Strahlentherapie auf das Tumorstoffwechsellmilieu herangezogen. Dazu wurden die Tumoren einem klinischen Fraktionierungsschema entsprechend an fünf Tagen in der Woche mit je 2 Gy bestrahlt. Je 10-12 Tiere erhielten 3, 5, 10 oder 15 Fraktionen über einen Zeitraum von bis zu drei Wochen. Als Kontrolle dienten 11 bzw. 12 unbestrahlte Tumoren. Ein Schema zum Ablauf dieses Bestrahlungsexperimentes ist in Abb. 2 dargestellt. Zur Bestrahlung mit einer 200kV Röntgenröhre wurden die Tiere in einem Plastikröhrchen immobilisiert und das tumortragende Hinterbein mit einer gepolsterten, Blei-ummantelten Fußklemme im Bestrahlungsfeld fixiert. Zu Beginn des Experimentes (Kontrolle) oder 24 h nach der letzten Bestrahlung wurden die Tumoren entnommen, in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei -20° C gelagert.

Die weitere Verarbeitung der Tumoren erfolgte ebenfalls in Dresden. Die Tumoren wurden zunächst geteilt und eine oder beide Tumorkappen zur Extraktion von mRNA und Protein nach München bzw. Mainz gesendet. Das mittlere Tumorstück wurde mit TissueTek (Hartenstein, Würzburg), aufgeblockt und mit einer Biopsiegabel mit zwei parallelen Stanzlöchern mit einem Abstand von 2 mm versehen. Dann wurde an einem Gefriermikrotom (HM 500 OM, Microm, Walldorf) nach einem festen Protokoll parallele Kryoschnitte für die (Immun-)Histochemie und Biolumineszenz angefertigt. Ein festgelegtes Schneidprotokoll bestimmte die Reihenfolge, in der die verschiedenen Schnitte für die Arbeitsgruppen in Dresden, München und Mainz aufgenommen wurden. Besonders berücksichtigt wurde, dass die Schnitte für die Biolumineszenz und die zur Auswertung benötigten immunhistologischen Schnitte aufeinander folgten. Je nach Fragestellung wurde diese Schnittabfolge unterschiedlich oft wiederholt und der Tumor so in Segmente unterteilt. Für die Studie mit fraktioniert bestrahlten Tumoren der Linien UT-SCC 5 und UT-SCC 14 wurden jeweils 4 normale Segmente geschnitten. Das letzte,

fünfte Segment enthielt zwei Schnitte für die CD45 Färbung und einen Schnitt für die Negativkontrolle der Cytokeratinfärbung.

Für die erste Studie an 10 humanen HNSCC-Linien wurden pro Tumor 5 oder 7 Segmente geschnitten. Die Alterung des Kamerasystems für die Biolumineszenz erforderte jedoch die erneute Messung von ATP, Laktat und Pyruvat in den drei Tumorklinen HSC4, UT-SCC 8 und UT-SCC 45 im Rahmen dieser Arbeit. Dazu wurden die Tumorreststücke erneut aufgeblickt und je drei Segmente nach einem verkürzten Schneidprotokoll geschnitten, das neben den Biolumineszenzschnitten jeweils nur einen Schnitt für eine Strukturfärbung beinhaltete.

Innerhalb eines jeden Segmentes wurden für die Immunhistologie 10 µm dicke Schnitte auf Superfrost plus Objektträger aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Für die Biolumineszenz wurden 16 bzw. 20 µm dicken Schnitte auf Deckgläschen aufgenommen und bei 100° C für 10 min hitzefixiert um alle im Schnitt enthaltenen Enzyme zu inaktivieren. Nur die Schnitte für die Glukose-Biolumineszenz wurden nicht hitzefixiert sondern nur durch sehr kurzes Antauen auf den Deckgläschen fixiert. Anschließend wurden alle Schnitte sofort tiefgefroren und bei -20° C gelagert, der Versandt des Tumormaterials nach München und Mainz erfolgte auf Trockeneis.

3.2 Biolumineszenz

Die Methode der bildgebenden Biolumineszenz wurde in den 1980er Jahre von W. Paschen zur Untersuchung des Stoffwechsel in Gehirn-Präparaten entwickelt. In diesen Versuchen wurden gefrorene Gewebe- und Enzymmix-Schnitte verwendet, die aufeinander gelegt und schnell zusammen aufgetaut wurden. Das während der Reaktion abgegebene Lichtsignal wurde auf Film aufgezeichnet. So konnten zunächst ATP und Glukose semiquantitativ nachgewiesen werden (Paschen et al., 1981). Wenige Jahre später wurde ein Nachweis für Laktat publiziert (Paschen, 1985). Durch die Korrelation einer densitometrische Auswertung der Biolumineszenzaufnahmen mit an Gewebeproben des gleichen Areal vorgenommen Gehaltsbestimmungen konnte außerdem ein Regressionskoeffizient bestimmt werden, der eine quantitative Auswertung der Glukose- und Laktataufnahmen erlaubte (Paschen, 1985; Paschen et al., 1985).

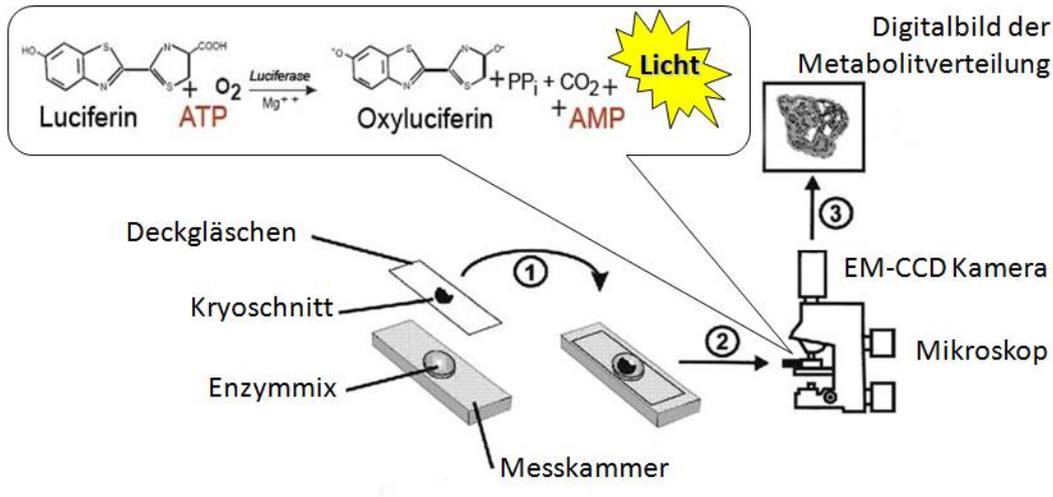


Abb. 3: Biolumineszenz-Messaufbau und Reaktionsgleichung für die Luciferase-katalysierte Lichtreaktion zur ATP-Messung.

In unserer Arbeitsgruppe wurde dieser methodische Ansatz zur Messung von Tumorschnitten verwendet und schrittweise optimiert. So wurde ein Versuchsaufbau etabliert, bei dem die Reaktion in einer thermostatisierten Kammer unter einem Mikroskop abläuft und das dabei ausgesendete Licht mit einer lichtsensitiven Videokamera aufgezeichnet wird. Durch die Schaffung konstanter Reaktionsbedingungen und das Mitführen von Standardschnitten bekannter Konzentration konnte so eine absolute Quantifizierung der ATP- Glukose- und Laktatgehalte erzielt werden (Mueller-Klieser and Walenta, 1993). Ein Pyruvat-Nachweis ermöglicht die Berechnung und optische Darstellung des Verhältnisses von Laktat zu Pyruvat, was Aufschluss über den Redoxstatus verschiedener Gewebe bietet (Sattler et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das bisherige Hamamatsu-System mit Wasabi-Software durch eine rückwärtig belichtete EM-CCD Kamera mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln von Andor (iXon IQ DU-888) und die Andor iQ-Software ersetzt. Der übrige Messaufbau wurde übernommen, d.h. die Messkammer mit aufgelegtem Schnitt wird in eine auf 20 °C thermostatisierte Messingkammer eingeschoben, die im Strahlengang eines Zeiss Axiophot Mikroskop montiert ist. Auf das Mikroskop ist die EM-CCD Kamera aufgesetzt, für Durchlichtbilder wird die Beleuchtung des Mikroskops eingeschaltet, für Biolumineszenzaufnahmen wird die Beleuchtungsquelle mit einer schwarzen Kunststoffscheibe verschlossen. Kamera und Mikroskop sind in einem ventilierten Schrank untergebracht, so dass kein Licht von außen die Aufnahmen stört, die Kühlung der Kamera aber gewährleistet ist. Um möglichst konstante

Reaktionsbedingungen zu schaffen, werden Schrank und Raum für Messungen auf 21 °C klimatisiert.

3.2.1 ATP

Die Messung des ATP-Gehaltes in Kryoschnitten basiert auf dem Luciferase-Enzym aus *Photinus pyralis*, einer amerikanischen Leuchtkäfer-Art. Dieses Enzym oxidiert unter Sauerstoff- und ATP-Verbrauch D-Luciferin zu Oxyluciferin, wobei Licht ausgestrahlt wird (Abb. 3). Die Quantenausbeute der Reaktion beträgt 40 %, das Maximum des Emissionsspektrums liegt bei einem pH-Wert von 7-8 bei 562 nm (Fraga, 2008).

Die Enzymlösung zur ATP-Messung wird aus gefriergetrockneten Abdomen der Feuerfliege hergestellt, was den Vorteil hat, dass D-Luciferin und Luciferase bereits im idealen Mischungsverhältnis vorliegen. Dazu werden zunächst 5 g getrocknete Abdomen (firefly lanterns) in einem auf Eis vorgekühlten Mörser portionsweise zerrieben. Das Pulver wird mit 100 ml 0,2 M HEPES-Puffer mit 0,1 M Natrium-Arsenat (pH 7,6) vermischt, dann werden je ca. 10-15 ml der Suspension mit einem Homogenisator weiter bearbeitet. Anschließend wird die Suspension für 10 min bei 2000 U/min und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit 200 µl 1 M MgCl₂ versetzt. Die fertige Enzymlösung wird aliquotiert und bei -80° C eingefroren.

Für ATP-Messungen wird jeweils ein Aliquot rasch in der Hand aufgetaut und für 12 sec in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Enzymmix vor jeder Messung durch zweifaches Invertieren gemischt.

Der Ablauf einer Biolumineszenzmessung ist folgender: Der auf einem Deckgläschen aufgenommene, zu messende Schnitt wird aus -20 °C für einen kurzen Moment auf eine etwa 100 °C warme Heizplatte gelegt, um Kondenswasser zu entfernen. Das Deckgläschen wird auf die Messkammer aufgelegt, so dass sich der Schnitt über der Vertiefung für den Enzymmix befindet und mit einem kleinen Stück Klebeband befestigt. Dann wird das Deckgläschen ein Stück weit angehoben und 60 µl Enzymmix in die Vertiefung pipettiert. Zeitgleich mit dem Absenken des Schnittes in die Reaktionslösung wird ein Countdown von 10-30 s gestartet, die Messkammer wird unter dem Mikroskop platziert und mit dem Ertönen des Signals die Bildaufnahme in AndorIQ gestartet. Für normale Biolumineszenzmessungen wurde eine Einzelaufnahme gemacht, für kinetische Messungen wurden Serienaufnahmen durchgeführt.

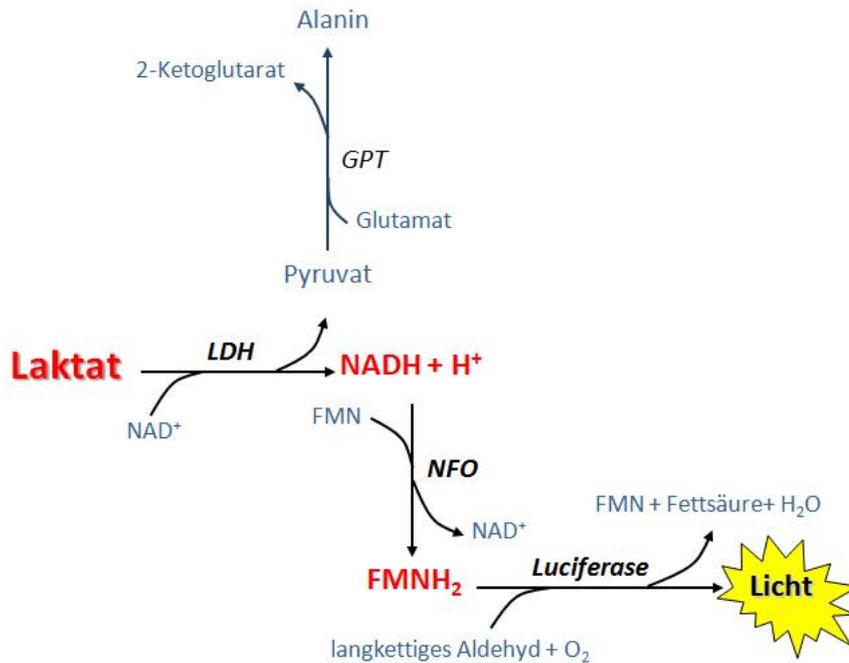


Abb. 4: Reaktionsschema der Biolumineszenz-Laktatmessung. LDH: Laktatdehydrogenase GPT: Glutamat-Pyruvate-Transaminase, NFO: NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase .

3.2.2 Laktat

Laktat wird von der LDH zu Pyruvat umgesetzt. Das dabei gebildete NADH wird von der NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase zur Reduktion von FMN zu FMNH₂ genutzt. Im letzten Reaktionsschritt wird FMNH₂ zusammen mit einem langkettigen Aldehyd unter Sauerstoffverbrauch oxidiert. Die Quantenausbeute dieser Lichtreaktion beträgt 10 - 30 % und das Emissionsmaximum liegt bei 493 nm. Um zu verhindern, dass das gebildete Pyruvat in der von der LDH bevorzugten Reaktion in Laktat zurückgewandelt wird, werden dem Enzymmix zusätzlich das Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Glutamat zugesetzt, so dass Pyruvat umgehend in Alanin überführt wird. Einen Überblick über die Reaktionen zum Nachweis des Laktatgehaltes in Kryoschnitten ist in Abb. 4 dargestellt.

3.2.3 Glukose

Glukose wird durch die Hexokinase (HK) unter ATP-Verbrauch in Glukose-6-Phosphat überführt, das durch die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase in 6-Phospho-Glukonolakton umgewandelt wird. Das in dieser Reaktion gebildete NADPH wird analog zur Laktatreaktion von der NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase zur Reduktion von FMN zu FMNH₂ eingesetzt. Im letzten Reaktionsschritt wird FMNH₂ zusammen mit einem

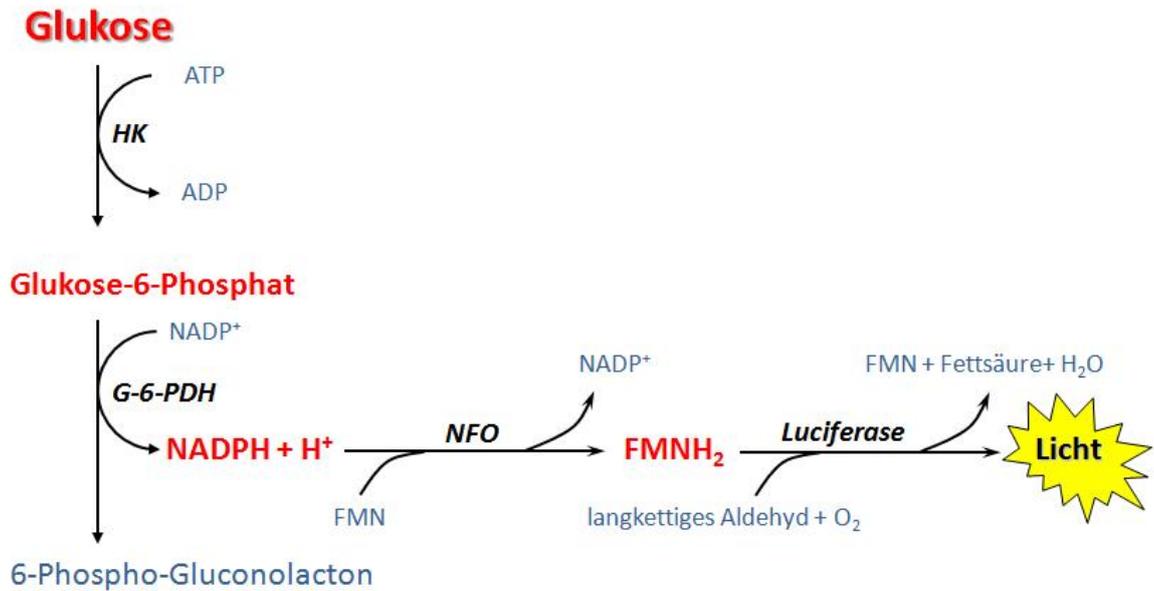


Abb. 5: Reaktionsschema der Biolumineszenz-Glukosemessung. HK: Hexokinase, G-6-PDH: Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, NFO: NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase .

langkettigen Aldehyd unter Sauerstoffverbrauch oxidiert. Das Reaktionsschema des mittels Biolumineszenz durchgeführten Glukosenachweis ist in Abb. 5 dargestellt.

3.2.4 Standards

Zur Herstellung von Laktatstandards wurden 7,5 g Polyvinylalkohol und 3,75 g Polyethylenglycol in 50 ml 0,1 M Phosphatpuffer eingerührt. Von dieser viskosen Lösung wurden je 3 ml mit je 1 ml verschiedener Laktatstammmlösung (0 bis 200 mmolar) gründlich verrührt. Die resultierenden Laktatlösungen mit Konzentrationen zwischen 0 und 50 mmol/g wurden entweder zur späteren Verwendung bei -20 °C eingefroren oder gleich im Kryotom geschnitten. Dazu wurden ca. 80 µl auf ein auf unter -20 °C vorgekühltes Schnittblöckchen getropft und erstarren lassen. Im Kryotom wurden 16 µm dicke Schnitte angefertigt, auf vorgekühlte Deckgläschen aufgenommen, kurz durch Antauen fixiert und sofort wieder eingefroren. Durch ca. 14tägiges Einfrieren bei -20 °C wurden die Schnitte getrocknet. Um den Laktatgehalt der selbst angesetzten Standards zu überprüfen, wurde die Laktatkonzentration der 4fach konzentrierten Lösungen photometrisch mit dem L-Laktat Kit von r-Biopharm bestimmt (Details s. 3.4.2), zur Auswertung der Biolumineszenz wurden die so bestimmten exakten Konzentrationen verwendet.

Standards für die ATP- und Glukosemessungen wurden auf gleiche Weise angefertigt, bei ATP-Standards wurde allerdings ein 0,2 M Hepespuffer verwendet. Alternativ

wurden die verschieden konzentrierten Metabolit-Stammlösungen in TissueTek eingerührt.

3.2.5 Optimierung und Validierung der Laktatmessung

Ausgangspunkt für die Optimierung der Laktatmessung war die Zusammensetzung des Enzymmixes, wie er für die letzten Experimente vor der Anschaffung einer neuen Kamera angesetzt wurde. In diesem Enzymmix lagen einige Bestandteile in höheren Konzentrationen vor als in publizierten Ansatzprotokollen (Quennet, 2007). Ausgehend von diesem zuletzt verwendeten Enzymmix zur Laktatmessung wurden zunächst Verdünnungsexperimente durchgeführt. Dazu wurde ein Enzymmix hergestellt wie publiziert und eingefroren. Für die Messungen, die mit dem Hamamatsu-System durchgeführt wurden, wurde jeweils ein Aliquot des Enzymmixes aufgetaut und mit 0,1 M Phosphatpuffer in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Aus der experimentell ausgetesteten besten Verdünnung wurde die neue Konzentration aller Bestandteile berechnet. Eine Übersicht der publizierten, zuletzt verwendeten und neu berechneten Konzentrationen der Bestandteile des Enzymmixes gibt Tab. 1.

Ausgehend von diesen Berechnungen wurde ein neues Ansatzprotokoll mit niedrigeren Konzentrationen erstellt, bei dem zunächst alle Komponenten einzeln gelöst und dann zusammenpipettiert werden. Dies ermöglicht es, einen Enzymmix für eine einzelne oder wenige Messungen herzustellen. Außerdem können, der Fragestellung entsprechend, die Endkonzentration einzelne Komponenten variiert werden.

Die einzelnen Komponenten für die Laktatmessungen wurden wie folgt angesetzt:

Tab. 1: Enzymmix-Bestandteile für die Laktatbiolumineszenz; dargestellt sind publizierte, zuletzt verwendete und nach Verdünnungsexperimenten neu berechnete Konzentrationen der Bestandteile.

Bestandteil	Publiziert	Verwendet	Berechnet
1,4-Dithiothreitol	0,5 mM	0,85 mM	0,41 mM
Natriumglutamat	50 mM	22,1 mM	35,2 mM
Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid	160 mM	247 mM	120 mM
Flavinmononukleotid	0,4 mM	0,51 mM	0,25 mM
L-Laktat Dehydrogenase	460 U/ml	393 U/ml	192 U/ml
Glutamat-Pyruvat Transaminase	67 U/ml	104 U/ml	51,2 U/ml
NAD(P)H:FMN Oxidoreduktase	8 U/ml	13 U/ml	7,2 U/ml
Luciferase	15 mU/ml	20 mU/ml	9,6 mU/ml
Decanal in Methanol	0,5 mM	12,6 mM	6,1 mM

Für eine 1,05 M Glutamatlösung wurden 0,888 g Natriumglutamat in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer gelöst und Aliquots bei -20° C eingefroren.

Für eine 502 mM Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) Lösung wurden 1 g NAD in 0,1M Phosphatpuffer gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 7 eingestellt und mit Phosphatpuffer auf 3 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde bei 4° C aufbewahrt und jeweils nur einige Tage verwendet.

FMN wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in A. dest gelöst und Aliquots bei -20° C eingefroren.

Ebenfalls bei -20° C wurden Aliquots einer 65 mM DTT-Lösung in A.dest aufbewahrt. Eine 640 mM Decanal-Lösung wurde an jedem Versuchstag frisch aus 880 µl Methanol und 120 µl Decanal angesetzt.

400 µl Glutamat-Pyruvat-Transaminase wurden für 2 min bei 10000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und anschließend in 400 µl Phosphatpuffer gelöst. Zum Lösen der Luciferase wurden zu jedem Fläschchen 1 ml A. dest gegeben. Die NAD(P)H:FMN Oxidoreduktase (NFO) wurde in 500 µl 0,1 M Phosphatpuffer mit DTT gelöst. Eine Übersicht über alle benötigten Stammlösungen und die jeweils eingesetzten Mengen pro 60 µl Messung gibt Tab. 2 wieder. Um einen kleinen Versuchsansatz für Testmessungen herzustellen wurden die Volumina mit 2,5; 5 oder 10 multipliziert und entsprechend der Reihenfolge in Tab. 2 zusammenpipettiert. Für einige Fragestellungen wurden die Konzentration von Enzymen, Coenzymen oder Substraten verändert und die Menge des zugegebenen Puffers entsprechend angepasst, um das Volumen konstant zu

Tab. 2: Enzymmix für Laktatbiolumineszenzmessungen; Angegeben ist die Konzentration der Stammlösung, das benötigte Volumen pro Messung und die Endkonzentration im angesetzten Enzymmix.

Bestandteil	Stammlösung	pro Messung	Endkonzentration
Phosphatpuffer	0,1 M	5,59 µl	40 mM
1,4-Dithiothreitol	65 mM	0,4 µl	0,4 mM
Natriumglutamat	1,05 M	2 µl	35 mM
Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid	502 mM	7,3 µl	60 mM
Flavinmononukleotid	3,9 mM	4 µl	0,25 mM
L-Laktat Dehydrogenase	3000 U/ml	4 µl	200 U/ml
Glutamat-Pyruvat Transaminase	800 U/ml	3,75 µl	50 U/ml
NAD(P)H:FMN Oxidoreduktase	40 U/ml	10,8 µl	7,2 U/ml
Luciferase	30 mU/ml	21,6 µl	10,8 mU/ml
Decanal in Methanol	640 mM	0,56 µl	6 mM

halten. Insbesondere wurde für Testmessungen entweder die Konzentration der Luciferase oder der Oxidoreduktase verändert. In einem weiteren Versuch wurde die isolierte „Lichtreaktion“ getestet, um zu ermitteln, ob endogen vorhandenes NADH die Ergebnisse der Laktatmessung verfälschen könnte. Dazu wurden nur FMN, DTT, Decanal, Oxidoreduktase und Luciferase zusammenpipettiert und das Volumen mit Phosphatpuffer auf 60 µl aufgefüllt. Dann wurde jeweils ein Kryoschnitt eines Tumors mit dem normalen und mit dem abgewandelten Enzymmix mit den gleichen Messeinstellungen gemessen.

Zum Schutz der Enzyme wurde der Mix in einem auf 21 °C klimatisierten, abgedunkelten Labor auf Eis angesetzt und aufbewahrt. Zur Messung der Tumorschnitte wurden größere Mengen des Enzymmixes, berechnet für 236 oder 440 Messungen, hergestellt, zu je 510 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Zur Durchführung der Messung wurden jeweils ein Aliquot zügig durch Erwärmen in der Hand aufgetaut, durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und umgehend mit den Messungen begonnen, wie unter 2.2.1 beschrieben.

3.2.6 Optimierung der Glukosemessung

Da sich bei der Optimierung der Laktatmessung niedrigere Gesamtkonzentrationen und ein verändertes Enzymverhältnis als vorteilhaft erwiesen, sollte auch die Zusammensetzung des Enzymmix zur Messung von Glukosegehalten überprüft werden.

Tab. 3: Enzymmix für Glukosebiolumineszenzmessungen; Angegeben ist die Konzentration der Stammlösung, das benötigte Volumen pro Messung und die Endkonzentration im angesetzten Enzymmix.

Bestandteil	Stammlösung	pro Messung	Endkonzentration
Phosphatpuffer	0,3 M	5,2 µl	120 mM
1,4-Dithiothreitol	65 mM	0,5 µl	0,54 mM
Adenosintriphosphat	0,66 mM	9,65 µl	0,11 mM
Magnesiumchlorid	1 M	0,5 µl	8,3 mM
NADP	0,41 mM	4,9 µl	0,03 mM
Flavinmononukleotid	7,8 mM	2,55 µl	0,33 mM
Hexokinase	1500 U/ml	1,9 µl	47,5 U/ml
Glukose-6-phosphatdehydrogenase	1000 U/ml	1,9 µl	31,7 U/ml
NAD(P)H:FMN Oxidoreduktase	40 U/ml	6,4 µl	4,3 U/ml
Luciferase	30 mU/ml	25,7 µl	12,9 mU/ml
Decanal in Methanol	640 mM	0,8 µl	8,53 mM

Dazu mussten, analog zum Laktatenzymmix, neue Ansatzprotokolle erstellt werden. Einige für die Glukosemessung benötigten Lösungen sind auch Bestandteil des Laktatkits. $MgCl_2$, DTT Decanal, Luciferase und Oxidoreduktase wurden angesetzt wie unter 3.2.5 beschrieben.

1,2 g ATP wurden in 1 ml 0.3 M Phosphatpuffer und 1 ml $NaHCO_2$ gelöst, der pH-Wert mit 300 μ l 5 M NaOH auf 7 eingestellt und das Volumen mit 0.3 M Phosphatpuffer auf 3 ml aufgefüllt.

1 g NADP wurden mit 2 ml 0.3 M Phosphatpuffer gelöst, der pH-Wert mit 250 μ l 5 M NaOH auf 7 eingestellt und das Volumen mit 0.3 M Phosphatpuffer auf 3 ml aufgefüllt.

Je 600 μ l Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Isomerase wurden abzentrifugiert und das Pellet in je 600 μ l 0,3 M Phosphatpuffer resuspendiert.

Ausgangspunkt für die Glukosemessungen war der in Tab. 3. aufgelistete Enzymmix. Für Testmessungen wurden Luciferase- und Oxidoreduktasekonzentrationen verändert sowie verschiedene Verdünnungen des Enzymmixes hergestellt.

3.2.7 Auswertung

Zur Erstellung einer Kalibrierungskurve wurde in Andor iQ eine Maske in die Graustufenaufnahme eines Standardschnittes eingezeichnet, die den größten Flächenanteil des gemessenen Standards beinhaltet. Lediglich der Randbereich und eventuell vorhandene Risse, Überlappungen und Luftblasen wurden ausgeschlossen. Mit Andor iQ wurde die durchschnittliche Lichtintensität \pm Standardabweichung sowie die maximale Lichtintensität bestimmt. Die Daten wurden in Excel kopiert und graphisch gegen den bekannten Laktatgehalt der Standards aufgetragen. Nach der Messung und Auswertung aller Standards wurde ein Box-Lucas Fit berechnet. Zur Auswertung der Tumorschnitte wurde in Photoshop eine Überlagerung erstellt und eine Maske für vitales Tumorgewebe gezeichnet.

Das Biolumineszenzbild mit der überlagerten Maske des auszuwertenden Bereiches wurden für alle Messungen der Linien UT-SCC 8, HSC4 und CAL33 sowie die ATP-Messungen der fraktioniert bestrahlten UT-SCC 14 Tumoren in Andor iQ importiert und manuell mit dem Werkzeug zur Erstellung von Auswertebereichen umfahren. Diese nachgezeichnete Maske konnte dann auf die Biolumineszenzaufnahme übertragen und die durchschnittliche und maximale Lichtintensität im vitalen Tumorgewebe bestimmt werden.

Für die Laktatauswertung der UT-SCC 14 Tumoren sowie die ATP und Laktatmessungen der Linie UT-SCC 5 wurde eine ImageJ basierte, halbautomatische

Auswertung verwendet, die in Zusammenarbeit mit dem Institut für Informatik der Johannes Gutenberg-Universität entwickelt wurde. J. Osthof und Prof. Dr. E. Schömer aus der Bioinformatik erarbeiteten das neue PlugIn „Tumor statistics“ für ImageJ, das die automatische Auswertung der in Photoshop erstellten Masken ermöglicht. Das PlugIn überträgt die exakte Position und Größe der Maske des vitalen Tumorgewebes auf das zugehörige 16-bit Biolumineszenzbild und berechnet die durchschnittliche Lichtintensität innerhalb des Areals sowie deren Standardabweichung. Außerdem werden die minimale und die maximale Lichtintensität des eingeschlossenen Bereichs, sowie dessen Größe ermittelt. Zur fehlerfreien Erkennung des auszuwertenden Bereiches ist es notwendig, das vitale Tumorgewebe durch eine geschlossene Linie zu umranden, auch Bereiche im Tumor, die von der Auswertung ausgenommen werden sollen, müssen durch eine in sich geschlossene Linie markiert werden. Um zu überprüfen, ob die manuell in AndorIQ und die halbautomatische Auswertung durch ImageJ die gleichen Ergebnisse liefern, wurden mehrfach Tumorschnitte mit beiden Verfahren ausgewertet.

3.2.8 Biolumineszenzmessung von Tumorschnitten

Zu Beginn jedes Messtages wurden Standardschnitte gemessen und überprüft, ob die resultierenden Lichtintensitäten zur zuletzt verwendeten Kalibrierungskurve passen. War dies der Fall, wurden Tumorschnitte gemessen. Wichen die Lichtintensitäten zu stark von vorherigen Messergebnissen ab, wurde eine neue Kalibrierungskurve erstellt und für die Ermittlung der Metabolitgehalte herangezogen. Bei einer neuen Kalibrierung für Laktatmessungen wurde außerdem eine vergleichende Tumormessung durchgeführt, d.h. es wurde ein Schnitt des FaDu Tumors #51 gemessen und ausgewertet, um die Konsistenz der Messergebnisse zu gewährleisten.

Vor und direkt nach der Metabolitmessung wurden von jedem Tumorschnitt Durchlichtbilder angefertigt, um die Position des Schnittes innerhalb der Messkammer und eventuelle Risse, Überlappungen und Luftblasen lokalisieren zu können. Beide Durchlichtbilder und die Biolumineszenzaufnahme wurden für die spätere Photoshop-Überlagerung als 8bit Bilder gespeichert, die Biolumineszenzaufnahme zur Ermittlung der Lichtintensitäten zusätzlich als unverändertes 16-bit Bild.

In Photoshop CS3 wurde zunächst ein Bildstapel aus dem ersten Durchlichtbild, der dazugehörigen ATP-Biolumineszenzmessung und dem Foto des HE-Schnittes erstellt und anhand der Stanzlöcher und Umrisse exakt überlagert. Anhand des HE- und Durchlichtbildes wurde eine Maske für vitales Tumorgewebe gezeichnet, mit der ATP-

Aufnahme abgeglichen und zur späteren Auswertung in ImageJ als ATP-Maske abgespeichert. Dann wurde die Maske an das Laktatdurchlichtbild angepasst und als Laktatmaske abgespeichert. Für die Tumoren der fraktionierten Bestrahlungsstudie wurde zusätzlich für je ein Tumorsegment ein Anti-Cytokeratin gefärbter Schnitt angefertigt und in die Überlagerung integriert, um eine schnelle und sichere Erkennung des Tumorgewebes zu ermöglichen.

Die Ermittlung der mittleren Lichtintensität erfolgte für die Schnitte der Tumorkolonien UT-SCC 8, HSC4 und UT-SCC 45 aus der ersten Studienphase, sowie für die ATP-Messungen der Linie UT-SCC 14 aus der zweiten Projektphase manuell in AndorIQ. Für alle später gemessenen Tumorschnitte wurde in ImageJ jeweils das 16 bit-Bild der Biolumineszenzmessung und die korrespondierende Maske geöffnet und durch das eigens zu diesem Zweck programmierte Plugin „Tumor statistics“ automatisiert ausgewertet (s. 3.2.7).

3.2.9 Falschfarbenkalibrierung

Zur Erstellung falschfarbenkalibrierter Bilder wurde das Maximum eines 16 bit Biolumineszenzbildes in ImageJ ermittelt und in ein Excelsheet eingefügt und daraus zusammen mit den eingegebenen Kalibrierungsdaten das 8bit-Graustufenhistogramm sowie die Unterteilung in Gehaltsstufen berechnet. Die Zuordnung der Farbinformation zu 8bit-Graustufen wurde als .txt File abgespeichert und in ImageJ mit Hilfe des LUT-Importers auf das in 8bit konvertierte Biolumineszenzbild übertragen. Die Nachbearbeitung (Retuschieren des Messkammerrandes, Übertragen der zur Auswertung verwendeten Masken etc.) der falschfarbenkalibrierten Bilder erfolgte in Photoshop CS3.

3.2.10 Photometrische Vergleichsmessung

Für einen Vergleich der mittels bildgebender Biolumineszenz erhaltenen Laktatwerte in Kryoschnitten mit dem Laktatgehalt größerer Tumorschnitte wurden einige Testtumoren der Linien FaDu, UT-SCC 15, UT-SCC 5, HSC4, CAL-33, UT-SCC 8 und UT-SCC 14 bei -20°C halbiert. Aus einer Hälfte wurden 16 µm dicke Biolumineszenz-Schnitte und 10µm dicke Schnitte für die Histologie angefertigt. Die andere Hälfte wurde gewogen und anschließend für 96 h bei -20°C im Vakuum lyophilisiert. Die getrockneten Tumorstücke wurden erneut gewogen, um den Wasserverlust zu bestimmen, anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff in 15 ml Falcons mit einem vorgekühlte Pistil gemörsert. Das Pulver wurde in 500 µl 0,33 M Perchlorsäure suspendiert und je drei mal 10 sec

sonifiziert. Im Anschluß wurde für 10 min bei 11.000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der klare Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Messung bei -80° C gelagert. Die Laktatbestimmung in den Tumorlysaten erfolgte, analog zur Messung des Laktats in Zellkulturüberständen (s. 3.4.2), mit dem Laktatkit von r-Biopharm.

3.3 Histochemie und Immunhistochemie

3.3.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Die Hämatoxylin und Eosin Färbung (HE-Färbung) ist eine Übersichtsfärbung zur Unterscheidung verschiedener Zell- und Gewebetypen, in der Zellkerne blau und Zytoplasma rosa gefärbt werden. Sie erlaubt unter anderem eine deutliche Unterscheidung von Muskel- und Bindegewebe. Deshalb wurde für jedes Tumorsegment, dass in der Biolumineszenz analysiert werden sollte, auch eine HE-Färbung angefertigt. Zu Beginn wurden die Kryoschnitte aufgetaut, 5 min in Acteon fixiert und getrocknet. Die eigentliche Färbung erfolgte nach einem Standard-Protokoll und die Schnitte wurden dauerhaft mit Roti-Histokit II eingedeckt. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte unter einem Mikroskop (Zeiss Axiophot 1) mit 1,25 facher Vergrößerung mit einer digitalen Spiegelreflexkamera abfotografiert.

3.3.2 Cytokeratinfärbung

Zur Unterscheidung des humane Tumorgewebes epithelialen Ursprungs vom umliegenden Mausgewebe in den Xenograftschnitten der fraktionierten Bestrahlungsstudie wurde eine Cytokeratinfärbung etabliert. Diese Färbung erwies sich zunächst als problematisch, da spezifische Antikörper gegen humanes Cytokeratin nur in Mäusen hergestellt werden. Dies führt bei Xenograftschnitten zur vollständigen Färbung des gesamten Schnittes, wenn nach einem Standardprotokoll gefärbt wird. Deshalb wurden zunächst verschiedene Varianten der Färbung an Zellkulturpräparaten getestet, bei denen der Sekundärantikörper an den Primärantikörper gebunden wird, bevor die Inkubation auf dem Schnitt erfolgt. Dieses Prinzip wurde vorgestellt von Kawasaki et al. (1997) und ist mittlerweile auch als kommerzielles Kit von Dako erhältlich. Dieses ARK (Animal-Research-Kit) Peroxidase (Dako) wurde in Kombination mit dem Primärantikörper Maus anti-human Cytokeratin AE1/AE3 (Dako) in Tests mit Präparaten

humaner und muriner Zellen verwendet. Dazu wurden die mit EMT6 und FaDu Zellen bewachsenen, Aceton-fixierten Objektträger in PBS rehydriert und dann den Herstellerangaben entsprechend gefärbt. Der Primärantikörper wurde in einer 1:50 Verdünnung verwendet, die einzusetzenden Mengen Sekundärantikörper und Blocking-Reagenz wurden mit dem von Dako bereitgestellten ARKulator in Excel berechnet.

Die in Dresden angefertigten Tumorschnitte wurden aufgetaut, für 5 min in Aceton fixiert und getrocknet, die weitere Färbung verlief wie die der Zellkulturpräparate. Allerdings wurde bei der Färbung der Tumorschnitte zusätzlich ein Biotin-Block mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss an die Cytokeratinfärbung wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt und die Schnitte wurden mit Roti-Histokit II dauerhaft eingedeckt. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte unter einem Mikroskop mit 1,25 facher Vergrößerung mit einer digitalen Spiegelreflexkamera abfotografiert. Pro Tumor wurde mindestens ein Schnitt, meist aus Segment 2, gefärbt und in die Auswertung der Biolumineszenzmessungen einbezogen. Erwies sich ein Tumor als schwer auswertbar, wurden nach Bedarf Cytokeratinfärbungen weiterer Segmente angefertigt.

3.3.3 CD-45 Färbung

Zum Nachweis der tumorinfiltrierenden murinalen Abwehrzellen wurde eine CD45 Färbung für Kryoschnitte etabliert. Für die Färbung wurden die Schnitte aufgetaut, für 5 min in Acteon fixiert, getrocknet und für 2 min in PBS rehydriert. Nach einem einstündigen Block mit 2 % Magermilch-PBS wurden die Schnitte für 30 min mit dem Primärantikörper Ratte Anti-CD45-Maus (Abcam, 1:500 Verdünnung in Magermilch-PBS) inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper Ziege anti-Ratte IgG (Dianova, 1:2000 Verdünnung in PBS) aufgetragen. 30 min später wurden die Schnitte wieder 2 mal in PBS gewaschen und dann jeweils ein Tropfen DAB⁺(Dako) aufgetragen. Je nach Schnelligkeit der Farbreaktion wurde das DAB⁺ nach 5-10 min durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Im Anschluss wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt, die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Entellan eingedeckt.

3.4 Zellkultur

Vergleichend zur Messung des Laktatgehaltes in Xenografts sollte auch die Laktatproduktionsrate der zur Erzeugung der Experimentaltumoren verwendeten

humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien *in vitro* untersucht werden. Außerdem wurden Zellen der Mauszelllinie EMT6 und der humanen Linie FaDu zur Etablierung der Cytokeratinfärbung verwendet. Deshalb wurden die Zelllinien UT-SCC 5, UT-SCC 8, UT-SCC 14, UT-SCC 15, FaDu, HSC4, CAL33, SAS, XF354 und EMT6 unter Standard-Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) in 25 cm² Zellkulturflaschen mit DMEM high glucose (4,5 g/l) mit 10 % FCS, 10 mM HEPES, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, sowie 1 mM nichtessentielle Aminosäuren kultiviert. Bevor mit den Versuchen begonnen wurde, wurden die Zellen nach dem Auftauen je drei Mal in wöchentlichem Rhythmus passagiert und maximal bis zur 20. Passage verwendet.

3.4.1 Zellpräparate für immunhistochemische Färbungen

Zum Testen von Färbungen wurden auf Superfrostplus-Objektträgern in Flexipermis EMT6 und FaDu-Zellen allein oder als Mischung mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/cm² ausgesät und 24 h im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Flexipermis abgezogen und die Objektträger kurz in eiskalten PBS gespült. Dann wurden die Objektträger für 10 min in eiskaltem Aceton gestellt fixiert und anschließend getrocknet.

3.4.2 Laktatproduktionsraten

Für die Ermittlung der Laktatproduktionsraten wurden die neun Zelllinien UT-SCC 5, UT-SCC 8, UT-SCC 14, UT-SCC 15, FaDu, HSC4, CAL33, SAS und XF354 in definierter Zellzahl in Sechs-Well-Platten ausgesät. Nach drei Tagen und bei 80 %iger Konfluenz wurde das Medium gewechselt. Nach 0 und 24 h wurden Medienüberstände abgenommen und Zellzahl und Volumen mittels eines automatischen Zellzählers bestimmt.

Die Medienüberstände wurden durch eine 30 minütige Fällung mit 20 %iger Perchlorsäure entproteinisiert und abzentrifugiert. Die Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgte mit einem kommerziellen, photometrischen L-Laktat Kit. Abweichend von den Herstellerangaben, wurden die Kitbestandteile so umgerechnet, dass der Nachweis in einer 96-Well Platte für jede Probe als Dreifachbestimmung durchgeführt werden konnte. Mit den bei 340 nm ermittelten Werten der mitgeführten Standards wurde eine Eichgerade erstellt und daraus die Laktatkonzentration und die Laktatproduktionsrate pro 24 h pro Zellvolumen berechnet.

3.5 RealTime-PCR

Alle RealTime-Analysen wurden mit dem TaqMan-System (Applied Biosystems) in einem ABI 7300 Lightcycler durchgeführt. Die Expression wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode relativ zu einem Referenzgen und einem in allen PCR-Läufen mitgeführten Kalibrator bestimmt. Als Kalibrator wurde aus einem FaDu-Zellpellet mRNA extrahiert und daraus wie unten beschrieben cDNA synthetisiert. Außerdem war zur Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ein Nachweis der gleichen Amplifizierungseffizienz von Referenzgen und untersuchten Genen notwendig. Dazu wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe über 5 log Stufen angefertigt, mit den Verdünnungen der cDNA aus FaDu-Zellen wurde Real Time PCRs für das Haushaltsgen und die Zielgene in Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus den drei cycle threshold (ct)-Werten wurde jeweils der Mittelwert berechnet und nach der Formel $ct\text{-Mittelwert}_{\text{Zielgen}} - ct\text{-Mittelwert}_{\text{Referenzgen}}$ der Δct -Wert ermittelt. Die Δct -Werte wurden gegen den log der eingesetzten Probenmenge aufgetragen und für die sich ergebende Gerade die Steigung ermittelt. Diese lag für alle untersuchten Gene unter 0,1, so dass eine Auswertung nach der $\Delta\Delta ct$ -Methode zulässig war.

3.5.1 RealTime-PCR der 10 humanen HNSCC-Linien

Die Aufarbeitung der mRNA und Durchführung der RealTime-PCR der drei untersuchten Gene *glut1* (TaqMan Assay Hs00197884_m1), *pfk-l* (Hs00160027_m1) und *ldh-a* (Hs00855332_g1) und des Referenzgens *hmbs* (Hs00609297_m1) für sieben der zehn Tumorklinien wurde in der Doktorarbeit von V. Quennet detailliert beschrieben (Quennet 2007). Diese Vorgehensweise wurde zur Bearbeitung der drei übrigen Linien unverändert übernommen und erfolgte unter Esther Wenzels und meiner Anleitung durch Hannah Knörzer.

3.5.2 RealTime-PCR der fraktioniert bestrahlten Tumoren

Für die Expressionsstudie wurden Tumorkappen fraktioniert bestrahlter Xeongrafts der Linien UT-SCC 5 und UT-SCC 14 von der Arbeitsgruppe Baumann der TU Dresden zur Verfügung gestellt. Diese Tumorstücke wurden in einem FastPrep 24 in Precelly-Reaktionsgefäßen (Precelly 1,4 mm Keramik) in 350 μ l Lysepuffer für 120-180 sec bei 6 m/s geschüttelt. Dann erfolgte eine kombinierte RNA- und Protein-Extraktion mit dem NucleoSpin® Total RNA-Protein Extraktion Kit (Macherey-Nagel), die einen DNase-Verdau auf der Säule beinhaltet. Im letzten Schritt wurde mit 55 μ l RNase freiem Wasser eluiert.

Um die Intaktheit der RNA zu kontrollieren, wurden je 2 µl Probe auf ein ethidiumbromidhaltiges 1 % Mops-Formaldehydgel aufgetragen und das Laufverhalten nach 1,5 h bei 60 V unter UV-Licht überprüft. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mittels NanoDrop bestimmt. Proben mit einer RNA- Konzentration unter 500 ng/µl wurden nicht weiter analysiert, dazu gehörten alle mit 15 und ein Großteil der mit 10 Fraktionen bestrahlten Tumoren der Linie UT-SCC 14. Von allen anderen Proben wurden je 1000 ng RNA eingesetzt und mit dem RevertAid First Strand cDNA Syntese Kit in cDNA umgeschrieben.

Es wurden folgende Gene analysiert (verwendete TaqMan-Assays in Klammern): Hexokinase 2 (hk2, Hs00606086_m1), Glukose-6-Phosphat Isomerase (gpi, Hs00164752_m1), Phosphofruktokinase 2 (pfk2, Hs00190079_m1), Monocarboxylat Transporter 1 (mct1, Hs00161826_m1), Pyruvat Kinase Typ M2 (pkm2, Hs00987255_m1) und Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 (pdk1, Hs00176853_m1). Als endogene Kontrolle und Referenzgen diente das konstitutiv exprimierte TATA box binding Protein (tbp, Hs00427620_m1).

3.6 Western Blot

Der Western Blot des LDHA-Proteins wurde im Rahmen der Promotion von V. Quennet etabliert. Die exakte Durchführung und Ergebnisse zu sieben der zehn humanen HNSCC-Linien sind in ihrer Doktorarbeit dargestellt (Quennet, 2007), die Ergebnisse zu allen zehn Linien wurden erstmals 2010 publiziert (Sattler et al., 2010b). Die für den Western Blot verwendeten Proteinextrakte wurden von C. Bayer aus München zur Verfügung gestellt, das dazu verwendete Tumormaterial stammte von der Arbeitsgruppe Baumann aus Dresden. Details zur Proteinextraktion wurden in Bayer et al. (2008) publiziert.

3.7 Inhibitionsversuche

3.7.1 Einmalige Gabe

Die Auswirkung einer einmaligen Gabe der Stoffwechselmanipulatoren Dichloracetat (DCA) und Brompyruvat (BrPA) wurde an Experimentaltumoren der humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien FaDu und UT-SCC-5 getestet. Die Gabe von Dichloracetat erfolgte oral gelöst in destilliertem Wasser. Jeweils 4 Tieren wurden 50 bzw. 100 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Brompyruvat wurde in PBS gelöst und der

pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt. 5 mg/kg bzw. 50 mg BrPA/kg Körpergewicht wurden jeweils vier Tieren intraperitoneal (ip) injiziert. Zur Kontrolle wurden jeweils zwei FaDu- und zwei UT-SCC 5 Tumor-tragenden Mäusen PBS injiziert. 2 Stunden nach der Behandlung wurden die Tumoren entnommen und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Abweichend zum sonstigen Vorgehen wurden für diesen Versuch die Tumoren auf Trockeneis von Dresden nach Mainz gesendet und die Kryoschnitte in Mainz angefertigt.

3.7.2 Einwöchige Gabe

Für die Biolumineszenzmessungen wurden Experimentaltumoren der humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien FaDu und UT-SCC-5 verwendet. Diese von der Arbeitsgruppe Baumann der TU Dresden zur Verfügung gestellten Xenografts wurden in NMRI (nu/nu) Mäusen erzeugt wie unter 3.1 beschrieben

Für die Interventionsstudie wurde den Mäusen ab einem Tumordurchmesser von 4 mm ($\pm 0,5$ mm) entweder für 7 Tage DCA ins Trinkwasser gemischt (100 mg/kg Körpergewicht), 2 mal täglich DCA ip injiziert (50 mg/kg Körpergewicht pro Injektion) oder einmal täglich CHC ip injiziert (150 mg/kg Körpergewicht pro Injektion). Als Kontrolle wurde in drei Gruppen jeweils die gleiche Behandlung mit Wasser durchgeführt. Am 8. Tag nach Behandlungsbeginn wurden die Tumoren entnommen und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Zur Charakterisierung des Stoffwechsellmilieus wurde mittels bildgebender Biolumineszenz der ATP- und Laktatgehalt in 16 μm dicken Kryoschnitten nachgewiesen. Um eventuell vorhandene Unterschiede in der Laktatverteilung der mit CHC behandelten Tumoren sichtbar zu machen, wurden falschfarben-kalibrierte Bilder erzeugt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem eine Auswertung erstellt, mit der eine Quantifizierung der Anteile der einzelnen Konzentrationsstufen durchgeführt werden kann. Für diese Auswertung wurden die falschfarbenkalibrierten Bilder jeweils in den Bildstapel in Photoshop integriert und mit einer Kopie der Laktatmaske überlagert. Alle Maskenbereiche außerhalb des vitalen Tumorgewebes wurden weiß gefüllt und die resultierende Ansicht als .tif Datei gespeichert. Diese wurde in ImageJ geladen und die Anzahl der einzelnen Pixel jedes Farbtons mit dem Plugin Color Counter ausgewertet und die Daten in Excel übertragen. Anschließend konnte für jede Konzentrationsstufe der prozentuale Anteil am vitalen Tumor berechnet und graphisch als Vergleich zwischen CHC-behandelten und H₂O-behandelten Proben dargestellt werden.

3.8 Vergleich der Laktatmessung mittels MRT und Biolumineszenz

Um die Ergebnisse der Laktatmessung mittels Magnetresonanztomographie und Biolumineszenz zu vergleichen, wurde eine gepaarte Studie durchgeführt, bei der zunächst Tumoren der beiden Tumorlinien UT-SCC 5 und UT-SCC 14 in Würzburg untersucht wurden. Dazu wurden die Tumoren nach Protokoll in Dresden generiert und tumortragende Tiere nach Würzburg geschickt. Die Messungen in Würzburg erfolgten in einem 17.6 Tesla Tomographen (Details zur Durchführung der Messungen sind veröffentlicht in Morchel et al., 2011). Direkt im Anschluss an die ca. 1 bis 1,5 Stunden dauernde Messung wurde das tumortragende Bein abgeschnitten, in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und dann auf Trockeneis zurück nach Dresden gesendet.

In Dresden wurden die Tumoren so geschnitten, dass die Schnitte in der Ebene der MRT-Aufnahme lokalisiert sind. Es wurde jeweils ein HE-, ATP- und Laktatschnitt zentral im MRT-Aufnahmefeld angefertigt und die gleiche Abfolge von Schnitten jeweils 1 mm vor und nach diesem Segment wiederholt. Die HE-Färbung, Biolumineszenzmessung und Auswertung der Schnitte wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Zum Vergleich der beiden Methoden wurden die berechneten Mittelwerte sowie die Verteilung der Metabolite in den MRT- und Biolumineszenzaufnahmen verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Validierung und Optimierung der Biolumineszenz

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Aufgabe, eine neue Kamera und Software zu etablieren und die Methode der induzierten, metabolischen Biolumineszenz insgesamt zu überprüfen, da die bisher benutzte Hamamatsu-Kamera keine validen und reproduzierbaren Messergebnisse mehr lieferte. Insbesondere bei Laktatbestimmungen wurden wiederholt sehr hohe Lichtintensitäten gemessen, die oberhalb der durch Messungen von Standards bekannter Konzentration erstellten Kalibrierungskurve lagen. Eine Analyse möglicher Fehlerquellen lieferte mehrere Hinweise: die Lichtsensitivität des Aufnahmefeldes hatte insgesamt abgenommen und war inhomogen geworden, was zu Abweichungen der Werte um bis zu 40 % führte. Außerdem zeigten Histogramme aktueller Aufnahmen im Gegensatz zu alten Aufnahmen einen Verlust im Auflösungsvermögen unterschiedlicher Helligkeitsstufen. Eine Überprüfung der Kamera

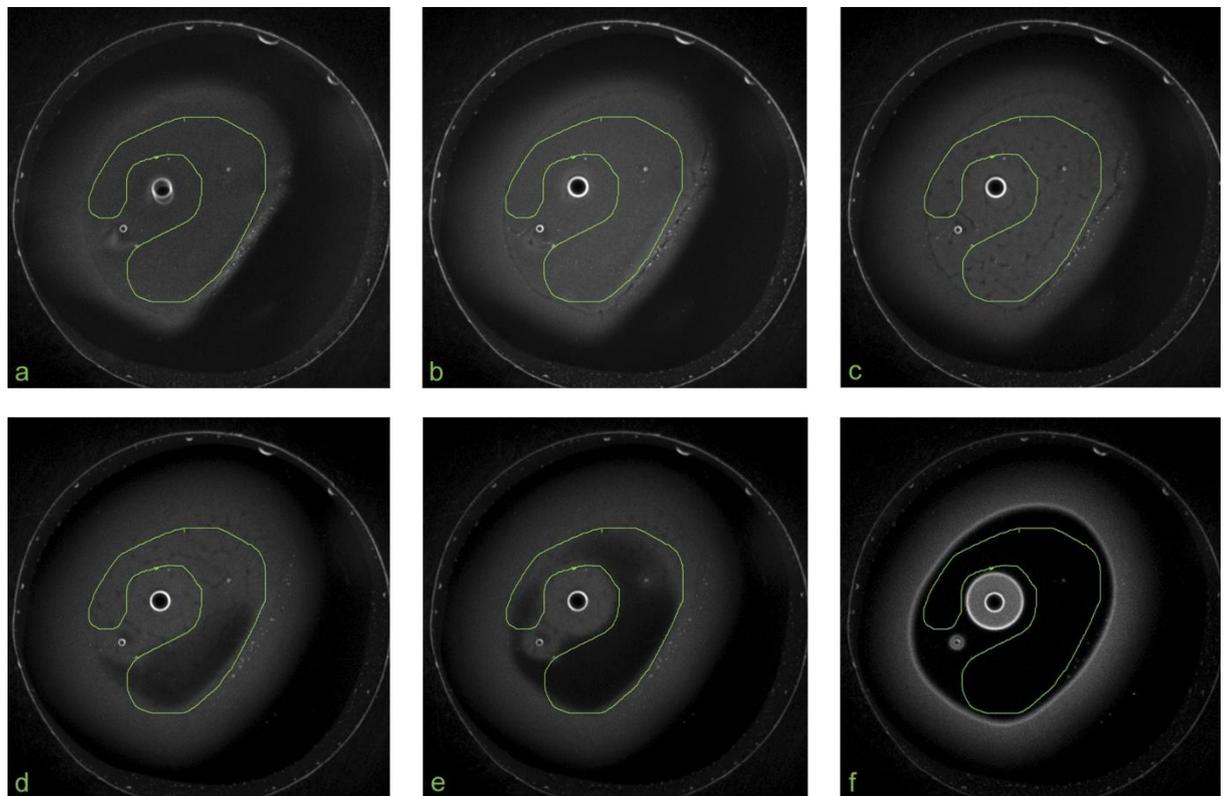


Abb. 6: Biolumineszenzaufnahmen eines Standardschnittes ($30 \mu\text{mol/g}$ Laktat) zu verschiedenen Zeitpunkten des Reaktionsverlaufes (die entsprechenden Zeitpunkte sind in Abb. 7 rot markiert); Belichtungszeit 10 sec, der grün umrandete Bereich wurde für die Intensitätsauswertung in Abb. 7 verwendet.

durch Hamamatsu bestätigte einen Verlust an Lichtsensitivität, eine Reparatur des System war nicht möglich. Wahrscheinlich um die schwächere Lichtausbeute auszugleichen wurden zudem die Konzentrationen der für die Messungen benötigten Enzyme über den optimalen Bereich hinaus erhöht.

Nach der Anschaffung eines neuen, digitalen Kamerasystems war es deshalb zunächst erforderlich, einige methodische Fragen zu klären. Dazu wurden eine Reihe von Test- und Vergleichsmessungen mit Standardschnitten bekannter Metabolitkonzentration sowie mit Tumorschnitten durchgeführt. Die Grundlage aller Analysen und Entscheidungen bildete immer die Auswertung der Biolumineszenzmessungen, die entweder als eine einzige Aufnahme mit unterschiedlich langer Belichtungszeit oder als Serienaufnahme durchgeführt wurden. Um die kinetischen Eigenschaften eines Enzymmixes beurteilen zu können und Inkubations- und Messzeiten für Biolumineszenzmessungen festzulegen, wurde zunächst jeweils eine Serienaufnahme mit 12-24 Bildern über einen Zeitraum von 2 Minuten mit einem Standardschnitt höherer Metabolitkonzentration durchgeführt. Die charakteristischen Phasen der Biolumineszenzreaktion am Beispiel einer Laktatmessung sind in Abb. 6 dargestellt: Anfänglich treten durch das Auflegen des Deckgläschens leichte Sogeffekte auf, so dass die Aufnahme verwischt erscheint und die größere Luftblase wegdriftet (Abb. 6a). 30 sec später leuchtet der Standardschnitt heller und, abgesehen von den Luftblasen, homogen; der Umriss des Schnittes ist gut zu erkennen (Abb. 6b). Weitere 30 sec später erscheint der Schnitt nach wie vor hell, wird aber von feinen Linien durchzogen, der äußere Rand ist breiter (Abb. 6c). Nach 140 sec ist der untere Bereich des Schnittes deutlich dunkler (Abb. 6d). Bereits im nächsten Bild lässt die Lichtintensität des Schnittes mit Ausnahme der Bereiche um die Luftblasen deutlich nach (Abb. 6e). In der letzten Aufnahme, nach 4 min Reaktionszeit, ist die ursprüngliche Form des Schnittes nicht mehr zu erkennen. Es haben sich klar abgegrenzte, hell leuchtende Ringe ausgebildet, nur die Lichtintensität des äußeren Randes nimmt graduell ab (Abb. 6f).

Zur Auswertung dieser Serienaufnahmen wurde eine Maske auf den Standardschnitt gelegt, die Randbereiche sowie eventuell vorhandene Luftblasen, Risse und andere Artefakte ausschließt. Für den Bereich innerhalb der Maske wurde für jedes Bild der Serienaufnahme die durchschnittliche Lichtintensität und die Standardabweichung (SD) ermittelt und diese Werte graphisch aufgetragen. Die Lichtintensität ist eine einheitslose Größe, die Größenordnung der gemessenen Werte ist vom eingesetzten Kamerasystem abhängig. In Abb. 7 ist die Lichtintensität der Laktatmessung des Standardschnittes aus Abb. 6 im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die erste Aufnahme (a) weist innerhalb des

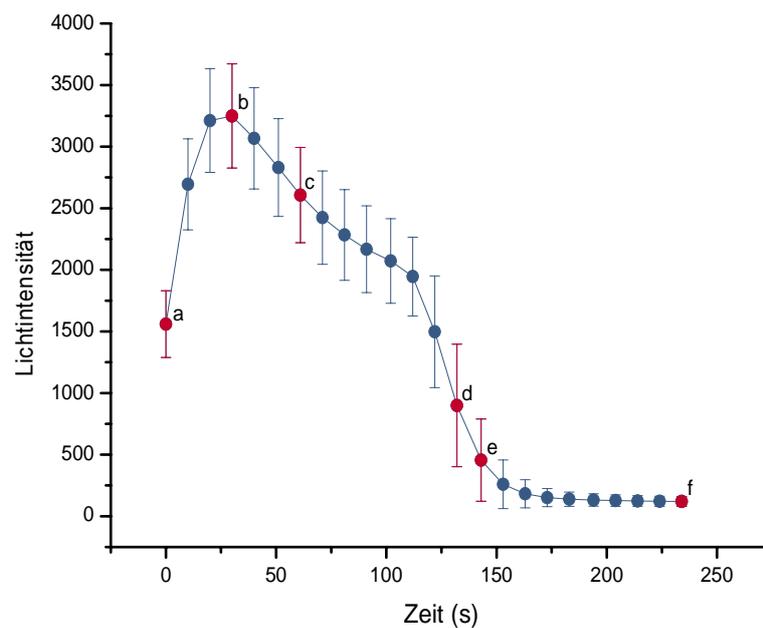


Abb. 7: Kinetik der Biolumineszenzmessung des in Abb. 6 dargestellten Standardschnittes (30 $\mu\text{mol/g}$). Dargestellt ist die mittlere Lichtintensität des ausgewerteten Bereiches je eines Schnittes \pm SD. Die roten Punkte a-f zeigen die jeweils mittlere Lichtintensität des grün umrandeten Areals in den Aufnahmen.

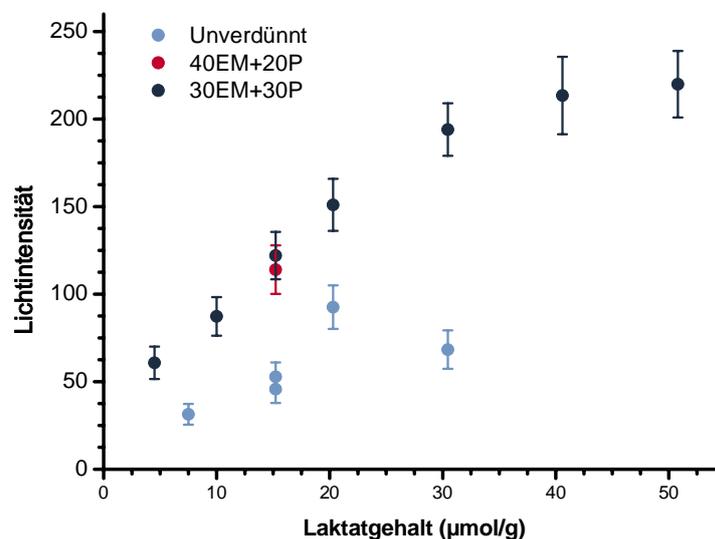


Abb. 8: Laktat-Biolumineszenzmessung mit Standards mit unterschiedlichem Laktatgehalt und unverdünntem (hellblaue Symbole) oder verdünntem (roter Kreis: 40 μl Enzymmix + 20 μl Puffer; dunkelblaue Kreise: 30 μl Enzymmix + 30 μl Puffer) Enzymmix. Dargestellt ist die mittlere Lichtintensität des ausgewerteten Bereiches je eines Schnittes \pm SD.

ausgewerteten Areals eine durchschnittliche Lichtintensität von 1559 auf und erreicht bei der vierten Aufnahme ein Maximum von 3249. Im weiteren Verlauf nimmt die Lichtintensität kontinuierlich ab, zunächst allmählich zwischen 40 und 110 s und dann

steil abfallend, bis schließlich in etwa die Lichtintensität des Hintergrundes erreicht wird.

Der erste Schritt hin zu einer Optimierung des Enzymmixes war, ausgehend von der zuletzt verwendeten Zusammensetzung, die Austestung verschiedener Verdünnungen. Die Ergebnisse der Messungen von Standardschnitten ansteigender Laktatkonzentration mit unverdünntem und verdünntem Enzymmix sind in Abb. 8 dargestellt. Diese Versuche wurden noch mit dem Hamamatsu-System durchgeführt, weshalb die Lichtintensitätswerte in einer anderen Größenordnung als die der übrigen Versuche liegen. Die Laktatmessungen mit einem unverdünnten Enzymmix ergeben zunehmende Lichtintensitäten von 31 bis 93 für Standards mit einem Laktatgehalt von 7,5 bis 20,3 $\mu\text{mol/g}$, die Lichtintensität des 30,45 $\mu\text{mol/g}$ Standards liegt mit 68 unter der des 20,3 $\mu\text{mol/g}$ Standards. Wird der Enzymmix mit der gleichen Menge Puffer verdünnt, liegen die Lichtintensitäten deutlich über denen mit unverdünntem Mix durchgeführten Messungen, z.B. für einen 15,22 $\mu\text{mol/g}$ Standard 122 im Gegensatz zu 46. Außerdem ist auch bei höheren Laktatgehalten der Standards noch kein Abfall der Lichtintensität zu beobachten. Vielmehr liegt die Lichtintensität des 30,45 $\mu\text{mol/g}$ Standards mit 194 deutlich über der des 20,3 $\mu\text{mol/g}$ Standards (151), die Werte für 40,6 und 50,8 $\mu\text{mol/g}$ sind noch etwas höher (213 bzw. 220). Eine einzelne Messung mit einer geringeren Verdünnung des Enzymmixes führte zu einer Lichtintensität knapp unter der 1:1 Verdünnung (114 für einen 15,22 $\mu\text{mol/g}$ Standard). Wurde der Enzymmix noch weiter verdünnt, lagen die Lichtintensitäten ebenfalls deutlich unterhalb der 1:1 Verdünnung (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Schritt wurde ermittelt, wie ein verändertes Verhältnis von NFO zu Luciferase die Lichtausbeute beeinflusst, in dem die NFO-Konzentration variiert wurde. Für diesen und alle weiteren Versuche wurde das neu berechnete Ansatzprotokoll aus Tab. 2 verwendet. Zur Austestung der optimalen NFO-Konzentration wurden Biolumineszenz-Serienaufnahmen von Standardschnitten durchgeführt und jeweils die eingesetzte Menge NFO variiert. In Abb. 9 ist der Reaktionsverlauf in Abhängigkeit der Konzentration der Oxidoreduktase dargestellt. Die Messung mit der höchsten NFO-Konzentration ist durch einen steilen Anstieg bis 40 sec nach Reaktionsbeginn und einen darauf folgenden steilen Abfall gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu ist der Anstieg der Lichtintensität mit 1,8 U/ml NFO weniger stark und sinkt nach dem Maximum deutlich langsamer ab. Allerdings sind die Lichtintensitäten insgesamt deutlich niedriger. Die Reaktion mit 3,6 U/ml NFO weist das gleiche Intensitätsmaximum auf wie die Reaktion

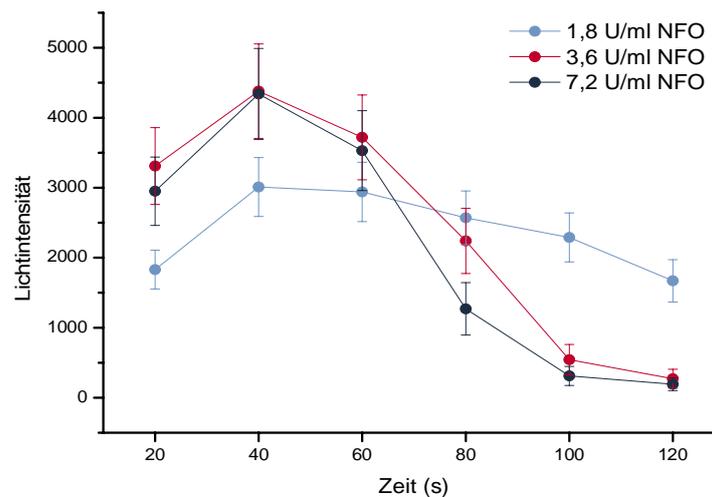


Abb. 9: Verlauf der Laktatmessung mit verschiedenen Konzentrationen der NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase (NFO). Gezeigt ist die mittlere Lichtintensität des Auswertebereiches je eines Schnittes \pm SD. mit 7,2 U/ml NFO (4380 bzw. 4340), die übrigen Werte sind etwas höher als bei dieser, d.h. Anstieg und Abfall sind weniger steil.

In einem weiteren Test sollte überprüft werden, ob endogen in den Tumorschnitten vorliegendes NADH das Ergebnis der Biolumineszenzmessung nach oben verfälschen könnte. Dazu wurde ein Enzymmix zusammengestellt, in dem nur Bestandteile für die Lichtreaktion, also die Umsetzung von NADH durch Oxidoreduktase und Luciferase, enthalten waren. Abb. 10 vergleicht den Verlauf der Lichtreaktion mit dem der Laktatmessung anhand von zwei parallelen Kryoschnitten eines CAL33-Tumors.

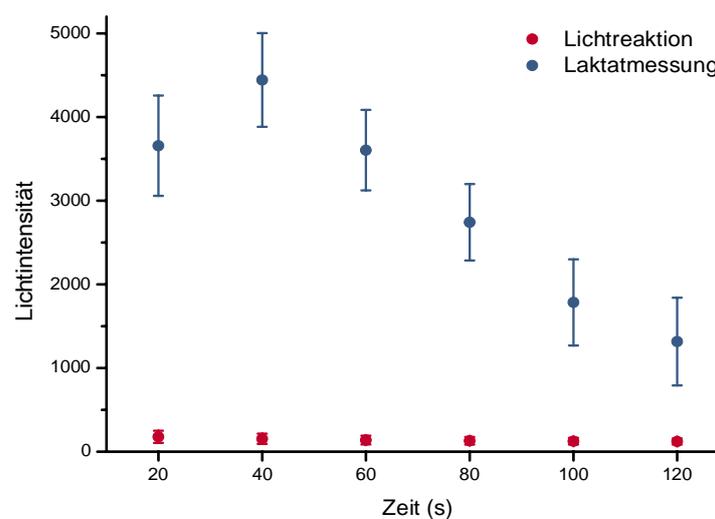


Abb. 10: Vergleich der Lichtintensitäten der Lichtreaktion und der vollständigen Laktatmessung am Beispiel zweier paralleler Schnitte eines CAL33-Tumors. Dargestellt ist die mittlere Lichtintensität des ausgewerteten Bereiches je eines Schnittes \pm SD.

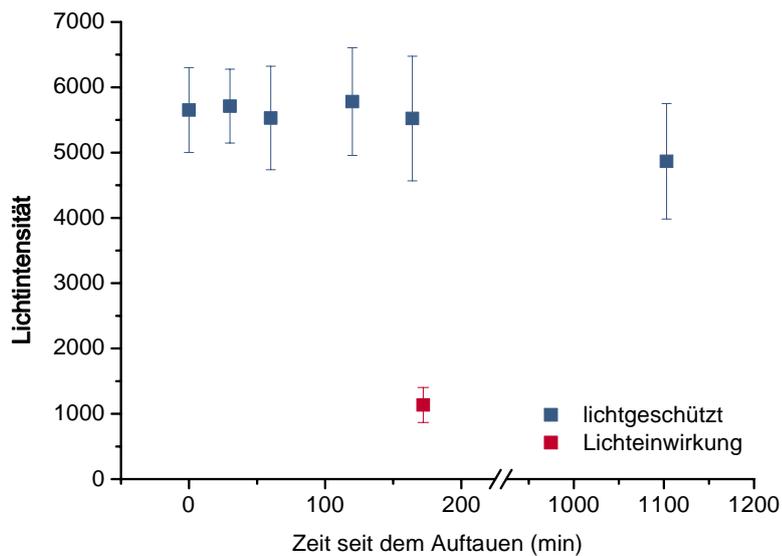


Abb. 11: Messung von Standardschnitten zur Bestimmung der Kitstabilität; blaue Symbole: Aufbewahrung lichtgeschützt auf Eis, rotes Symbol: 45 minütige Lichteinwirkung (50 cm Entfernung zu einer handelsüblichen 60 Watt Glühbirne) und anschließende Messung. Dargestellt ist die mittlere Lichtintensität des ausgewerteten Bereiches je eines Schnittes \pm SD.

Während die Lichtreaktion (rote Punkte) konstant aber sehr niedrig knapp über dem Hintergrund liegt (LI 178 bis 121), zeigt die vollständige Laktatbiolumineszenzmessung (blaue Punkte) vielfach höhere Lichtintensitäten (zwischen 4442 im Maximum und 1316 in der letzten Aufnahme). Die Messung weiterer Schnitte anderer Tumoren zeigte ebenfalls sehr niedrige Lichtintensitäten in der Lichtreaktion (Daten nicht gezeigt).

Zur Überprüfung der Stabilität des Enzymmixes wurden Standardschnitte gleicher Konzentration in etwas größeren Zeitabständen gemessen, die den Arbeitsablauf von Probenmessungen simulieren. Die ausgewerteten Lichtintensitäten im zeitlichen Verlauf sind in Abb. 11 aufgetragen. Über einen Zeitraum von 160 Minuten bleiben die gemessenen Lichtintensitäten konstant (zwischen 5523 und 5780), wenn der Mix im Dunkeln und auf Eis aufbewahrt wird. Nach 45 Minuten Lichteinwirkung unter einer handelsüblichen 60 Watt Glühbirne, während der der Enzymmix auf Eis aufbewahrt wurde, sinkt die Lichtintensität auf 1134. Im Gegensatz dazu ist die Lichtintensität auch nach 18stündiger Aufbewahrung im Dunkeln auf Eis nur wenig verringert (4867).

Die aus den verschiedenen Tests resultierende, finale Zusammensetzung des Enzymmixes, die auch für alle folgenden Experimente verwendet wurde, ist in Tab. 4 dargestellt. Dieser Mix weist im Vergleich zu früheren ein verändertes Verhältnis von Luciferase zu Oxidoreduktase auf, alle Bestandteile außer der Luciferase liegen zudem in niedrigeren Konzentrationen vor. Neben der verbesserten Lichtausbeute kann durch die optimierte Zusammensetzung auch eine Reduzierung der Messkosten erreicht werden,

Tab. 4: Neue Zusammensetzung des Enzymmixes zur Laktatmessung. Aufgeführt ist jeweils die Konzentration der Stammlösung, das pro Messung eingesetzte Volumen und die resultierende Endkonzentration im fertig angesetzten Mix.

Bestandteil	Stammlösung	pro Messung	Endkonzentration
Phosphatpuffer	0,1 M	10,45 µl	40 mM
1,4-Dithiothreitol	65 mM	0,4 µl	0,4 mM
Natriumglutamat	1,05 M	2 µl	35 mM
Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid	502 mM	2,44 µl	20 mM
Flavinmononukleotid	3,9 mM	4 µl	0,25 mM
L-Laktat Dehydrogenase	3000 U/ml	4 µl	200 U/ml
Glutamat-Pyruvat Transaminase	800 U/ml	3,75 µl	50 U/ml
NAD(P)H:FMN Oxidoreduktase	40 U/ml	5,4 µl	3,6 U/ml
Luciferase	30 mU/ml	27 µl	13,5 mU/ml
Decanal in Methanol	640 mM	0,56 µl	6 mM

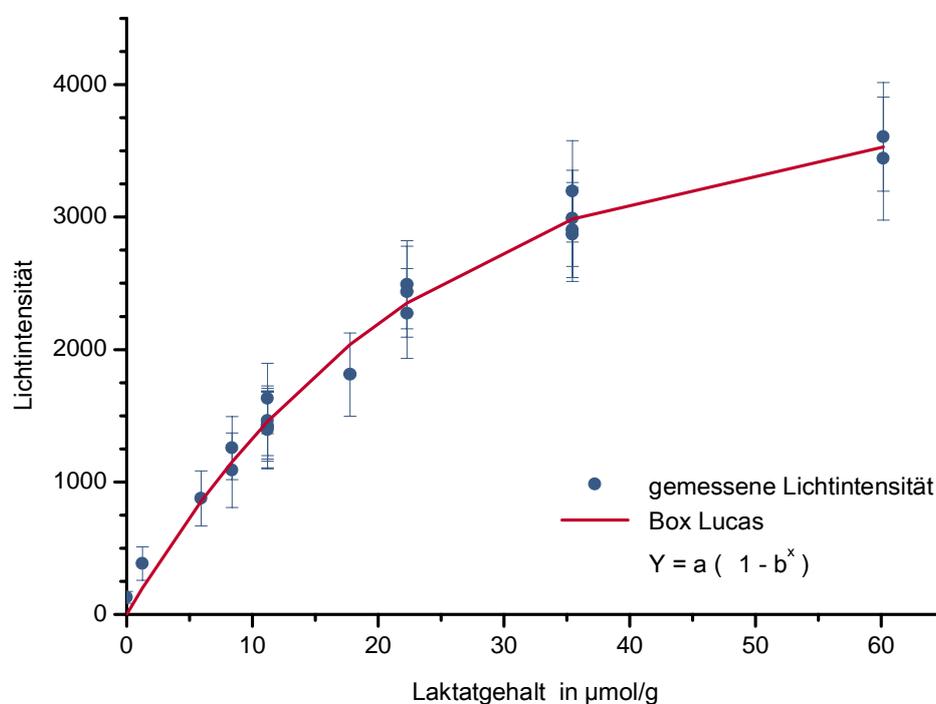


Abb. 12: Repräsentative Kalibrierungskurve der Laktatmessungen eines Enzymmixes. Aufgetragen ist die jeweilige mittlere Lichtintensität \pm SD des Auswertebereiches eines Standards gegen dessen Laktatgehalt (Punkte) und die berechnete nicht-lineare Regression nach Box-Lucas (Linie).

jede Messung mit diesem neuen Enzymmix ist etwa 50 % günstiger als mit der alten Zusammensetzung.

Wird ein neuer Enzymmix angesetzt, so ist es notwendig, zunächst die optimalen Messeinstellungen zu bestimmen. Dann werden Standardschnitte gemessen und die Ergebnisse in einer Kalibrierungskurve zusammen gefasst, die es erlaubt, jeder Lichtintensität einen Metabolitgehalt zuzuordnen. Eine repräsentative Kalibrierungskurve für die Ermittlung des Laktatgehaltes ist in Abb. 12 dargestellt.

Neben der Zusammensetzung des Enzymmixes sollte auch die Auswertung der Messergebnisse optimiert werden, da das manuelle Umfahren der auszuwertenden Areale zeitaufwendig und fehleranfällig war. Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit Prof. E. Schömer und J. Osthof ein ImageJ PlugIn kreiert, das diesen Schritt automatisiert. Mit der Validierung der ImageJ-Auswertung von mittleren, durchschnittlicher und maximaler Lichtintensität sowie der einbezogenen Fläche sollte sichergestellt werden, dass alle gekennzeichneten Tumoreareale erkannt und eingerechnet werden. Dazu wurden einige Tumorschnitte manuell in AndorIQ und in ImageJ ausgewertet. Die resultierenden Lichtintensitäten (Mittelwert und Maximum sowie Standardabweichung) und die ausgewertete Fläche sind in Tab. 5 gegenübergestellt. Die mittlere Lichtintensität zeigt nur sehr geringe Abweichungen zwischen beiden Verfahren, etwas größere Abweichungen treten bei der Berechnung der ausgewerteten Fläche auf. Eine wiederholte Auswertung der Digitalaufnahmen mit dem ImageJ-PlugIn lieferte exakt gleiche Werte (Daten nicht gezeigt).

Um die Ergebnisse der Laktatbiolumineszenz mit dem neu zusammengestellten Enzymmix und der optimierten Auswertung mit einer zweiten Methode abzugleichen,

Tab. 5: Vergleich der mit ImageJ (links) und Andor IQ (rechts) ausgewerteten Lichtintensitäten.

ImageJ Auswertung				Andor IQ Auswertung			
Lichtintensität				Lichtintensität			
MW	Max	SD	Fläche (mm ²)	MW	Max	SD	Fläche (mm ²)
1348,3	2901	282,2	29545	1348,8	2901	284,0	30903
1105,2	2807	326,9	29179	1105,8	2807	333,6	31858
1151,8	3166	275,5	40836	1153,2	3283	279,4	42721
1116,0	2676	284,2	45282	1111,5	7446	288,5	46589
1248,1	5930	321,0	50796	1249,2	5930	321,8	52119
1208,7	3138	291,5	55550	1211,9	3138	295,7	57556

Tab. 6: Vergleich der Laktatmessung mittels Biolumineszenz und Photometrie in Schnitten verschiedener HNSCC-Xenografts. Angegeben sind jeweils der Laktatgehalt \pm SD sowie die prozentuale Abweichung des photometrisch bestimmten Wertes vom Biolumineszenzergebnis.

Tumor		Biolumineszenz		Photometrie		Prozentuale
Linie	Nummer	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)	SD	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)	SD	Abweichung
CAL33	777	19,1	2,4	19,1	0,4	0 %
	"	17,1	0,9	19,1	0,4	-12 %
FaDu	51	11,3	2,4	6,9	0,5	39 %
	67	12,0	1,1	7,2	0,1	40 %
	"	8,4	1,3	7,2	0,1	14 %
HSC4	136	19,2	0,7	18,3	0,5	5 %
	538	12,1	0,5	16,9	0,3	-40 %
	"	16,3	1,9	16,9	0,3	-4 %
UT5	500	12,3	0,9	5,2	0,4	58 %
	"	12,6	1,3	5,2	0,4	59 %
	501	12,6	0,8	9,9	0,3	22 %
	"	9,4	0,9	9,9	0,3	-5 %
UT8	586	14,8	1,7	10,1	0,6	31 %
	597	14,2	0,9	10,8	0,3	24 %
UT14	949	9,9	1,2	6,6	0,2	33 %
	"	11,7	1,2	6,6	0,2	43 %
UT15	29	14,1	1,1	9,5	0,2	33 %
	30	13,5	1,6	6,1	0,2	55 %

wurden von zwölf Tumoren zusätzlich photometrische Konzentrationsmessung durchgeführt. Dazu wurden die Tumoren geteilt, eine Hälfte lyophilisiert und für die Photometrie aufgearbeitet, während die andere Hälfte für die Anfertigung von Kryoschnitten genutzt wurde. Die Ergebnisse der Vergleichsmessung (Tab. 6) zeigen in knapp der Hälfte der gemessenen Proben eine gute Übereinstimmung der Werte mit Abweichungen unter ± 25 % zwischen Biolumineszenz und Photometrie. In einem Fall lag der in der Biolumineszenz bestimmte Wert deutlich unter dem photometrisch bestimmten Laktatgehalt. In den übrigen Fällen war der photometrisch bestimmte Wert niedriger als die Biolumineszenzmessung. Die größte Abweichung trat in zwei Schnitten eines UT-SCC 5 Tumors auf, hier betrug die Abweichung 58 bzw 59 %.

Tab. 7: Vergleich des Laktatgehaltes und der Auswertbarkeit dreier Tumorklinien bei Messungen mit dem Hamamatsu- und Andor-System und der jeweiligen Auswertung.

Tumorklinie	Hamamatsu		Andor IQ		
	Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$)	Auswertbarer Pixelanteil	Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$)	Anzahl Schnitte	davon nicht auswertbar
HSC4	23,7	10%	17,5	36	1
UT-SCC 8	22,5	40%	16,6	36	0
UT-SCC45	18,1	58%	12,6	38	0

Nach der Validierung der Biolumineszenzmessungen mit dem neu angeschafften Andor IQ-System stellte sich die Frage, ob die Ergebnisse der zuletzt mit dem fehlerbehafteten Hamamatsu-System gemessenen Linien verfälscht wurden. Deshalb wurde in Nachschnitten der Linien UT-SCC 8, HSC 4 und UT-SCC 45 erneut ATP, Laktat und Pyruvat gemessen. In Tab. 7 sind die Ergebnisse der Laktatmessungen der Originalschnitte mit dem Hamamatsu-System und der Nachschnitte mit dem Andor-System gegenübergestellt. Bei Messungen mit dem Hamamatsu-System sind zum Teil nur sehr geringe Anteile der Pixel innerhalb des vitalen Tumorgewebes auswertbar. In Tumoren der Linie UT-SCC 45 lag die Lichtintensität bei 42 % der Pixel oberhalb der Kalibrierung und konnte deshalb nicht ausgewertet werden. In HSC4 konnten sogar nur 10 % der Pixel ausgewertet werden. Der aus den Daten der auswertbaren Pixel berechnete Laktatgehalt liegt in allen drei Linien ca. $6 \mu\text{mol/g}$ über den mit dem Andor-System gemessenen Werten. Von insgesamt 110 mit der Andor-Kamera und dem neuen Enzymmix gemessenen Schnitten war nur der Laktatgehalt eines Schnittes nicht auswertbar, da die mittlere Lichtintensität oberhalb der Kalibrierung lag.

Tab. 8: Wiederholte Messung von Schnitten des FaDu Xenograftes #51. Angegeben sind Datum und Ort der Messung, der Herstellungszeitpunkt des verwendeten Enzymmixes, die jeweilige mittlere Lichtintensität des gesamten Tumorschnitt und die eines am selben Tag gemessenen 10 mM Laktat-Standardschnittes sowie der anhand der Kalibrierung errechnete Laktatgehalt.

FaDu #51	Messdatum/-ort	Enzymmix von	mittlere LI	LI 10 mM Std	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)
Schnitt 2	14.06.2008 Mainz	Mai 08	5651	5440	11,31
Schnitt 9	05.03.2009 Mainz	Okt 08	4117	4173	11,32
Schnitt 13	08.09.2009 Mainz	Aug 09	1382	1407	10,46
Schnitt 14	23.04.2010 Mainz	Mär 09	432	412	11,96
Schnitt 15	28.04.2010 Toronto	Apr 10	1928	2000	11,59

Um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten und gegebenenfalls auftretende Probleme frühzeitig erkennen zu können, wurden wiederholt Schnitte eines Tumors mit verschiedenen Mixansätzen und Kalibrierungseinstellungen gemessen. Die Ergebnisse der Messung von Kryoschnitten des FaDu-Tumors #51 und Standardschnitten ab Mai 2008 sind in Tab. 8 dargestellt. Über einen Zeitraum von knapp zwei Jahren und mit fünf verschiedenen Enzymmixen zeigte sich eine gute Übereinstimmung der mittleren Lichtintensität der Tumorschnitte mit der der 10 mM Laktatstandards, auch wenn die absoluten Lichtintensitäten je nach Enzymmix große Unterschiede aufwiesen. Der mit der jeweiligen Kalibrierung berechnete Laktatgehalt der Schnitte lag zwischen 10,46 und 11,96 $\mu\text{mol/g}$. Auch eine im Princess-Margaret-Hospital in Toronto durchgeführte Messung eines FaDu #51 Schnittes mit einem zweiten Biolumineszenz-System und einem dort angesetzten Enzymmix war vergleichbar mit den in Mainz erhaltenen Ergebnissen.

Da die Optimierung des Laktatmixes in einer verbesserten Lichtausbeute und niedrigeren Messkosten resultierte, sollte auch der Enzymmix für Glukosemessungen überprüft werden. Für die Neuberechnung des Glukosekitansatzes wurden anhand der Erfahrungswerte aus den Laktatversuchen eine etwas geringere Konzentration der Enzymmixbestandteile (s. Tab. 3) gewählt und eine erste Zusammensetzung ausgetestet. Dieser Mix zeigte einen relativ langsamen Anstieg der Lichtintensität und eher niedrige Lichtintensitäten, die Lichtintensität eines 7,5 $\mu\text{mol/g}$ Glukosestandards lag bei 2600. Eine Variation des Luciferase- und Oxidoreduktaseanteils konnte die Reaktion weder beschleunigen noch die Lichtausbeute erhöhen (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu führte eine Verdünnung des Enzymmixes bei gleichen Messeinstellungen zum Teil zu höheren Lichtintensitäten. Die verschiedenen ausgetesteten Mischungsverhältnisse von

Tab. 9: Gemessene Lichtintensitäten bei verschiedenen Mischungsverhältnissen von Enzymmix und Phosphatpuffer.

Glukose-Standard	Enzymmix	Phosphatpuffer	Lichtintensität	SD
7,5 $\mu\text{mol/g}$	50 μl	10 μl	2960	620
7,5 $\mu\text{mol/g}$	45 μl	15 μl	3053	463
7,5 $\mu\text{mol/g}$	40 μl	20 μl	3480	420
7,5 $\mu\text{mol/g}$	35 μl	25 μl	3400	463
7,5 $\mu\text{mol/g}$	30 μl	30 μl	3120	434
10 $\mu\text{mol/g}$	40 μl	20 μl	4292	599
10 $\mu\text{mol/g}$	35 μl	25 μl	3440	596

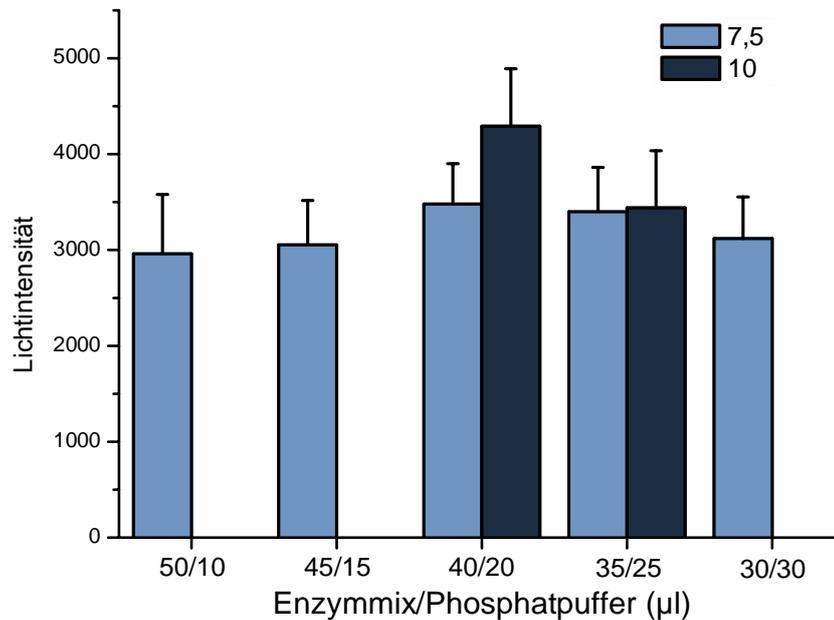


Abb. 13: Die Lichtintensität von 7,5 und 10 mM Glukose-Standardschnitten in Abhängigkeit von einer Verdünnung des Enzymmixes.

Glukose-Enzymmix und 0,3 M Phosphatpuffer und die resultierende Lichtausbeute sind in Tab. und Abb. 13 dargestellt. Die höchste Lichtintensität eines 7,5 µmol/g Glukosestandards wurde bei der Verdünnung von 40 µl Enzymmix mit 20 µl Puffer gemessen (3480), die Lichtintensität einer Mischung von 35 µl Enzymmix und 25 µl Puffer lag nur sehr knapp darunter (3400). Allerdings lag bei der zweiten Kombination die Lichtintensität eines 10 µmol/g Standards ebenfalls bei 3440, während mit der

Tab. 10: Neue Zusammensetzung des Enzymmixes zur Glukosemessung, aufgeführt ist jeweils die Konzentration der Stammlösung, das pro Messung eingesetzte Volumen und die resultierende Endkonzentration im fertig angesetzten Mix.

Bestandteil	Stammlösung	pro Messung	Endkonzentration
Phosphatpuffer	0,3 M	21,77 µl	120 mM
1,4-Dithiothreitol	65 mM	0,33 µl	0,36 mM
Adenosintriphosphat	0,66 mM	6,43 µl	0,07 mM
Magnesiumchlorid	1 M	0,33 µl	5,56 mM
NADP	0,41 mM	3,27 µl	0,02 mM
Flavinmononukleotid	3,9 mM	3,4 µl	0,22 mM
Hexokinase	1500 U/ml	1,27 µl	31,67 U/ml
Glukose-6-phosphatdehydrogenase	1000 U/ml	1,27 µl	21,11 U/ml
NAD(P)H:FMN Oxidoreduktase	40 U/ml	4,27 µl	2,84 U/ml
Luciferase	30 mU/ml	17,13 µl	8,57 mU/ml
Decanal in Methanol	640 mM	0,53 µl	5,69 mM

ersten die Lichtintensität eines 10 $\mu\text{mol/g}$ Standards mit 4292 deutlich höher lag. Aufgrund dieser Testergebnisse wurden die eingesetzten Mengen der einzelnen Glukosemix-Bestandteile angepasst, das resultierende Ansatzprotokoll ist in Tab. 1 wiedergegeben. Durch Verringerung der eingesetzten Enzymkonzentrationen konnte die Kosten pro Glukosemessung um ca. 50 % gesenkt werden.

Zur Vereinfachung der zum Teil schwierigen und in jedem Fall zeitaufwendigen Bestimmung des vitalen Tumorgewebes für die Auswertung der Biolumineszenzmessungen wurde eine immunhistochemische Färbung gesucht, die spezifisch humanes Tumorgewebe in Xenograftschnitten nachweist. Zunächst wurde eine Anti-Cytokeratinfärbung an Monolayer-Zellpräparaten getestet (Abb. 14). Sowohl murine EMT6-Zellen (Abb. 14a) als auch die Negativkontrolle, eine Mischung aus humanen FaDu- und EMT6-Zellen (Abb. 14d) ohne Zusatz des Primärantikörpers, weisen keine Braunfärbung auf. Davon abweichend zeigen alle FaDu-Zellen in Abb. 14b eine mäßige bis starke Färbung. In einem Gemisch aus EMT6- und FaDu-Zellen sind sowohl gefärbte als auch ungefärbte Zellen erkennbar (Abb. 14c). Auch in Schnitten

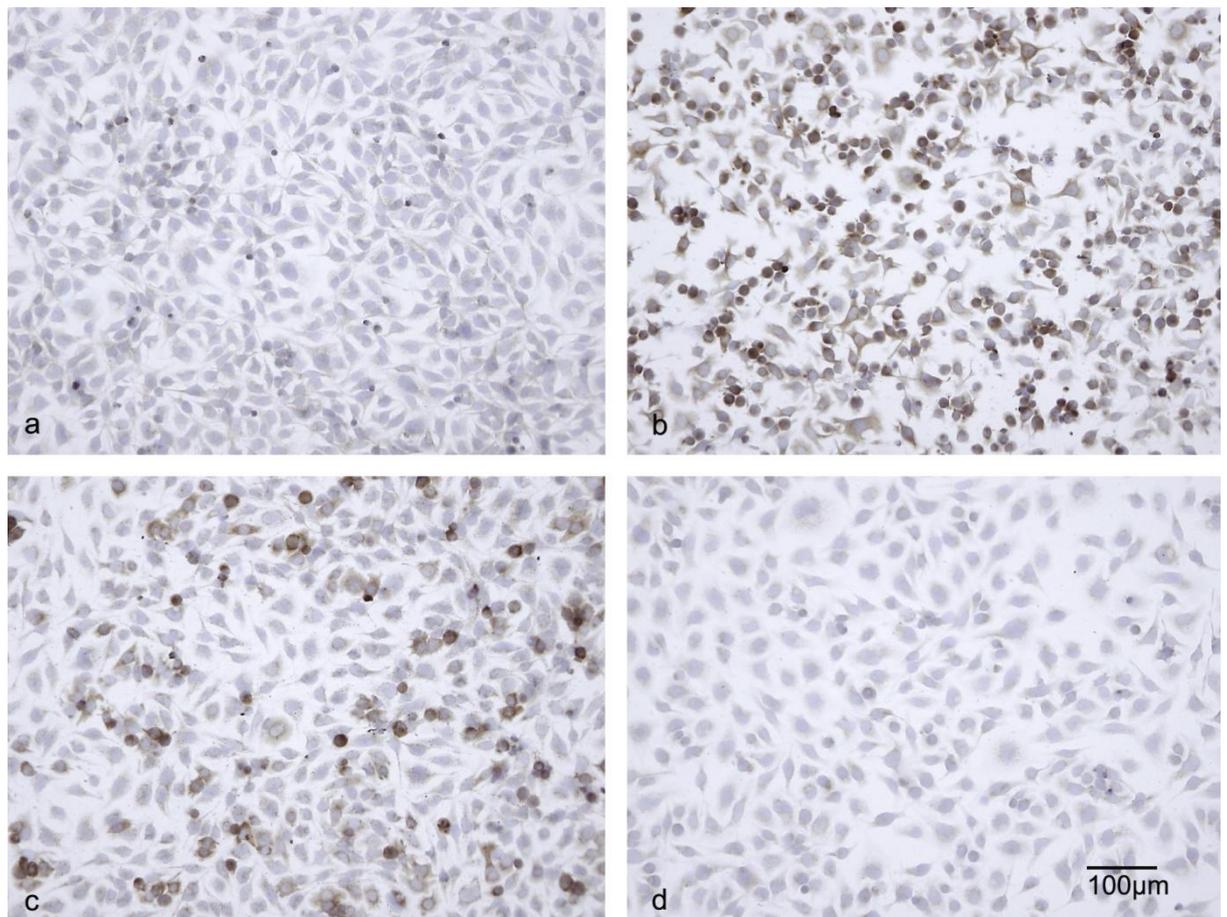


Abb. 14: Cytokeratinfärbung auf murinen EMT6-Zellen (a), humanen FaDu-Zellen (b) und einer Mischung aus EMT6- und FaDu-Zellen (c). Zur Kontrolle (d) wurde eine Mischung aus EMT6- und FaDu-Zellen ohne Primärantikörper gefärbt.

verschiedener Xenografts humaner HNSCC-Linien zeigte diese Färbung gegenüber dem umgebenden Mausegewebe klar abgegrenzte Tumoreale (Daten nicht gezeigt).

4.2 Studie an 10 humanen HNSCC-Linien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Studie zum Zusammenhang des Glukosestoffwechsels und der Strahlentherapie an 10 xenotransplantierten humanen HNSCC-Linien abgeschlossen und publiziert (Sattler et al., 2010b). Teilergebnisse zu 5 Linien wurden in einer früheren Publikation vorab veröffentlicht (Quennet et al., 2006). Außerdem sind die Ergebnisse dieser Studie Bestandteil mehrerer Abschlussarbeiten: einer weiteren naturwissenschaftlichen Doktorarbeit (Quennet, 2007) einer Diplomarbeit (Fabian, 2009) und zweier medizinischer Doktorarbeiten (Hörner, 2010 und Knörzer, in Vorbereitung).

4.2.1 Biolumineszenzmessungen

Die Ergebnisse der Biolumineszenzmessungen der Metabolite Laktat, ATP, Glukose und Pyruvat von Experimentaltumoren zehn verschiedener humaner

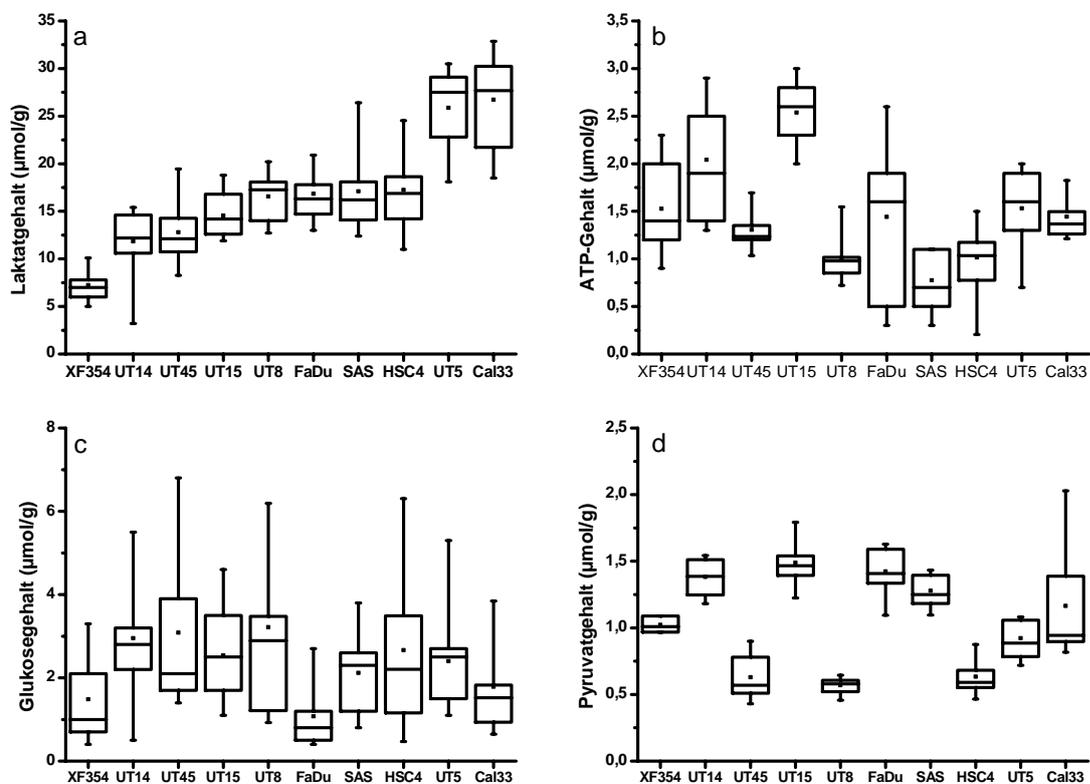


Abb. 15: Laktat- (a), ATP- (b), Glukose- (c) und Pyruvatgehalt (d) in 10 xenotransplantierten, humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien. Dargestellt sind jeweils Mittelwert (Quadrat), Median (Strich), 25 und 75% Quartile (Box) sowie Minimal und Maximalwerte (Whisker), die Tumorklinien sind nach aufsteigendem Laktatgehalt angeordnet.

Plattenepithelkarzinom-Zelllinien, insgesamt 110 Tumoren, sind in Abb. 15 zusammengefasst. Eine große Spannweite zeigt sich bei den gemessenen Laktatgehalten (Abb. a), der von 7,2 $\mu\text{mol/g}$ in XF354 bis 26,7 $\mu\text{mol/g}$ in CAL33 reicht. Nur knapp unter diesem Wert liegt UT-SCC 5 mit 25,9 $\mu\text{mol/g}$ Laktat. Sieben der untersuchten Tumorklinien liegen mit einem Laktatgehalt von 11,8 bis 17,5 $\mu\text{mol/g}$ zwischen diesen Extremen. Die anderen Metabolitgehalte sind insgesamt deutlich niedriger und schwanken weniger. Der mittlere ATP-Gehalt (Abb. 15b) ist mit 2,5 $\mu\text{mol/g}$ am höchsten in UT-SCC 15 und am niedrigsten in SAS (0,8 $\mu\text{mol/g}$). Auffällig ist auch eine hohe Schwankung des ATP-Gehaltes innerhalb der Linie FaDu, hier wurde ein Gehalt zwischen 0,3 und 2,6 $\mu\text{mol/g}$ für die einzelnen Tumoren gemessen. Etwas größer sind die Schwankungen im Glukosegehalt (Abb. 15c) der von 1,1 $\mu\text{mol/g}$ in FaDu bis zu 3,2 $\mu\text{mol/g}$ in UT-SCC 8 reicht. Innerhalb der einzelnen Linien treten ebenfalls relativ große Unterschiede auf, so reichen die Tumormittelwerte in HSC4 z.B. von 0,5 bis 6,3 $\mu\text{mol/g}$ Glukose. Abgesehen von CAL33 ist der Pyruvatgehalt (Abb. 15d) innerhalb der Linien relativ konstant. Zwischen den Linien treten allerdings große Unterschiede auf und einige Linien weisen keine Überschneidung der Werte auf. Insbesondere die Linien UT-SCC 45, HSC4 und UT-SCC 8 haben einen niedrigen Pyruvatgehalt (je 0,6 $\mu\text{mol/g}$). In UT-SCC 15 wurden 1,5 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat und damit der höchste Gehalt gemessen, einige

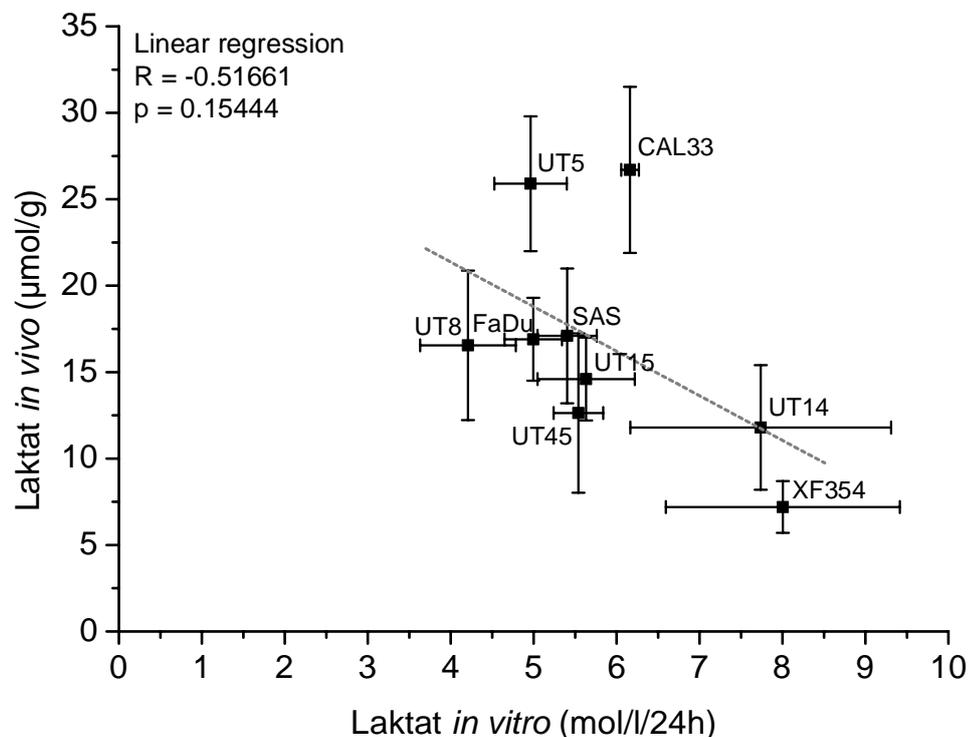


Abb. 16: Laktatgehalt *in vivo* (in $\mu\text{mol/g}$) und Laktatproduktion *in vitro* (mol/l/24 h.)

andere Linien, z.B. UT-SCC 14 und FaDu liegen nur wenig darunter (je 1,4 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat). Zwischen den mittleren Metabolitgehalten der zehn HNSCC-Linien konnten keine Korrelationen festgestellt werden.

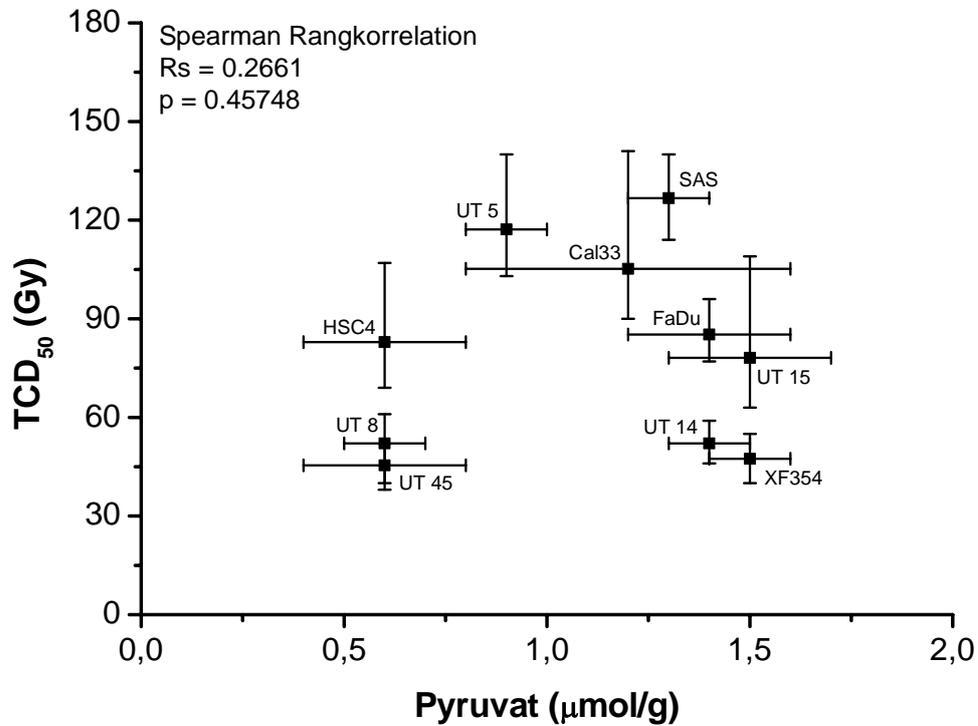


Abb. 17: TCD₅₀ und Pyruvatgehalt in 10 humanen HNSCC-Linien.

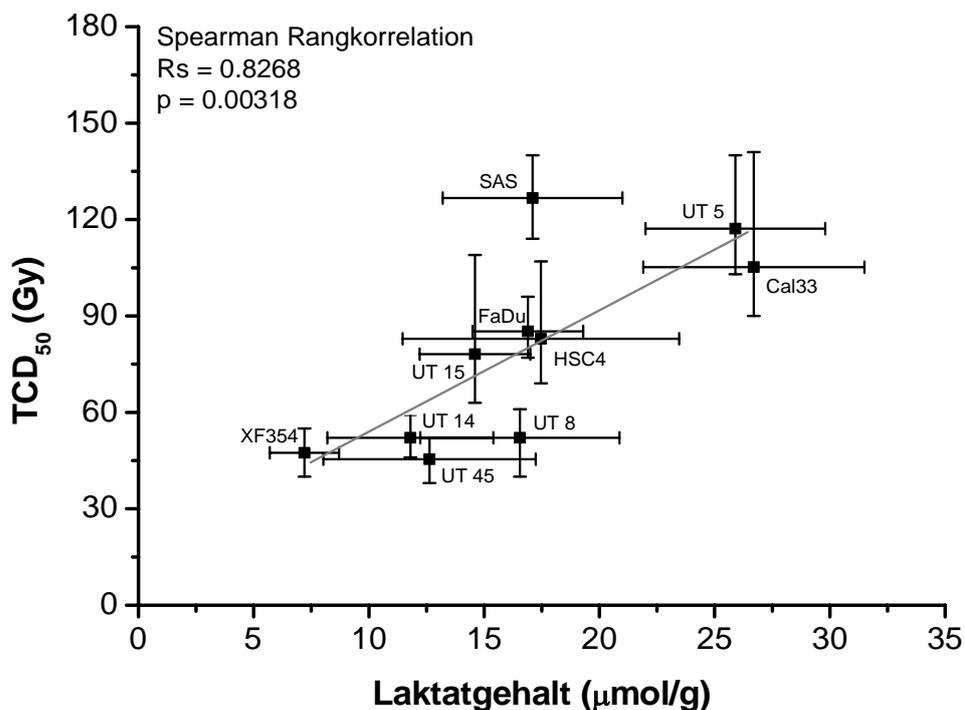


Abb. 18: TCD₅₀ und Laktatgehalt in 10 humanen HNSCC-Linien.

Ein Vergleich des Laktatgehaltes *in vivo* und der Laktatproduktion *in vitro* im Monolayer sollte Aufschluss darüber geben, ob der Laktatgehalt im Tumor durch eine unterschiedliche Laktatproduktion der Tumorzelllinien bedingt wird. In Abb. 16 sind diese beiden Parameter gegeneinander aufgetragen. Es zeigt sich die Tendenz, dass Tumorzelllinien mit einem mittleren oder hohen Laktatgehalt *in vivo* eine niedrigere Laktatproduktion innerhalb von 24 h aufweisen, während die beiden Linien UT-SCC 14 und XF354 mit einem niedrigen Laktatgehalt *in vivo* mit etwa 8 mol Laktat pro l Zellvolumen und 24 h eine recht hohe Laktatproduktion aufweisen. Es handelt sich allerdings nicht um einen statistisch signifikanten Zusammenhang.

Neben der metabolischen Charakterisierung der zehn xenotransplantierten HNSCC-Linien war ein Endpunkt dieser Studie die Bestimmung der Strahlenresistenz in Form der TCD₅₀ durch die Arbeitsgruppe von Prof. Baumann in Dresden. Besonders interessant erscheint die Frage, ob zwischen dem Gehalt von Pyruvat und Laktat und der Strahlenresistenz der Xenografts eine Korrelation besteht. Die graphische Auftragung der TCD₅₀ gegen diese Metabolite zeigen Abb. 17 (Pyruvat) und Abb. 18 (Laktat). Nur zwischen dem Laktatgehalt der Experimentaltumoren und der TCD₅₀ besteht eine Korrelation (Abb. 18). Tumorzelllinien mit einem niedrigen Laktatgehalt, etwa XF354 oder UT-SCC 14, besitzen eine niedrige Strahlenresistenz, während Tumorzelllinien mit einem hohen Laktatgehalt durch eine hohe Strahlenresistenz gekennzeichnet sind.

4.2.2 Expressionsanalysen

Ein Teil des kryokonservierten Tumorgewebes wurde für Expressionsstudien glykolytisch relevanter Gene verwendet. Für die Analyse der LDH-A Proteinexpression wurde in Tumormaterial von parallel erzeugten Xenografts, deren Aufarbeitung von Dr. C. Bayer in München durchgeführt wurde. Die Expressionsprofile von glut1 (Abb. 19a) und ldh-a mRNA (Abb. 19b) und pfk-l (Abb. 19c) weisen einige Ähnlichkeiten auf. In allen Fällen ist die Expression in UT-SCC 15 am höchsten (3,7; 5,2 bzw. 2,8) gefolgt von FaDu (2,1; 2,3 bzw. 1,1). UT-SCC 5 zeigt, abgesehen von glut1 in SAS (0,5) die niedrigste Expression der drei mRNAs (glut1 = 0,8; ldh-a = 0,7 und pfk-l = 0,4). In acht Linien ist pfk-l das am schwächsten exprimierte der drei Gene.

Die größte relative LDH-A Proteinexpression wurde in CAL33 nachgewiesen, gefolgt von UT-SCC 45 (2,2; Abb. 19d), mit 1,1 am niedrigsten war sie in SAS. Zwischen der ldh-a mRNA- und LDH-A Proteinexpression besteht kein direkter Zusammenhang, z. B. ist die mRNA Expression in UT-SCC 15 sehr hoch, die Proteinexpression liegt im Vergleich zu den anderen Linien allerdings nur im mittleren Bereich. Ein Vergleich der

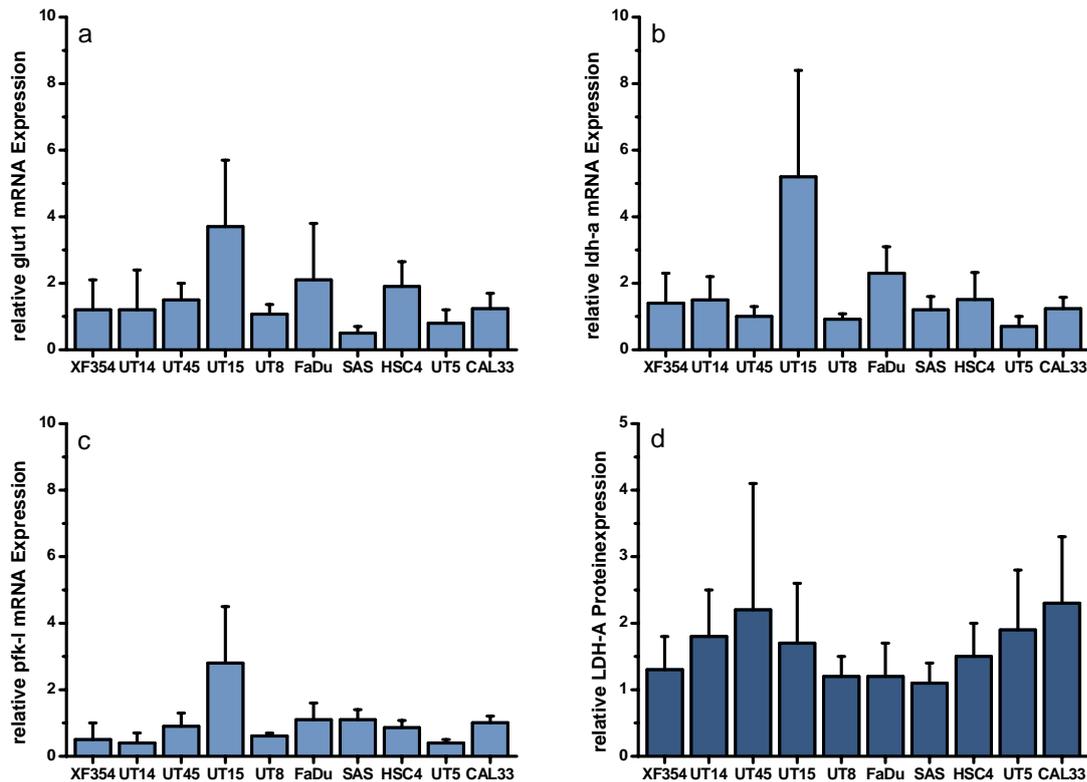


Abb. 19: Relative mRNA-Expression (MW + SD) der Gene glut1 (a), ldh-a (b) und pfk-l (c) sowie der relativen LDH-A Proteinexpression (d). Real-time PCR-Analysen wurden als Dreifachbestimmung jedes Tumors von 10-13 Tumoren je Linie, Western Blot-Analysen mit je 5 Tumoren pro Linie durchgeführt. Die Tumorklinien sind nach aufsteigendem Laktatgehalt angeordnet.

Expressionsdaten mit dem für die Linien ermittelten Laktatgehalt sowie der übrigen Metabolite ATP, Glukose und Pyruvat ergab keine Korrelation. Zwar zeigen die beiden Linien UT-SCC 5 und CAL 33 sowohl sehr hohe Laktatgehalte als auch eine hohe LDH-A Proteinexpression, die beiden Linien UT-SCC 14 und UT-SCC 45 weisen jedoch trotz hoher Proteinmengen niedrige Laktatgehalte auf.

4.2.3 CD45 Färbung

Um den Einfluss tumor-infiltrierender Leukozyten auf die Messung der Metabolitgehalte abschätzen zu können, wurde jeweils ein Schnitt pro Tumor immunhistochemisch gegen CD45 gefärbt. Für die Linie FaDu konnte diese Färbung nicht durchgeführt werden, da keine Schnitte zur Verfügung standen.

Abb. 20 zeigt zwei repräsentative Färbungen verschiedener Xenograft-Schnitte. In Abb. 20a ist ein Schnitt der Tumorklinie CAL33 gezeigt, der nur wenige, einzelne CD45-positive Zellen aufweist, dieser Schnitt wurde in Kategorie 1 eingeordnet. Ein Schnitt der als Kategorie 3 eingestuft wurde, ist die Färbung eines HSC4-Präparates in Abb. 20b. In diesem Schnitt ist eine größere Anzahl CD45-positiver Zellen sichtbar, zum Teil kommen

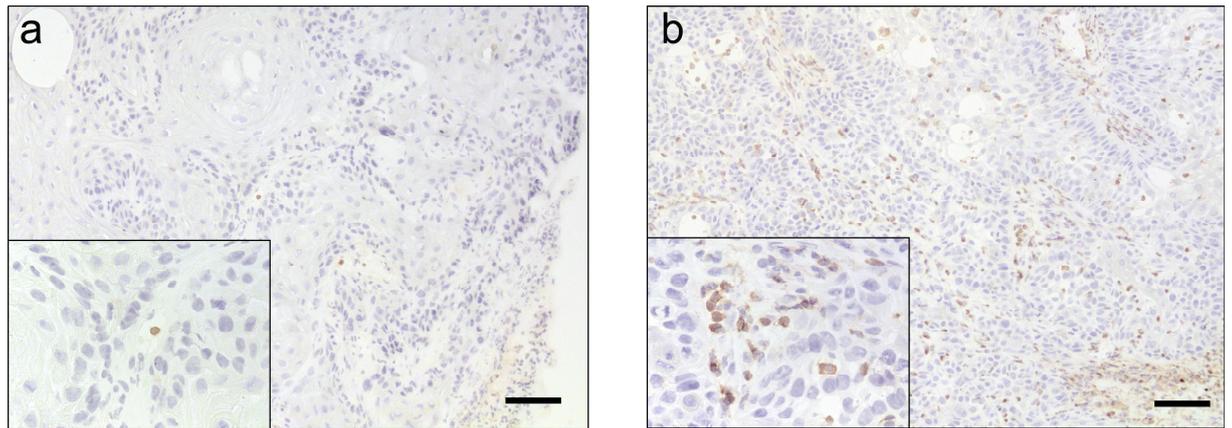


Abb. 20: Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Tumoren mit niedriger (a, CAL33) und hoher (b, HSC4) CD45 Expression, Maßstab: 0,1 mm.

diese in kleineren und größeren Gruppen vor. Insgesamt war die Anzahl der im Tumor vorkommenden Leukozyten aber gering. Auch in der Kategorie 3 zugeordneten Schnitten überstieg sie nie einen Anteil von 15 %.

In Tab. 11 sind die Ergebnisse der histologischen Auswertung aller neun untersuchten Linien zusammengefasst. Der aus der Kategoriewertung dreier unabhängiger Auswerter ermittelte Median zeigt keine großen Unterschiede, alle Tumorklinien weisen eine niedrige bis mittlere Leukozyteninfiltration auf. Ein offensichtlicher Zusammenhang mit dem Laktatgehalt der Xenografts besteht nicht. Die

Tab. 11: Bewertung der CD45-gefärbten Schnitte durch drei unabhängige Auswerter. Angegeben ist jeweils die Anzahl der Bewertung in jeder Kategorie, der Median der Bewertung und die Anzahl (n= 6-12) der Schnitte pro Tumorklinie, die ausgewertet wurden sowie deren Laktatgehalt. Für FaDu standen keine Schnitte für die Färbung zur Verfügung.

Tumor- linie	Kategorie				Median	n	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)
	0	1	2	3			
XF354	2	13	18	3	2	12	7,2
UT14	4	10	13	9	2	12	11,8
UT45	3	13	13	6	2	12	12,6
UT15	5	8	4	1	1	6	14,6
UT8	2	9	9	4	2	8	16,6
FaDu	-	-	-	-	-	0	16,9
SAS	4	18	10	4	1	12	17,1
HSC4	4	7	16	9	2	12	17,5
UT5	3	19	14	0	1	12	25,9
CAL33	6	21	6	0	1	11	26,7

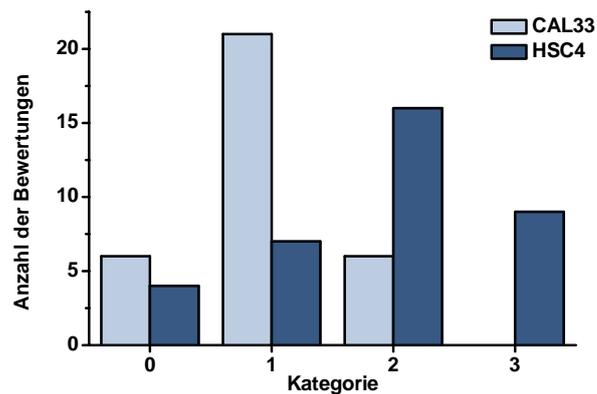


Abb. 21: Bewertung der CAL33 und HSC4 Schnitte.

Linien mit den größten Unterschieden in der CD45 Expression, CAL33 und HSC4, zeigten beide einen hohen Laktatgehalt. Die drei Linien XF354, UT-SCC 14 und UT-SCC 45 mit den niedrigsten Laktatgehalten in dieser Studie enthielten mehr CD45-positive Zellen als Linien mit höheren Laktatgehalten.

Ein Vergleich der Einzelbewertungen der Linien mit der höchsten und niedrigsten Leukozytendichte (Abb. 21) zeigt die Unterschiede zwischen den beiden Tumorklinien deutlich. Der größte Teil der CAL33-Schnitte wurden der Kategorie 1 zugeordnet, nur wenige den Kategorien 0 und 2, kein Schnitt fällt in Kategorie 3. Im Gegensatz dazu fallen bei HNSC4 über zwei Drittel der Schnitte in die oberen Kategorien 2 und 3, nur wenige Schnitte sind in die Kategorien 1 und 2 eingeordnet.

4.3 Vergleich von 2 HNSCC-Linien während fraktionierter Strahlentherapie

4.3.1 Expressionsanalyse glykolyse-assoziiierter Gene

Zur Validierung des verwendeten Referenzgenes TBP wurde dessen Expression vor und im Verlauf einer fraktionierten Strahlentherapie verglichen (Abb. 22). In den untersuchten Xenografts der beiden Tumorklinien wird TBP stabil und gleichmäßig exprimiert. In UT-SCC 14 (Abb. 22a) wurde für die Gruppe der unbestrahlten Tumoren ein mittlerer ct-Wert von 26,27 gemessen nach 10 Fraktionen beträgt er nahezu unverändert 26,29. In UT-SCC 5 (Abb. 22b) liegt der ct-Wert für unbestrahlter Proben etwas niedriger (25,37), schwankt im Verlauf der Strahlentherapie nur wenig und beträgt nach 15 Fraktionen 25,15.

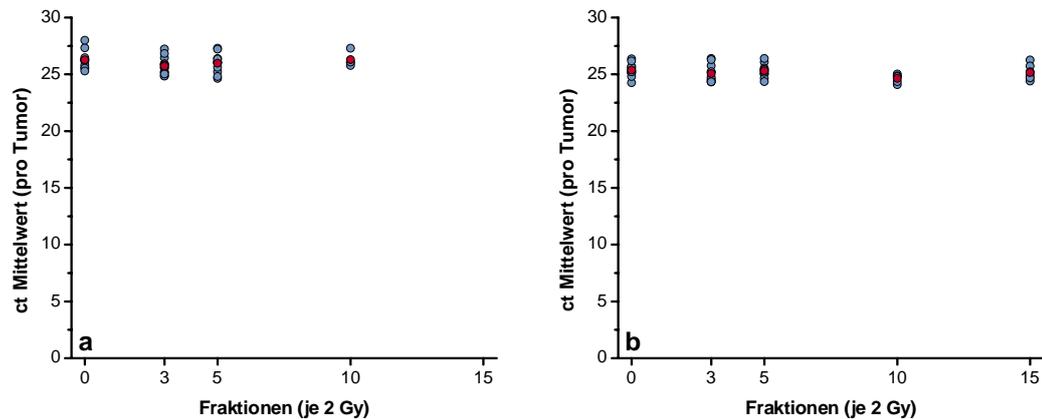


Abb. 22: Der ct-Wert als Maß für die mRNA-Expression des TATAbox-binding Proteins (tbp) im Verlauf der fraktionierten Bestrahlung in den Tumorlinien UT-SCC-14 (a) und UT-SCC-5 (b). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte eines Tumors (n=3, blaue Symbole) sowie der Gruppenmittelwert (N= 4-11; rote Symbole).

Die relative Expression der sechs glykolyse-assoziierten Gene *gpi*, *mct1*, *hk2*, *pkm2*, *pdk1* und *pfk2* im Verlauf einer fraktionierten Röntgentherapie offenbart deutliche Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Plattenepithelkarzinom-Zelllinien (Abb. 23). Mit Ausnahme von *pkm2* werden alle untersuchten Gene in UT-SCC 14 stärker exprimiert als in UT-SCC 5. Insbesondere die *hk2*-Expression ist mit 7,05 in unbestrahlten UT-SCC 14 Tumoren gut fünf mal so hoch wie in UT-SCC 5 Tumoren (1,8), die anderen Gene werden etwa 1,3 bis 2 mal höher exprimiert. Außerdem treten im Verlauf der fraktionierten Strahlentherapie in der Linie UT-SCC 5 lediglich geringe, nicht signifikante Änderungen in der Expression der sechs Gene auf. Im Gegensatz dazu wurde in UT-SCC 14 bei fünf Genen signifikante Änderungen festgestellt. Lediglich das Gen *pkm2* zeigt keine signifikanten Expressionsänderungen, allerdings nehmen die Werte tendenziell bei höheren Fraktionen ab.

Das Gen *gpi* in unbestrahlten Proben der Linie UT-SCC 14 wird etwa doppelt so stark exprimiert wie UT-SCC 5 (Abb. 23a). Während in UT-SCC 5 die Expression praktisch unverändert bleibt, wird sie in UT-SCC 14 zunächst leicht erhöht (0,96 nach 3 Fraktionen), sinkt aber nach 10 Fraktionen unter den Ausgangswert ab (0,58). Sehr ähnliche Expressionsmuster zeigen die Gene *mct1* (Abb. 23b), *hk2* (Abb. 23c), *pdk 1* (Abb. 23e) und *pfk2* (Abb. 23f)-Expression, alle werden nach der Bestrahlung mit drei Fraktionen in UT-SCC 14 signifikant höher exprimiert als in unbestrahlten Proben und nach zehn Fraktionen zeigt sich ein signifikanter Abfall, während die Expression in UT-SCC 5 nahezu unverändert bleibt.

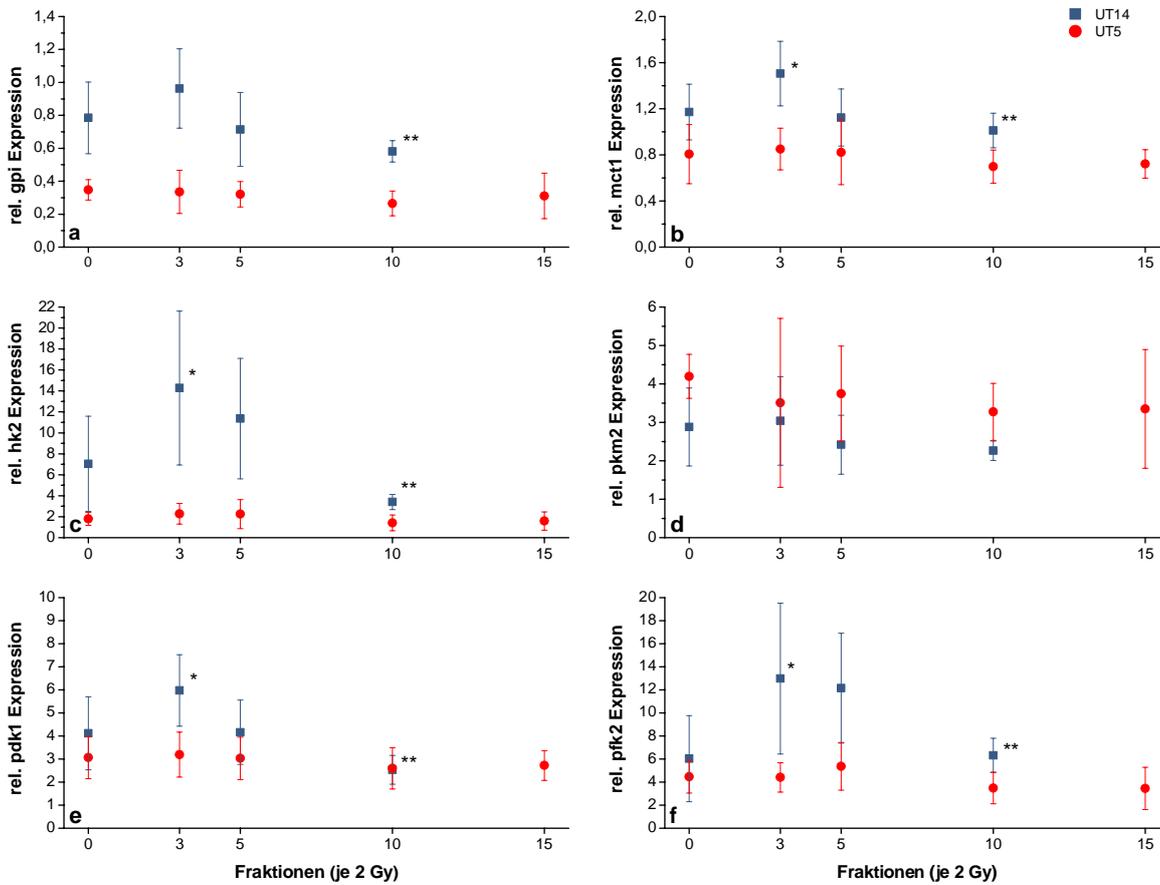


Abb. 23: Relative mRNA-Expression (MW±SD) der Gene Glukosephosphatisomerase (gpi, a), Monocarboxylattransporter 1 (mct1, b), Hexokinase 2 (hk2, c), Pyruvatkinase M2 (pkm2, d), Pyruvatdehydrogenase Kinase 1 (pdk1, e) und Phosphofruktokinase 2 (pfk2, f) in Tumorfragmenten der Linien UT-SCC 14 (blau) und UT-SCC 5 (rot). Die Expression wurde im Vergleich zu einem internen Kalibrator und dem Referenzgen *tbp* ermittelt. N= 4-13 Tumoren pro Behandlungsgruppe, ein Stern kennzeichnet signifikante Unterschiede zwischen 0 und 3 Fraktionen, zwei Sterne zwischen 3 und 10 Fraktionen ($p < 0,05$).

4.3.2 Biolumineszenzmessungen

Aus den 45 analysierten Tumoren der als strahlenempfindlich charakterisierten Linie UT-SCC 14 wurden zwei für den jeweiligen Bestrahlungszeitpunkt repräsentative Tumoren ausgewählt, deren Laktatgehalt dem Gruppenmittelwert entspricht, und eine Falschfarbenkalibrierung erstellt (Abb. 24). Die ATP-Messung des mit drei Fraktionen (6 Gy) bestrahlten Tumors (Abb. 24a) zeigt einen relativ gleichmäßig und hohen ATP-Gehalt im vitalen Tumorgewebe (Areal innerhalb der schwarzen Maske), eine im Gewebe enthaltene Nekrose ist dazu klar abgegrenzt. Diese und der untere Teil des Schnittes, der sich aus Haut und Bindegewebe zusammensetzt, enthalten wenig bis kein nachweisbares ATP. Ein sehr hoher ATP-Gehalt über 2 $\mu\text{mol/g}$ wurde im an den Tumor

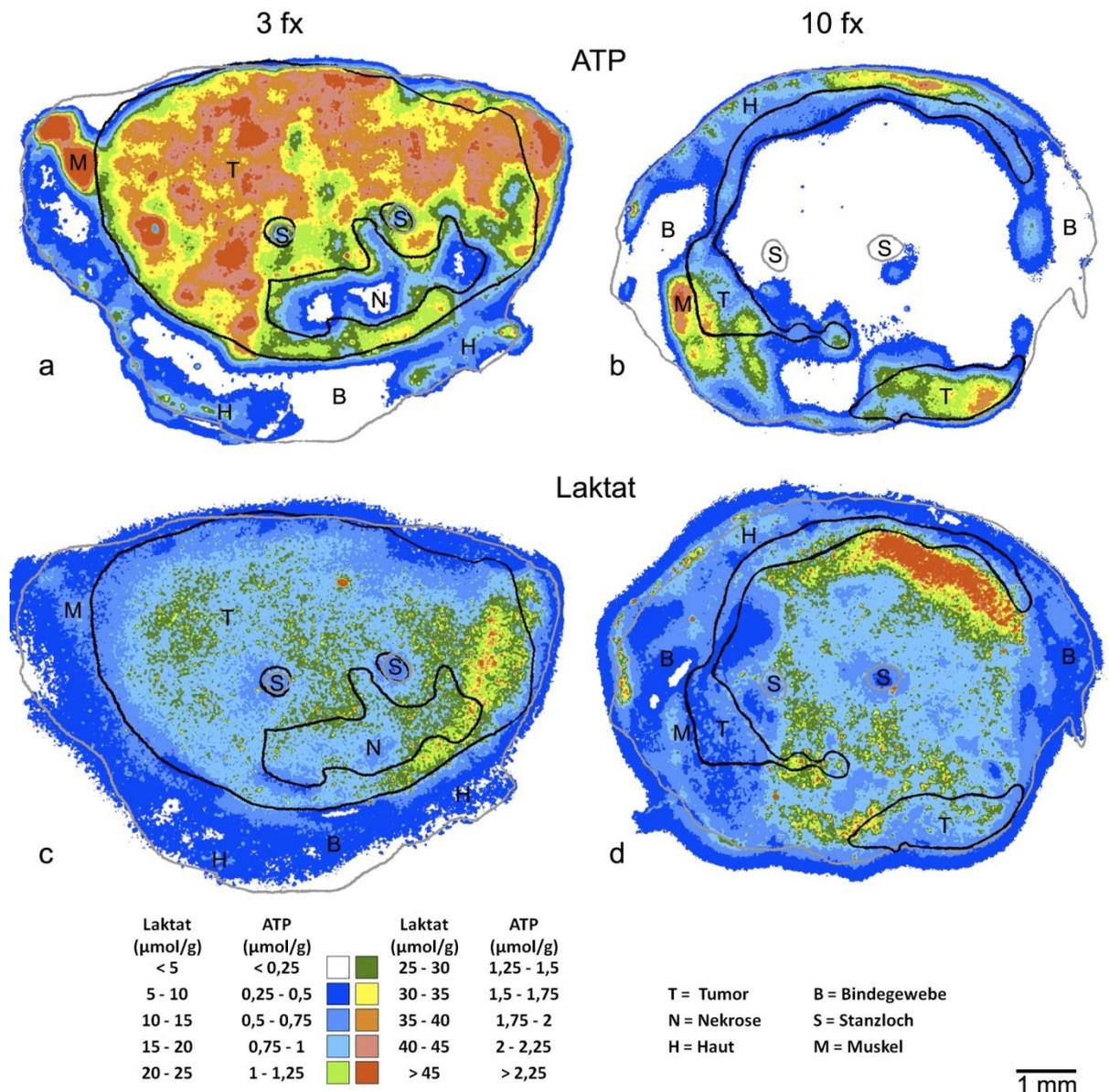


Abb. 24: Falschfarbenkalibrierte ATP- (a und b) und Laktatmessungen (c und d) in einem mit 3 Fraktionen (3 fx, a und c) und einem mit 10 Fraktionen (10 fx, b und d) bestrahlten Tumor der Linie UT-SCC 14. Schwarze Maske: Umriss des vitalen Tumorgewebes, graue Linie: Umriss des gesamten Schnittes.

angrenzenden Muskel links oben nachgewiesen. Die ATP-Falschfarbenkalibrierung des mit 10 Fraktionen bestrahlten Tumors liefert ein deutlich anderes Bild (Abb. 24b). Große Teile des Schnittes enthalten kein ATP und erscheinen nekrotisch. Lediglich ein schmaler, vitaler Tumorbereich umgibt die zentrale Nekrose, der allerdings niedrigere ATP-Gehalte aufweist, die zum Teil auf dem Niveau des umliegenden Hautgewebes liegen. Nur im unteren Bereich des Schnittes treten Werte über $1 \mu\text{mol/g}$ ATP auf. Ein ATP-Gehalt um $2 \mu\text{mol/g}$ wurde in einem kleinen Bereich Muskelgewebe detektiert. Im Tumorgewebe des mit 3 Fraktionen bestrahlten Schnittes liegt Laktat recht homogen verteilt vor (Abb. 24c), nur im rechten Bereich befindet sich ein Streifen mit höheren

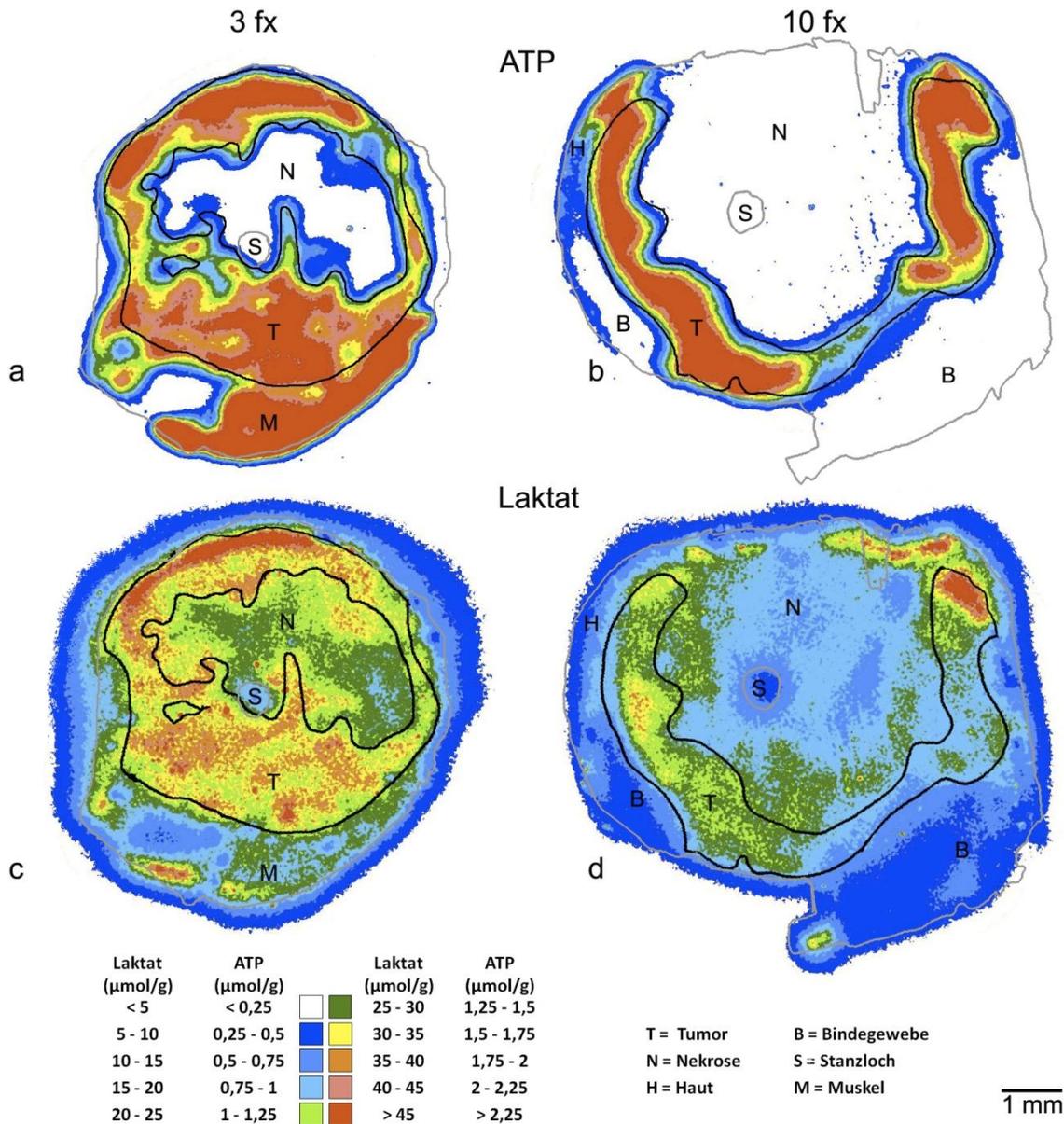


Abb. 25: Falschfarbenkalibrierte ATP- (a und b) und Laktatmessungen (c und d) in einem mit 3 Fraktionen (3 fx, a und c) und einem mit 10 Fraktionen (10 fx, b und d) bestrahlten Tumor der Linie UT-SCC 5. Schwarze Maske: Umriss des vitalen Tumorgewebes, graue Linie: Umriss des gesamten Schnittes.

Werten. In Haut, Muskel und Bindegewebe ist der Laktatgehalt konstant niedrig um ca. 10 µmol/g. Der mit 10 Fraktionen bestrahlte Schnitt (Abb. 24d) enthält deutlich weniger Laktat im vitalen Tumorgewebe. Im Gegensatz dazu liegt im nekrotischen Areal relativ viel Laktat vor und erreicht Höchstwerte von über 45 µmol/g in einem Bereich, der an den Tumorstreifen angrenzt.

In fraktioniert bestrahlten Tumoren der Linie UT-SCC 5 bietet sich ein anderes Bild. Nach drei Fraktionen (Abb. 25a) ist der ATP-Gehalt im vitalen Tumorgewebe unverändert hoch. Auch im an den Tumor angrenzenden Muskel ist der ATP-Gehalt sehr hoch und liegt über 2,25 µmol/g. In mit 10 Fraktionen bestrahlten Tumoren der Linie UT-SCC 5 ist

der ATP-Gehalt im vitalen Tumorgewebe, im Gegensatz zu UT-SCC-14, nahezu unverändert hoch, aber niedrig im angrenzenden Bindegewebe. Die nekrotischen Areale des Schnittes sind jedoch größer geworden. Der durchschnittliche Laktatgehalt im vitalen Tumorgewebe des mit 3 Fraktionen bestrahlten Tumors (Abb. 25c) ist sehr hoch aber niedrig im angrenzenden Muskelgewebe. Im mit 10 Fraktionen bestrahlten Tumorgewebe (Abb. 25d) ist der Laktatgehalt deutlich niedriger. Im angrenzenden Bindegewebe liegt nur wenig Laktat (5-10 $\mu\text{mol/g}$) vor, die nekrotischen Areale weisen einen intermediären Laktatgehalt auf. Diese an einzelnen Tumorschnitten gemachten Beobachtungen spiegeln sich in den für die jeweiligen Behandlungsgruppen errechneten Mittelwerten wieder (Abb. 26).

Der ATP-Gehalt in Experimentaltumoren der Linie UT-SCC 14 ist vor Beginn der fraktionierten Röntgentherapie mit 1,58 $\mu\text{mol/g}$ hoch und in mit drei und fünf Fraktionen bestrahlten Tumoren nur wenig niedriger (1,56 bzw. 1,47 $\mu\text{mol/g}$). Nach einer Behandlung mit 10 Fraktionen fällt der ATP-Gehalt im vitalen Tumorgewebe signifikant auf 0,87 $\mu\text{mol/g}$ ab. Nur zwei der mit 15 Fraktionen bestrahlten UT-SCC 14 Tumoren konnten ausgewertet werden, in allen anderen waren nur noch sehr kleine vitale Tumoreareale und große nekrotische Areale vorhanden. In den beiden untersuchten Tumoren lag der ATP-Gehalt im vitalen Gewebe allerdings noch unter dem Mittelwert der mit 10 Fraktionen behandelten Tumoren. Im Gegensatz dazu liegt der anfängliche ATP-Gehalt in UT-SCC 5 Tumoren mit 1,38 $\mu\text{mol/g}$ etwas unter dem von UT-SCC 14. Allerdings bleibt der ATP-Gehalt im vitalen Tumor in UT-SCC 5 im Verlauf der

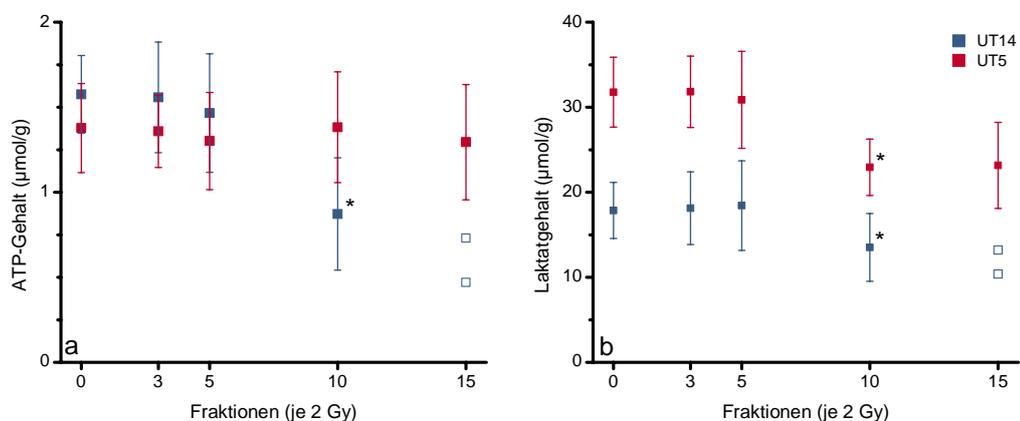


Abb. 26: ATP- (a) und Laktatgehalt (b) \pm Standardabweichung in Tumorschnitten der Linien UT-SCC 14 (blau) und UT-SCC 5 (rot) vor und im Verlauf der fraktionierten Röntgenbestrahlung. Geschlossene Symbole: Mittelwerte \pm SD von 10-13 Tumoren mit je 4 Messungen Offene Symbole: Mittelwerte aus je 4 Messungen eines Tumors.

fraktionierten Bestrahlung sehr konstant und liegt nach 15 Fraktionen bei 1,29 $\mu\text{mol/g}$. Anfänglich ist der Laktatgehalt in Tumoren der Linie UT-SCC 5 knapp doppelt so hoch wie in UT-SCC 14 (31,77 bzw. 17,86 $\mu\text{mol/g}$, Abb. 26b). Im Verlauf der fraktionierten Strahlentherapie bleibt der Laktatgehalt in beiden Linien zunächst nahezu unverändert, sinkt aber nach 10 Fraktionen signifikant auf 22,94 $\mu\text{mol/g}$ in UT-SCC 5 und 13,52 $\mu\text{mol/g}$ in UT-SCC 14 ab.

4.3.3 CD45-Färbung

Die Auswertung der CD45-Färbung gibt Aufschluss über die Infiltration der Tumoren durch Abwehrzellen, die das metabolische Milieu im Tumor beeinflussen könnten. Die Bewertung dieser Färbung wurde von zwei Auswertern unabhängig durchgeführt, indem jeder Schnitt einer Kategorie zwischen 0 und 3 zugeordnet wurde. Die Kategorien wurden wie folgt definiert: In Kategorie 0 sind keine CD45-positiven Zellen im Tumorgewebe sichtbar, ein Beispiel für einen Tumorschnitt der Kategorie 1 ist in Abb. 27a dargestellt. Ein Tumor, in dem wenige CD45-positive Zellen einzeln oder in kleineren Gruppen vorhanden sind, wurde als Kategorie 1 eingestuft. In Kategorie 2 wurden Tumorschnitte erfasst, die Ansammlungen von CD45-positiven Zellen in einzelnen Bereichen oder eine insgesamt größere Menge dieser Zellen aufwiesen. Alle Tumoren, die großflächige Areale mit hohen Dichten CD45-positiver Zellen aufwiesen wurden Kategorie 3 zugerechnet, ein Beispiel dafür ist in Abb. 27b gezeigt. In Abb. 28 ist die Verteilung der Bewertungen, nach der Anzahl der Fraktionen sortiert, dargestellt. Insgesamt sind UT-SCC 14 Tumoren stärker von CD45-positiven Zellen infiltriert als UT-SCC 5 Tumoren, hier wurde kein Schnitt in Kategorie 0 eingestuft. Außerdem zeigt sich in beiden Zelllinien mit steigender Fraktionenzahl eine Verschiebung der

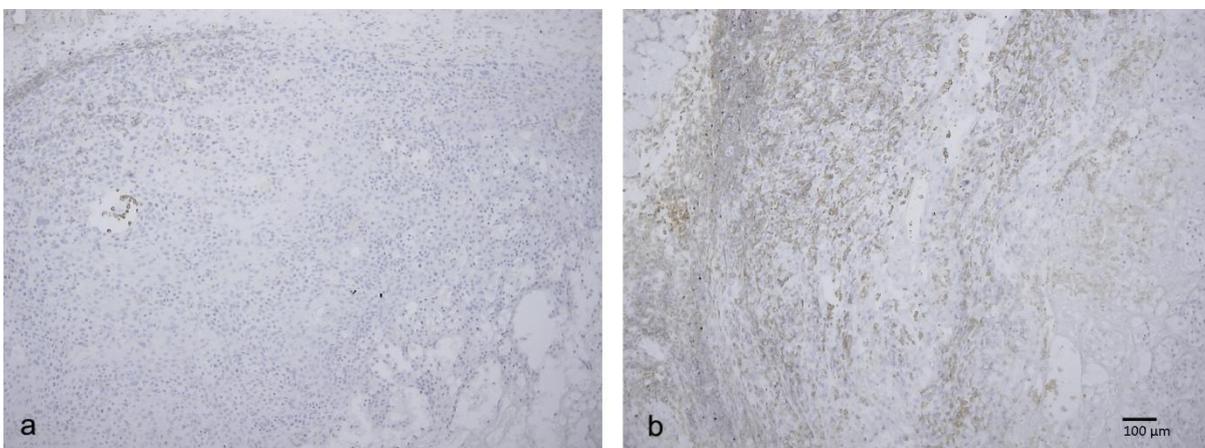


Abb. 27: Repräsentative Aufnahmen eines als Kategorie 1 (a) und eines als Kategorie 3 (b) eingestuften Tumors der Linie UT-SCC 14.

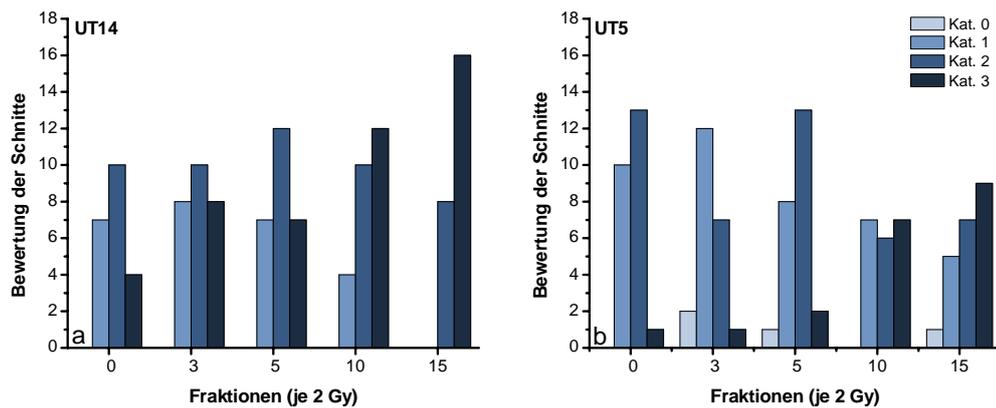


Abb. 28: Bewertung der Infiltration CD45-positiver Zellen in Tumorschnitte der Linien UT-SCC 14 (a) und UT-SCC 5 (b). Summe aus zwei unabhängigen Bewertungen.

Bewertungsverteilung hin zu höheren Kategorien.

Ob ein Zusammenhang zwischen der Infiltration CD45-positiver Zellen und den mittels Biolumineszenz gemessenen ATP- und Laktatgehalten besteht, wurde mit verschiedenen Ansätzen analysiert. Eine exemplarische Überlagerung der Biolumineszenz-Aufnahmen mit einigen Schnitten der Kategorie 3 zeigt, dass zum Teil eine Überlappung von vitalem Tumorgewebe und Bereichen mit vielen CD45-positiven Zellen auftritt. Diese Bereiche weisen allerdings keine höheren Laktatgehalte auf, als umliegendes vitales Tumorgewebe ohne eine größere Ansammlung von Abwehrzellen (nicht gezeigt). Vergleicht man den Laktatgehalt mit der CD45-Bewertung, so kann in beiden Tumorklinen kein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern festgestellt werden (Abb. 29). Zum gleichen Ergebnis führte der Abgleich von ATP-Gehalt und CD45-Bewertung (nicht gezeigt).

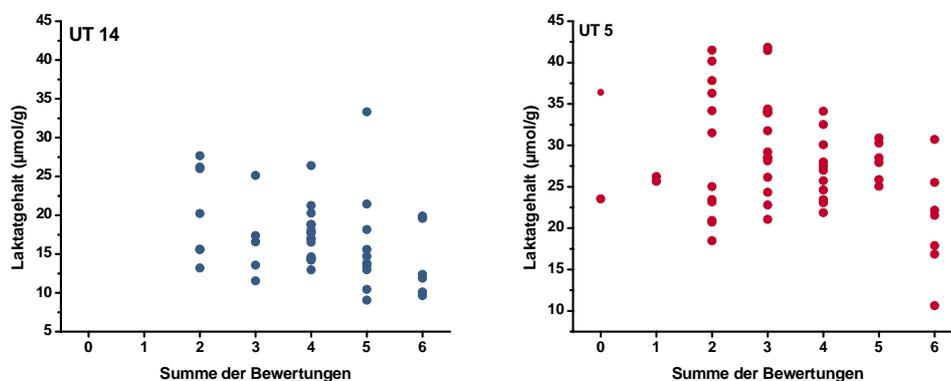


Abb. 29: Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) aufgetragen gegen die Summe der CD45-Bewertung in Tumorschnitten der Linien UT-SCC 14 (links) und UT-SCC 5 (rechts).

4.4 Inhibitionsversuche

4.4.1 Einmalige Gabe von DCA und BrPA

Um die kurzfristige Wirkung der Glykolysemodifikatoren DCA und BrPA zu testen, wurde tumortragenden Versuchstieren Brompyruvat injiziert oder DCA oral verabreicht und die Tumoren 2 Stunden später entnommen. In Kryoschnitten dieser Tumoren der beiden humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien FaDu und UT-SCC 5 wurde der ATP- und Laktatgehalt bestimmt (Abb. 30). Der ATP-Gehalt in den FaDu-Tumoren lag im Mittel zwischen 1,5 und 1,8 $\mu\text{mol/g}$ und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Abb. 30a). Lediglich die beiden Schnitte eines mit 50 mg/kg Körpergewicht DCA behandelten Tumors wiesen einen auffällig niedrigen ATP-Gehalt (0,6 bzw. 0,7 $\mu\text{mol/g}$ ATP) auf. Auch der von 1,4 bis 1,9 $\mu\text{mol/g}$ reichende ATP-Gehalt in UT-SCC 5 Tumoren zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 30b). Außerdem weisen alle Schnitte einen ATP-Gehalt von mindestens 1 $\mu\text{mol/g}$ auf. Der

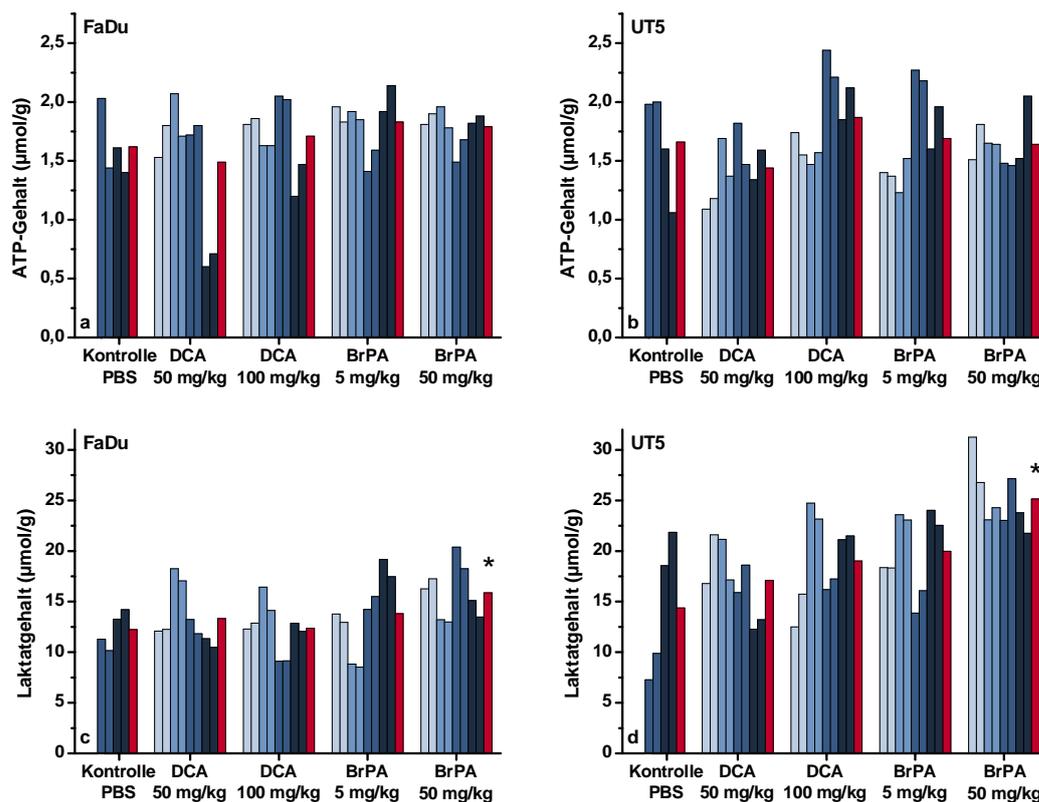


Abb. 30: ATP-Gehalt (a, b) sowie Laktatgehalt (c, d) in $\mu\text{mol/g}$ in Kryoschnitten der Tumorzelllinien FaDu (a, c) und UT-SCC 5 (b, d) nach einmaliger oraler Gabe von Dichloracetat (50 bzw. 100 mg/kg Körpergewicht) oder einmaliger Injektion von Brompyruvat ip (5 bzw. 50 mg/kg Körpergewicht) oder wirkstofffreier Pufferlösung (PBS). Innerhalb einer Behandlungsgruppe stehen zwei Balken gleicher Farbe für die Messergebnisse zweier Schnitte eines Tumors, der jeweilige Gruppenmittelwert ist rot dargestellt. Stern = signifikanter Unterschied zwischen den Behandlung und Kontrolle ($p < 0,05$).

mittlere Laktatgehalt in FaDu liegt zwischen 12,2 $\mu\text{mol/g}$ in den mit PBS behandelten Kontrollen und 15,9 $\mu\text{mol/g}$ in mit 50 mg/kg Körpergewicht BrPA injizierten Tumoren, was einen signifikanten Unterschied darstellt (Abb. 30c). In den übrigen Behandlungsgruppen lag der Laktatgehalt zwischen 12,4 und 13,8 $\mu\text{mol/g}$ und unterschied sich nicht signifikant von der Kontrolle. Der Laktatgehalt in mit 50 mg/kg Körpergewicht BrPA injizierten Tumoren lag auch in UT-SCC 5 signifikant über dem der mit PBS behandelten Kontrolle (25,1 im Gegensatz zu 13,2 $\mu\text{mol/g}$; Abb. 30d). Allerdings war der Gehalt in den beiden Schnitten eines Kontrolltumors mit 8 und 9,2 $\mu\text{mol/g}$ Laktat linienuntypisch niedrig und es war sehr wenig auswertbares vitales Tumorgewebe vorhanden. In den übrigen drei Gruppen war der Laktatgehalt mit 17,1 bis 20 $\mu\text{mol/g}$ deutlich höher als in der Kontrolle, diese Unterschiede wiesen aber keine statistische Signifikanz auf.

4.4.2 Einwöchige Gabe von DCA und CHC

In einem einwöchigen Versuch, in dem tumortragenden Mäusen entweder DCA im Trinkwasser verabreicht oder DCA oder CHC injiziert wurde, sollte untersucht werden,

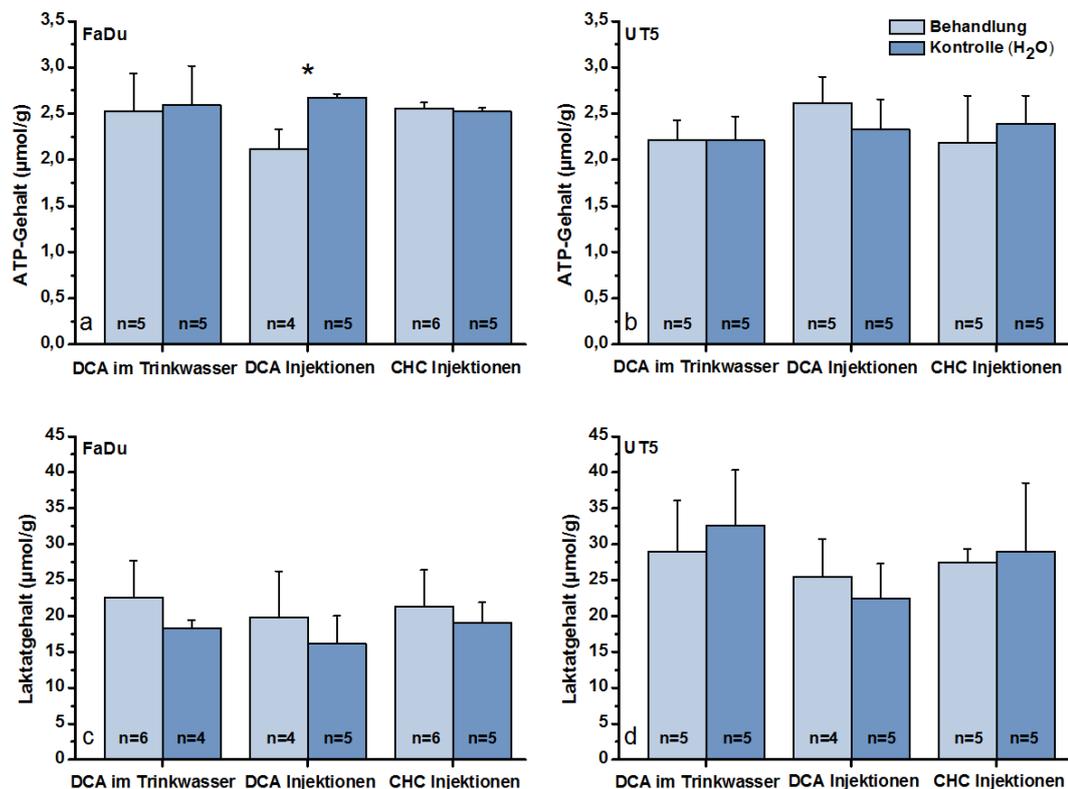


Abb. 31: ATP- (a, b) und Laktatgehalt (c, d) in Tumorschnitten der Linien FaDu (a, c) und UT-SCC 5 (b, d) nach einwöchiger Behandlung mit Dichloracetat (DCA; entweder 100 mg/kg Körpergewicht im Trinkwasser oder zweimal täglich Injektionen von 50 mg/kg Körpergewicht ip) oder α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (CHC; einmal täglich Injektion von 150 mg/kg Körpergewicht ip). Als Kontrolle wurde die jeweilige Behandlung mit Wasser durchgeführt. Stern = signifikanter Unterschied zwischen den Behandlung und Kontrolle ($p < 0,01$).

ob eine mit der Biolumineszenz messbare Veränderung des Glukosestoffwechsels erzielt werden kann. Die Ergebnisse für die beiden Tumormodelle FaDu und UT-SCC 5 für die drei Behandlungsgruppen und die jeweils mit sterilem Wasser durchgeführten Kontrollexperimente sind in Abb. 31 dargestellt. Der ATP-Gehalt in FaDu liegt in den untersuchten Proben etwas höher als in UT-SCC 5, (2,52 bis 2,67 $\mu\text{mol/g}$ ATP in FaDu bzw. 2,19 bis 2,39 $\mu\text{mol/g}$ ATP in UT-SCC 5). Nur der Gehalt der mit DCA-Injektionen behandelten Tumoren fällt in beiden Linien etwas aus dem Rahmen. In UT-SCC 5 ist er mit 2,62 $\mu\text{mol/g}$ ATP etwas höher als linientypisch, in FaDu mit 2,12 $\mu\text{mol/g}$ signifikant niedriger als in der zugehörigen Kontrollgruppe. Der Laktatgehalt weist in beiden Linien eine größere Variabilität auf und reicht in FaDu von 16,1 bis 22,6 $\mu\text{mol/g}$, in UT-SCC 5 von 22,5 bis 32,6 $\mu\text{mol/g}$, es gib jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Behandlungs- und den jeweiligen Kontrollgruppen. In Dresden von A. Yaromina durchgeführte Analysen zur Pimonidazol-hypoxischen Fraktion und zum Wachstumsverhalten der Tumoren zeigten ebenfalls keine Wirkung von DCA und CHC (persönliche Kommunikation).

Da für CHC eine Wirkungsweise postuliert wurde, die auf einer veränderten räumliche Verteilung von Glukose, Laktat und Sauerstoff im Tumor schließen lässt, wurde eine Falschfarbenkalibrierung der Biolumineszenzaufnahmen durchgeführt. Abb. 32 zeigt einen Vergleich der falschfarbenkalibrierten ATP-Aufnahmen von CHC-behandelten Tumorschnitten und den entsprechenden Kontrollen. Grundlegende Unterschiede in der Verteilung des ATPs sind nicht erkennbar, auch die Größe und Form nekrotischer Areale erscheint vergleichbar. Eine vergleichende Übersicht des in Falschfarben dargestellten Laktatgehaltes gibt Abb. 33 wieder. Auch hier treten keine

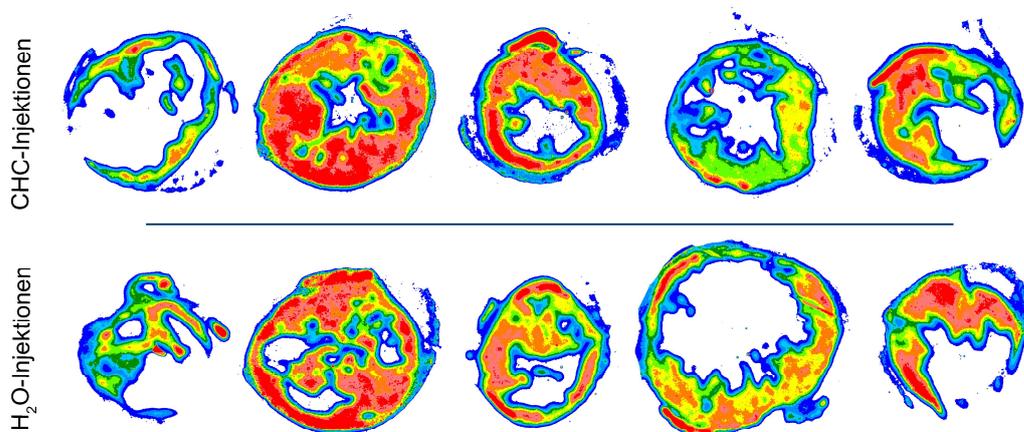


Abb. 32: Falschfarbenkalibrierte ATP-Biolumineszenzaufnahmen von mit CHC (oben) bzw. H₂O-behandelten Tumoren der Linie UT-SCC 5.

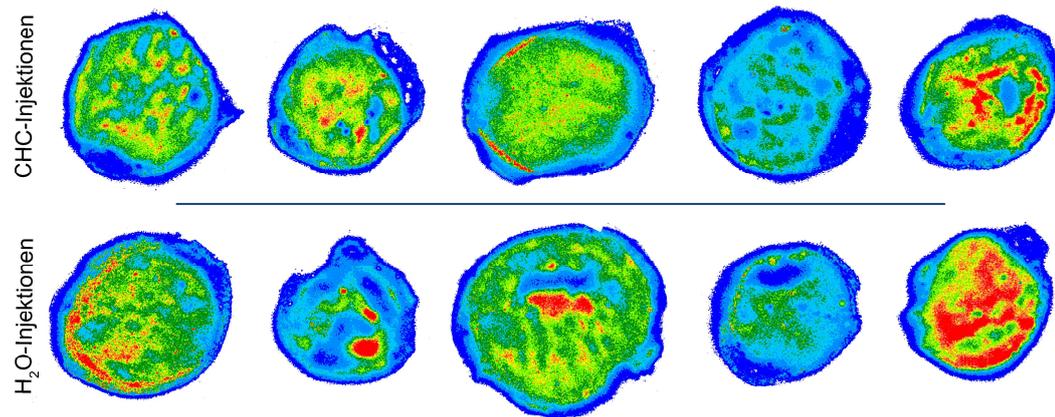


Abb. 33: Falschfarbenkalibrierte Laktat-Biolumineszenzaufnahmen von mit CHC- (oben) bzw. H₂O-behandelten Tumoren der Linie UT-SCC 5.

gruppenspezifischen Unterschiede in der Verteilung des Laktats auf, vielmehr zeigen behandelte und Kontrolltumoren ähnliche Muster in der Laktatverteilung. Für eine quantitative Auswertung der Verteilungsmuster wurde der prozentuale Anteil der Laktat-Konzentrationsstufen berechnet und graphisch aufgetragen (Abb. 34). In FaDu-Schnitten entfallen etwa 90 % der Fläche auf Laktatgehalte zwischen 10 und 25 $\mu\text{mol/g}$, mit etwa 40 % am häufigsten wurden Werte zwischen 15 und 20 $\mu\text{mol/g}$ registriert. In UT-SCC 5 Tumoren ist die Verteilung etwas flacher und nach rechts verschoben, am häufigsten ist hier ein Laktatgehalt zwischen 20 und 25 $\mu\text{mol/g}$. Im Gegensatz zu FaDu-Schnitten weisen in UT-SCC 5 größere Areale eine hohen Laktatgehalt auf. In beiden Tumorklinien treten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung des Laktatgehaltes zwischen mit CHC und H₂O behandelten Tumoren auf.

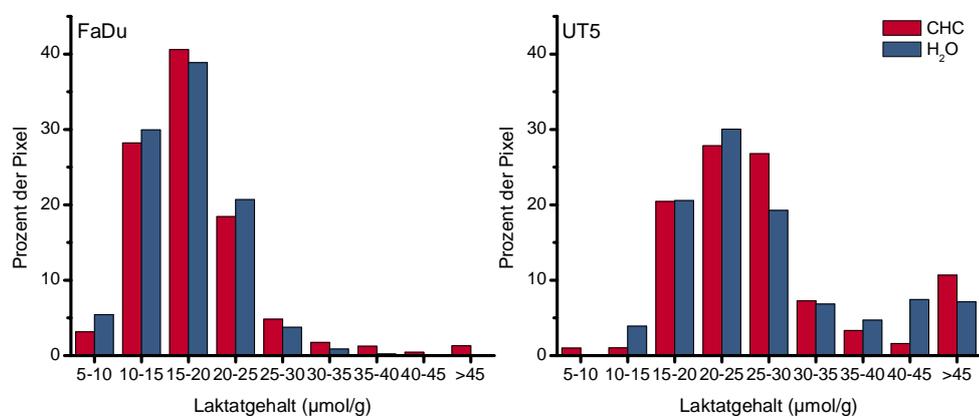


Abb. 34: Prozentuale Verteilung der Pixel auf die verschiedenen Laktatgehaltsstufen in mit CHC und H₂O behandelten Tumoren der Linien FaDu (links) und UT-SCC 5 (rechts).

4.5 Biolumineszenz-Messungen von Nadelbiopsien

Eine Detektion des Metabolstatus in Nadelbiopsien eröffnet die Möglichkeit, eine Gewebeprobe zu einem frühen Zeitpunkt zu analysieren und Tumorwachstum oder Therapieansprechen weiter zu verfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Laktatgehalt in 38 Schnitten von Nadelbiopsien mit je 1,2 mm Durchmesser gemessen, die von A. Yaromina an der TU Dresden angefertigt worden waren, um diese methodische Erweiterung zu testen. Vier repräsentative Messungen sind in Abb. 35 gezeigt, die Ergebnisse aller Nadelbiopsiemessungen sind im Anhang aufgelistet. Zunächst können anhand des Durchlichtbildes dunkle, nekrotische Areale vom übrigen

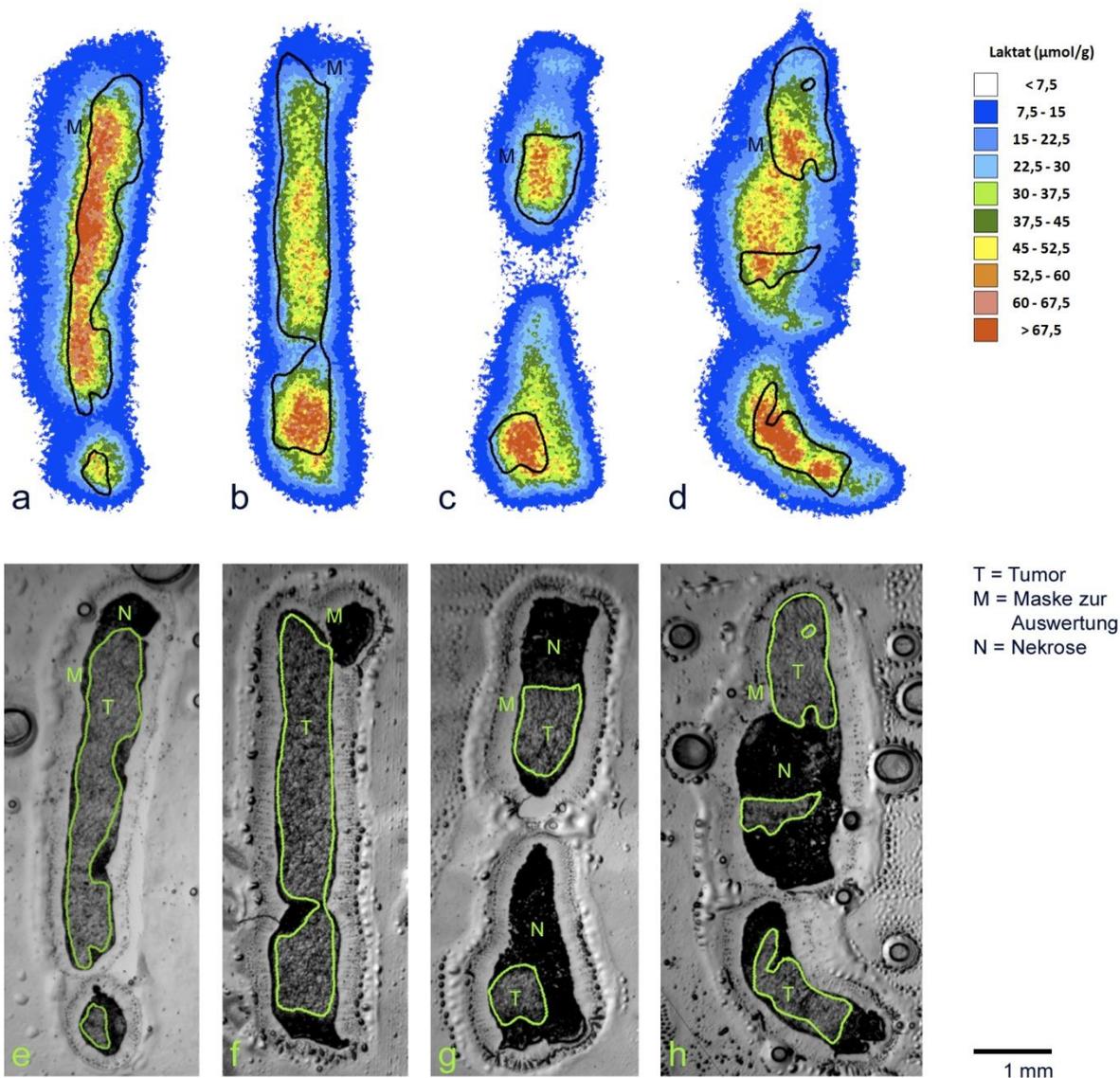


Abb. 35: Falschfarbenkalibrierte Laktataufnahmen (a – d) und korrespondierende Durchlichtaufnahmen (e - h) von vier Nadelbiopsie-Schnitten. Die Maske zur Auswertung des vitalen Gewebes ist in falschfarbenkalibrierten Bildern in schwarz und in Durchlichtaufnahmen in grün eingezeichnet.

Gewebe unterschieden werden. Die beiden ersten Biopsieschnitte (e und f) weisen große, durchgehende Areale vitalen Gewebes auf, das zum Teil von schmalen dunklen Rändern gesäumt wird. Im Gegensatz dazu sind in den rechts abgebildeten Biopsieschnitten (g und h) mehrere kleinere Tumorareale durch große nekrotische Bereiche getrennt. Innerhalb des vitalen Gewebes sind deutliche Unterschiede im Laktatgehalt erkennbar. Innerhalb des vitalen Gewebes ist das Laktat in einigen Tumoren recht homogen verteilt (a, c), während sich in anderen Tumoren auch innerhalb des vitalen Gewebes deutliche Unterschiede zeigen, z.B. im oberen vitalen Tumorareal in (h).

Insgesamt waren die durchschnittlichen Laktatgehalte sehr breit gestreut und reichten von 19,5 bis 58,9 $\mu\text{mol/g}$. In neun Tumorschnitten wurden allerdings Lichtintensitäten oberhalb der Kalibrierung gemessen, so dass deren Laktatgehalt nicht bestimmt werden konnte. Eine Biolumineszenzaufnahme war sehr verschwommen, der ermittelte Laktatgehalt lag nur bei 9,3 $\mu\text{mol/g}$.

Ein Abgleich der Biolumineszenzergebnisse mit den Bestrahlungsdaten aus Dresden durch A. Yaromina ließ keine Korrelation zwischen dem Laktatgehalt der Biopsie und der Strahlenresistenz des Tumors erkennen.

4.6 Vergleich der Laktatmessung mittels MRT und Biolumineszenz

Eine *in vivo*-Diagnose des Laktatgehaltes von soliden Tumoren wäre eine informative Ergänzung zur Einstufung der Malignität zur Verbesserung der klinischen Diagnose. Neben der Biolumineszenz bietet die Magnetresonanztomographie die Möglichkeit eines bildgebenden Laktatnachweises, der auch *in-vivo* durchgeführt werden könnte. Um die Ergebnisse beider Messtechniken zu vergleichen wurden in einem gepaarten Experiment acht Xenograft-tragende Mäuse zunächst einer Magnetresonanztomographie unterzogen und direkt im Anschluss die Tumoren entnommen, kryokonserviert und für die Biolumineszenzmessungen aufgearbeitet.

Die Auswertung der Vergleichsstudie wurde durch eine Verformung der Tumoren bei der Probenentnahme und dem darauffolgenden Einfrieren erschwert. Zusätzlich waren insbesondere in UT-SCC 14 Tumoren alle Schnitte von großen Löchern durchzogen. Von A. Yaromina aus Dresden wurde die Information weitergegeben, dass in diesem Versuch bei UT-SCC 14 Tumoren häufig eine Zystenbildung beobachtet wurde. Ein Tumor, der

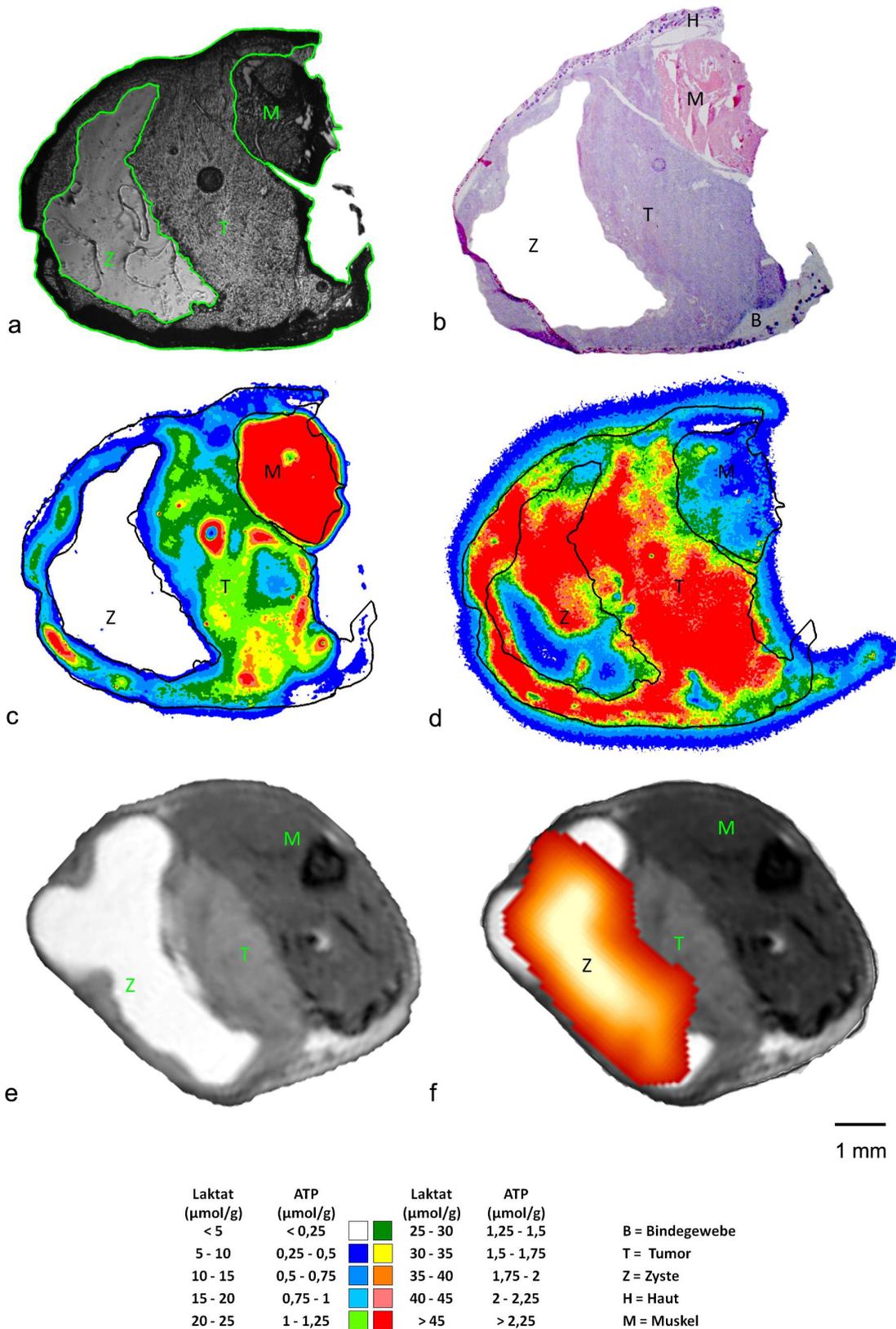


Abb. 36: Vergleich der Laktat- und ATP-Messung mittels Biolumineszenz und der Laktatmessung im MRT. Abgebildet sind eine Durchlichtaufnahme des ATP-Schnittes direkt vor der Messung (a), ein HE-gefärbter Parallelschnitt (b), falschfarben-kalibrierte Bilder der ATP- (c) und Laktatbiolumineszenz (d), die Referenzaufnahme des MRT (e) und die konzentrationsabhängig eingefärbte Laktat-MRT-Aufnahme (f).

diese Charakteristik deutlich zeigt, ist in Abb. 36 gezeigt. Sowohl im Durchlicht-Bild der Biolumineszenzmessung (a) als auch im HE-Schnitt (b) ist ein klar abgegrenzter Hohlraum erkennbar. In der ATP-Aufnahme konnte in diesem Bereich kein Signal detektiert werden (c). Im Gegensatz dazu wurde in der Laktatmessung (d) in der Zyste zum Teil ein sehr hoher Laktatgehalt gemessen. Dieser war mit zum Teil über 45 $\mu\text{mol/g}$ genauso hoch wie in größeren Arealen des vitalen Tumorgewebes. Im Vergleich zu den Kryoschnitten (a-d) weisen die *in vivo* gemachten MRT-Aufnahmen (e und f) eine etwas veränderte Form der verschiedenen Strukturen auf, eine Einteilung in Tumor, Muskel und zystisches Gewebe lässt sich aber dennoch vornehmen. Im Vergleich von Referenz- (e) und Laktatbild (f) zeigt sich insbesondere im zystischen Areal ein hohes Laktatsignal. Im Gegensatz zur Laktatbiolumineszenz ist im an den Muskel angrenzenden Tumorgewebe kein Laktat detektierbar.

In Tab. 12 sind die Messergebnisse der Biolumineszenz und MRT gegenübergestellt. Während der Wert für Laktat in der Biolumineszenz zwischen 23,3 $\mu\text{mol/g}$ in UT-SCC 5 und 19,1 $\mu\text{mol/g}$ in UT-SCC 14 und über 45 $\mu\text{mol/g}$ liegt, reichen die MRT-Werte von 7,7 bis 11,6 mM. Zwischen den beiden Schnitten jedes Tumors gibt es zum Teil große Unterschiede von über 10 $\mu\text{mol/g}$, so weist der zentrale Schnitt des UT-SCC 5 Tumors #64 einen Laktatgehalt von 42,0 $\mu\text{mol/g}$ auf, während der periphere Schnitt nur 29,5 $\mu\text{mol/g}$ enthält. Im Gegensatz dazu ist der Laktatgehalt in den zwei Schnitten des UT-SCC 5 Tumors #61 mit 23,0 und 23,3 $\mu\text{mol/g}$ fast identisch. Ein offensichtlicher Unterschied zwischen den beiden Tumorlinien ist mit beiden Messmethoden nicht erkennbar. Auch

Tab. 12: Vergleich der Laktatmessung mittels Biolumineszenz und NMR. Angegeben ist jeweils der Laktatgehalt in $\mu\text{mol/g} \pm \text{SD}$.

	Tumor	Laktat Biolumineszenz ($\mu\text{mol/g}$)		Laktat MRT
		Zentraler Schnitt	Peripherer Schnitt	(mM)
UT 5	# 1	43,8 \pm 4,8	33,8 \pm 3,9	8,2 \pm 2,3
	# 61	23,0 \pm 5,0	23,3 \pm 3,7	8,4 \pm 2,2
	# 64	42,0 \pm 6,6	29,5 \pm 3,9	9,1 \pm 2,9
	# 68	42,8 \pm 4,4	32,8 \pm 4,1	11,6 \pm 3,6
	# 976	> 45 \pm 4,2	38,8 \pm 3,8	8,4 \pm 2,0
UT 14	# 74	44,1 \pm 6,7	31,9 \pm 4,7	11,7 \pm 3,9
	# 78	24,4 \pm 4,3	> 45 \pm 7,6	7,7 \pm 2,1
	# 79	19,1 \pm 3,5	23,5 \pm 5,8	10,5 \pm 3,1

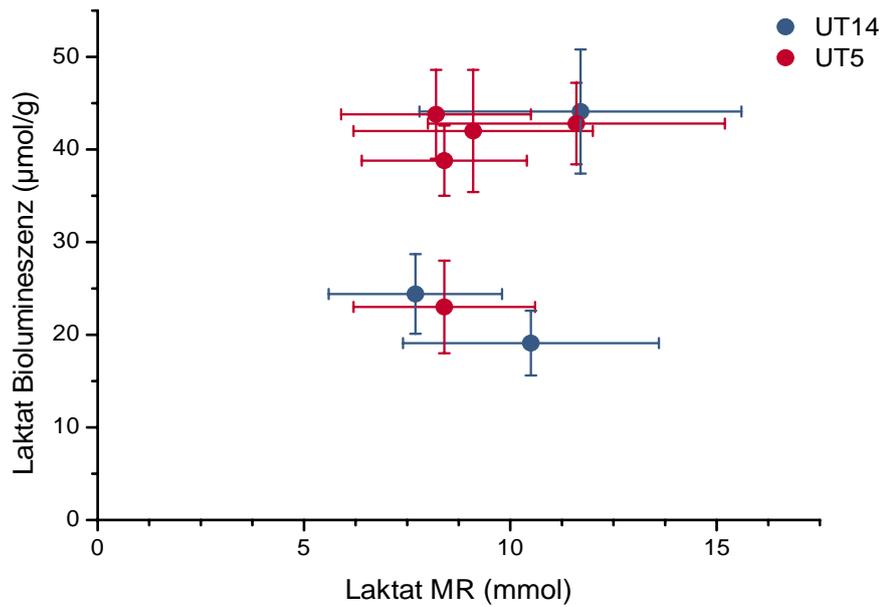


Abb. 37: Vergleich der Laktatmessung mittels Magnetresonanz und Biolumineszenz in drei UT-SCC 14 (blaue Symbole) und fünf UT-SCC 5 Tumoren (rote Symbole). Es wurde der Biolumineszenz-Messwert des zentralen Schnittes gegen den MRT-Wert aufgetragen.

in Abb. 37 ist eine Einordnung der Tumoren in zwei Gruppen entsprechend ihrer Tumorlinie nicht möglich. Zwar zeigen die Biolumineszenzwerte eine Aufteilung in Tumoren mit niedrigerem und höherem Laktatgehalt, allerdings handelt es sich bei einem der Tumoren mit niedrigem Gehalt um einen UT-SCC 5 Tumor, während ein UT-SCC 14 Tumor einen sehr hohen Laktatgehalt aufweist. Die mittels MRT bestimmten Werte liegen insgesamt dicht beisammen und die Standardabweichung überlappt in großen Bereichen, ein tumorlinienspezifisches Muster ist nicht erkennbar. Außerdem besteht kein Zusammenhang zwischen den Messergebnissen der MRT und der Biolumineszenz.

5 Diskussion

5.1 Validierung und Optimierung der Biolumineszenz

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Etablierung eines neuen, digitalen Kamerasystems für die induzierten, metabolischen Biolumineszenz, da die bisher benutzte Hamamatsu-Kamera keine validen und reproduzierbaren Messergebnisse mehr lieferte. Histogramme aktueller Aufnahmen zeigten im Gegensatz zu alten Aufnahmen einen Verlust im Auflösungsvermögen unterschiedlicher Helligkeitsstufen. Außerdem hatte die Lichtsensitivität des Aufnahmefeldes abgenommen und war inhomogen geworden, was zu ungenauen Messergebnissen führte. Nach einer Überprüfung der Kamera durch Hamamatsu, die eine Abnahme der Lichtsensitivität bestätigte, wurde diese durch eine digitale EM-CCD Kamera der Firma Andor ersetzt.

Als Reaktion auf die immer schwächere Lichtausbeute waren bei letzten Experimenten mit dem alten Kamerasystem die Konzentrationen der für die Messungen benötigten Enzyme über das Optimum hinaus erhöht worden. Aus diesem Grund und da das neue System eine größere Lichtempfindlichkeit besitzt, war es notwendig, die Zusammensetzung des Enzymmixes zu optimieren.

Die Grundlage aller Biolumineszenzmessungen ist die Bestimmung geeigneter Aufnahmeparameter: Zeitpunkt und Dauer der Messung müssen für jeden Enzymmix angepasst werden, insbesondere wenn die Zusammensetzung des Mixes geändert wurde, aber auch, um die von Charge zu Charge unterschiedliche Enzymaktivität zu kompensieren. Das neue Andor-Kamerasystem bietet die Möglichkeit, anhand von Serienaufnahmen die Reaktion zu verfolgen und daraus geeignete Messeinstellung abzuleiten. In einem zweiten Schritt kann das Lichtsignal der Messung quantitativ ausgewertet werden. Die entscheidende Messgröße bei Biolumineszenzanalysen ist die einheitslose Lichtintensität. Sie wird aus der Graustufenverteilung innerhalb einer vom Auswerter festzulegenden Region berechnet, d.h. es ist der Mittelwert der Grauwerte aller Pixel in diesem Areal.

Bei der Festlegung geeigneter Aufnahmeparameter müssen deshalb mehrere Faktoren berücksichtigt werden: Zunächst liefert das Betrachten der aufeinanderfolgenden Bilder der Serienaufnahme eines hoch konzentrierten Laktatstandards (Abb. 6) erste Hinweise für die Messeinstellungen. Durch Diffusionseffekte verwischen die Konturen des Schnittes im Verlauf der Reaktion zusehends, was die Bildqualität verschlechtert und die

Auswertung erschwert. Außerdem wird der für die Reaktion benötigte Sauerstoff nach und nach aufgebraucht, so dass die Lichtreaktion zum Erliegen kommt. Soll eine Messung quantitativ ausgewertet werden, sollte sie daher abgeschlossen sein, bevor diese Effekte eintreten. Es ist unter diesen Gesichtspunkten sinnvoll, direkt nach Reaktionsbeginn und sehr kurz zu messen.

Die Dauer der Aufnahme (Belichtungszeit) sollte jedoch mindestens so lange gewählt werden, dass sich die Lichtintensität des Standards mit der niedrigsten Metabolitkonzentration noch deutlich vom Wert des Hintergrundes unterscheidet und sich eine Abstufung für unterschiedliche Konzentrationen ergibt. Auch die manuellen Abläufe bis zum Start der Messung begrenzen die Belichtungszeit nach unten: Würde man eine sehr kurze Belichtungszeit von wenigen Sekunden wählen, wäre der menschliche Fehler, z.B. eine leicht Verzögerung beim Start des Countdowns oder der Messung, ein zu großer Einflussfaktor. Außerdem ist ein zu früher Start der Messung nicht günstig, da der Enzymmix, der auf Eis gelagert wurde, sich erst auf 20 °C erwärmen und die Reaktion in Gang kommen muss. Den besten Zeitpunkt für den Start der Messung kann man aus dem zeitlichen Verlauf der gemessenen Lichtintensitäten ablesen (Abb. 7). Er sollte nicht im sehr steilen ersten Teil der Kurve gewählt werden, vielmehr erweist sich ein Start der Messung kurz vor dem Erreichen der maximalen Lichtintensität als günstig. Ein guter Endpunkt für die Aufnahme wird durch die stärker werdende Diffusion und das Abnehmen der Lichtintensität bestimmt. In seltenen Fällen kann auch durch eine zu lange gewählte Belichtungszeit bei der Messung hoher Standards die maximal von der Kamera detektierbare Lichtintensität überschritten werden. Ist eine weitere Verkürzung der Belichtungszeit nicht sinnvoll, kann in diesem Fall die Signalverstärkung des Systems reduziert werden.

Durch die Analyse der Serienaufnahmen und Lichtintensitäten sowie das Abwägen dieser verschiedenen Faktoren wurden für jeden neu angesetzten Enzymmix die optimalen Aufnahmeparameter festgelegt. Die Dauer zwischen dem Eintauchen des Schnittes in den Enzymmix und dem Start der Messung liegt dabei zwischen 10 und 30 s, die Belichtungszeit zwischen 30 und 45, selten 60 s. Innerhalb einer Versuchsreihe wurden diese Parameter unverändert beibehalten.

In Verdünnungsexperimenten (Abb. 8) mit einem nach dem alten Schema angesetzten Enzymmix zeigte sich, dass die verschiedenen Bestandteile zu hoch konzentriert waren und eine Verdünnung des Enzymmixes deutlich höhere Lichtintensitäten lieferte. Besonders auffällig war hier, dass mit dem unverdünnten Mix oberhalb von 20 µmol/g die Lichtintensitäten wieder abnahmen, was auf eine

Substratinhibierung schließen lässt. Im Gegensatz dazu können mit dem verdünnten Mix in diesem Bereich immer noch Unterschiede im Laktatgehalt gut abgebildet werden, da die Lichtintensität mit steigender Konzentration weiter zunimmt. Ob in dieser Verdünnung alle Bestandteile in einem optimalen Verhältnis vorliegen, konnte mit diesem Versuchsansatz jedoch nicht geklärt werden, da laut Protokoll alle Bestandteile nacheinander im Reaktionspuffer gelöst werden und eine Variation einzelner Bestandteile nicht möglich ist. Deshalb wurde ein neues Ansatzprotokoll auf der Basis der verschiedenen ausgetesteten Verdünnungen erstellt, um die Mixzusammensetzung weiter zu optimieren (Tab. 2).

Insbesondere die Variation der NFO-Konzentration sowie eine Erhöhung der Luciferasekonzentration sind wichtige Stellschrauben zur Steuerung der Lichtabgabe. Beide Enzyme beeinflussen das Maximum der Lichtemission, die NFO-Konzentration bestimmt zu dem deren Nachlassen (Lavi et al., 1983). Die Anpassung der NFO-Konzentration (Abb. 9) führte in dieser Arbeit zu einem Reaktionsverlauf mit einem für Biolumineszenzmessungen ausreichend breiten Peak und hohen Lichtintensitäten. Die hier eingesetzte Konzentration der NFO sollte bei Verwendung einer neuen Enzymcharge stets erneut überprüft werden, da die von Roche bezogene NFO eine veränderliche Mischung aus NADH- und NADPH-abhängigen Isoformen ist und deren NADH-spezifische Aktivität folglich schwanken kann.

Da vor der Umstellung des Kamerasystems bei der Laktatmessung in einigen Tumorkulturen so hohe Lichtintensitäten gemessen wurden, dass diese oberhalb der Kalibrierungskurve lagen, wurde vermutet, dass endogen vorliegendes NADH oder NADPH die Messung stören könnte. Um diesen Einfluss ausschließen zu können, wurde die Lichtreaktion mit dem neu zusammengesetzten Enzymmix isoliert gemessen (Abb. 10). Die Reaktion lieferte dabei sehr geringe Lichtmengen, die nur minimal über denen des Hintergrundes liegen. Dies lässt den Schluss zu, dass in den Kryoschnitten nur sehr geringe Mengen endogenes NADH/NADPH vorliegen. Dem entsprechend muss das in der Laktatbiolumineszenz nachgewiesene NADH nahezu vollständig aus der Umsetzung von Laktat stammen und eine Verfälschung der Ergebnisse durch in den Kryoschnitten vorhandenes NADH/NADPH erscheint unwahrscheinlich. Um diese Problematik auch zukünftig auszuschließen, erscheint es sinnvoll, zu Beginn einer neuen Studie ein Test der Proben auf endogenes NADH/NADPH vorzunehmen.

Einige der im Enzymmix enthaltenen Bestandteile, insbesondere die Luciferase und NFO, sind mechano- und lichtsensitiv. Bevor mit dem neu berechneten Laktatmix Experimente gestartet wurden, war es deshalb wichtig zu überprüfen, ob die

Enzymsuspension stabil genug für Messreihen ist. Die Stabilitätsmessungen (Abb. 11) zeigen über einen Zeitraum von etwa 2 Stunden konsistente Messergebnisse, wenn der Enzymmix im Dunkeln und auf Eis aufbewahrt wird. Selbst bei einer Lagerung des Enzymmixes über Nacht in Dunkelheit auf Eis liegt die Lichtintensität der Standardmessung nur wenig unter den Werten des Vortages. Im Gegensatz dazu zeigt die Messung einer auf Eis im Licht einer 60 W Glühbirne aufbewahrten Probe bereits nach 45 Minuten eine drastische Abnahme der Lichtintensität auf etwa 20 % der ursprünglichen Werte. Deshalb ist es wichtig, den Enzymmix so zu portionieren, dass die einzelnen Aliquots innerhalb einer kurzen Zeitspanne aufgebraucht werden. Außerdem ist es unerlässlich, den Enzymmix sowohl bei der Herstellung als auch während der Messungen lichtgeschützt aufzubewahren. Unter Voraussetzung dieser Vorgehensweise scheint der im Rahmen dieser Arbeit neu zusammengestellte Enzymmix hinreichend stabil, um vergleichende Messungen durchzuführen.

Die neu eingeführte automatisierte Auswertung der Biolumineszenzmessungen mit einem eigens dafür entwickelten ImageJ Plugin liefert mit dem bisherigen Verfahren sehr gut übereinstimmende Ergebnisse (Tab. 5). Neben der Zeitersparnis bietet sie zudem den Vorteil einer besseren Reproduzierbarkeit, da die Maske für das auszuwertende Areal immer exakt gleich plaziert und in der Größe unverändert übernommen wird. Durch die Etablierung einer CD45-Färbung zum Nachweis des Tumorgewebes in Xenograftschnitten konnte die Auswertung zusätzlich optimiert werden, da sie eine einfache und sichere Erkennung und Kennzeichnung des Tumorgewebes in der Überlagerung am Bildschirm ermöglicht.

Um die Vergleichbarkeit mit Daten anderer Studien zu gewährleisten und mit einem zweiten, etablierten Verfahren zu überprüfen, sollten mit dem neuen Laktatmix erhaltene Ergebnisse mit einer Extraktionsmethode abgeglichen werden. Ein Vergleich zwischen photometrisch gemessenen Laktatgehalten lyophilisierter Tumorstücke und in der Biolumineszenz gemessenen Kryoschnitten erfüllte diese Anforderungen nur zum Teil (Tab. 6). Insgesamt erscheinen die Laktatgehalte der Testtumoren realistisch und spiegeln auch die in früheren Experimenten in xenotransplantierten Humantumoren gemessenen Werte wieder (Quennet et al., 2006). Allerdings konnten nur bei etwa der Hälfte der gemessenen Proben mit beiden Methoden übereinstimmende Werte ermittelt werden. Bis auf einen Fall, bei dem geringere Werte gefunden wurden, lagen alle mit der Biolumineszenz ermittelten Werte über den Photometrieergebnissen. Der Grund für die Messung der niedrigen Werte besteht wahrscheinlich darin, dass dieser Tumor sehr klein und beim Schneiden mehrfach gerissen war, so dass keine große,

zusammenhängende Fläche zur Auswertung des Laktatgehalts in der Biolumineszenz zur Verfügung stand.. Als Hauptgrund für die höheren Werte erscheint die unterschiedliche Herangehensweise der beiden Methoden wahrscheinlich: Für die Biolumineszenz werden die Tumorstücke im Kryotom geschnitten und der Laktatnachweis erfolgt direkt im Schnitt und ohne dazwischenliegende Aufarbeitungsschritte. Für die Photometrie hingegen werden die Tumorstücke zunächst lyophilisiert, anschließend gemörsert und dann durch Zugabe von Puffer das Laktat aus dem aufgeschlossenen Gewebe extrahiert. Je nach Beschaffenheit des Gewebes wird dabei eventuell nicht alles im Gewebe vorhandene Laktat in Lösung gebracht, weshalb die so gemessenen Werte zum Teil unter denen der Biolumineszenz liegen könnten. Außerdem umfasst die manuelle Aufarbeitung der Tumoren zahlreiche fehleranfällige Schritte, was zu einer gewissen Variabilität führen kann. Ein besonders kritischer Schritt ist das Mörsern der Tumoren in flüssigem Stickstoff, bei dem ein gewisser Probenverlust angenommen werden muss.

Ein weiterer wichtiger Grund ist die intratumorale Variabilität des Laktatgehalt. Bei den Messungen des Laktatgehaltes in Tumoren der Linien UT-SCC 5 und UT-SCC 14 wurden beispielsweise je vier Schnitte pro Tumor gemessen, zwischen den Schnitten der einzelnen Serien liegen je 134 μm . In viele Tumoren ergeben die Messungen aller vier Schnitte sehr ähnliche Ergebnisse, Unterschiede zwischen 5 und 10 $\mu\text{mol/g}$ sind allerdings auch nicht unüblich. In Einzelfällen können die Abweichungen aber auch deutlich größer sein, so betrug zum Beispiel im Tumor UT-SCC 5 #125 der Unterschied im Laktatgehalt zwischen ersten und viertem Schnitt 18,5 mmol/g , in UT-SCC 5 #182 zwischen erstem und drittem Schnitt sogar 21,6 $\mu\text{mol/g}$, obwohl diese Schnitte nur etwa 270 bzw. 400 μm auseinander lagen. Dem entsprechend ist zu vermuten, dass die beiden Hälften eines Tumors von mindestens 4 mm Durchmesser durchaus große Unterschiede aufweisen können. Ob und welche der beiden Methoden die exakteren Ergebnisse liefert, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschliessend geklärt werden. Grundsätzlich erscheinen die Größenordnung und Abstufung der Laktatmessungen mit dem neuen Enzymmix jedoch realistisch und stimmen mit den Ergebnissen früherer enzymatisch-photometrischer Vergleichsmessungen überein.

Die Unterschiede zwischen Biolumineszenz und enzymatischen Bestimmung untersuchten Schaefer et al in einer Studie an subkutanen Experimentaltumoren. In vier verschiedenen Behandlungsgruppen mit je 10 bis 17 Tumoren lag der Laktatgehalt in der Biolumineszenz 5- 55 % über der enzymatischen Bestimmung (Schaefer et al., 1993). In einem anderen Versuch mit Xenografts der HNSCC-Linie HN 4197 lagen die enzymatisch gemessenen Werte zwischen 12 und 65 % ähnlich weit unter den

Biolumineszenzwerten. Der Laktatgehalt in diesen Proben war allerdings niedrig (zwischen 2,9 und 6,3 $\mu\text{mol/g}$) und der Probenumfang mit 3 bis 4 Tumoren je Gruppe gering (Tamulevicius and Streffer, 1997). Eine weitere Studie zeigte ähnliches, hier lagen die Laktatwerte in 3 von 5 Gruppen über denen der enzymatischen Bestimmung (Tamulevicius and Streffer, 1995).

Um zukünftig eine zuverlässigere Kontrolle der Biolumineszenzmessung zu ermöglichen, muss die Aufarbeitung der Tumorstücke für Vergleichsmessungen optimiert und weitestgehend standardisiert werden. Desweiteren wäre es denkbar, aus Tumoren Homogenate herzustellen und diese einerseits zur photometrischen Messung heranzuziehen und andererseits in kleinen, geeigneten Formen einzufrieren und für Biolumineszenzmessungen zu schneiden. Dies würde die Möglichkeit einer großen intratumoralen Variabilität ausschließen und gleichzeitig durch das vorhergehende Zerkleinern und Aufschließen des Gewebes den Verlust an Probenmaterial minimieren.

Eine erste Bewährungsprobe für das neue Kamerasystem und den optimierten Enzymmix war die erneute Messung des Laktatgehaltes in drei xenotransplantierten humanen HNSCC-Linien, um diese Werte mit denen des vorhergehenden Kamerasystems ermittelten zu vergleichen. Auch wenn die Ursachen für die zuletzt fehlerhaften Messungen des Hamamatsu-System nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, so scheinen die Ergebnisse der Nachmessungen in sich und auch im Vergleich mit photometrischen Bestimmungen plausibel. Während mit dem alten System zwischen 42 und 90 % der Fläche nicht ausgewertet werden konnten, lag nur einer von 110 Schnitten oberhalb der Kalibrierung, was möglicherweise auf viele Luftbläschen in der Messung zurückzuführen ist (Tab. 7).

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Beurteilung der überarbeiteten Laktatbiolumineszenz ist die Frage der Reproduzierbarkeit. Hier erscheint die Messung aufeinanderfolgender Schnitte eines Tumors nach Ansetzen eines neuen Enzymmixes über lange Zeiträume hinweg sinnvoll, da so sichergestellt werden kann, dass die jeweils gewählten Messparameter zu übereinstimmenden Ergebnissen führen. Die im Verlauf von zwei Jahren ermittelten Laktatgehalte für aufeinanderfolgende Schnitte eines FaDu-Tumors zeigen sehr gute Übereinstimmungen (Tab. 8). Eine weitere Bestätigung lieferte die Messung eines FaDu-Schnittes und einiger Standards am Princess Margaret Hospital in Toronto mit einem zweiten Biolumineszenz-System und unabhängig angesetztem Enzymmix. Auch in diesem Fall stimmte der ermittelte Laktatgehalt mit den in Mainz erhaltenen Werten überein. Die Vergleichbarkeit der Werte ist also auch über längere Zeiträume und systemunabhängig gewährleistet. Die Weiterführung dieser Vergleichsmessungen

scheint ein guter Weg, um die Konstanz der Ergebnisse abzusichern. Bevor man einen Tumor für Vergleichsmessungen dieser Art auswählt, sollte man jedoch sicherstellen, dass die intratumorale Variabilität klein ist und genügend Schnittmaterial vorhanden ist.

Ein anderer wichtiger Aspekt dieser Messungen ist die Demonstration der langen Haltbarkeit von hitzefixierten Kryoschnitten, da mit den verwendeten Schnitte eines FaDu-Tumors zwei Jahren alte Messergebnisse reproduziert werden konnten. Der Metabolitstatus in hitzefixierten Kryoschnitten erscheint demnach besser konserviert zu sein, als dies bei eingelagerte Tumorstücke der Fall ist (s.u.). In zukünftigen Projekten sollten deshalb die Tumoren zumindest zeitnah nach der Entnahme geschnitten werden.

Analog zur Umstellung des Enzymmixes zur Laktatmessung wurde auch das Ansatzprotokoll für die Glukosemessungen umgestellt und optimiert. Zunächst wurde dazu eine neue Zusammensetzung berechnet, bei der die benötigten Bestandteile einzeln zusammenpipettiert werden können. Bei Versuchen mit verschiedenen Verdünnungen stellte sich eine 2 : 1 Verdünnung als am besten geeignet heraus, da hier die höchsten Lichtintensitäten gemessen wurden. Die neue Zusammensetzung des Glukosemixes wurde zwischenzeitlich auch an anderen Tumorschnitten getestet und lieferte gute, reproduzierbare Ergebnisse.

5.2 Studie an 10 humanen HNSCC-Linien

In dieser Studie an 10 humanen, xenotransplantierten HNSCC-Linien wurde der Stoffwechselstatus durch die Biolumineszenzmessung von ATP, Laktat, Glukose und Pyruvat charakterisiert. Aufgrund früherer Ergebnisse schien insbesondere der Laktatgehalt interessant, so dass ein weitere Fokus auf den möglichen Ursachen des unterschiedlichen Laktatgehaltes in den Linien lag. Deshalb wurde das Expressionsniveau der drei mRNAs *ldh-a*, *pfkl* und *glut1* sowie des LDH-A Proteins ebenso untersucht wie die Laktatproduktion der Zellen in der Adhäsionskultur. Desweiteren sollte eine CD45-Färbung Aufschluss über die Infiltration der Xenografts mit Abwehrzellen geben. Die in Mainz durchgeführten Untersuchungen waren Teil eines gemeinsamen Forschungsprojektes mit der Arbeitsgruppe von Prof. Baumann aus Dresden und zwei weiteren Arbeitsgruppen aus Würzburg und München (Zips et al., 2004).

Die Ergebnisse der ATP-, Glukose- und Laktat-Biolumineszenzmessungen der Linien XF354, FaDu, UT-SCC 5, UT-SCC 14 und UT-SCC 15 wurde vorab von Quennet et al. (2006) veröffentlicht. Obwohl die nachfolgenden Untersuchungen an Tumoren der

Linien CAL33, HSC4, SAS, UT-SCC 8 und UT-SCC 45 von anderen Personen und zum Teil auch mit dem neuen Kamerasystem und optimiertem Emzymmix durchgeführt wurden, stimmen die Ergebnisse dieser Glukose- und Laktatmessungen mit den vorangehenden Messungen überein. Im Gegensatz dazu lag der ATP-Gehalt in den von Quennet et al. (2006) gemessenen 5 Linien zwischen 1,4 und 2,5 $\mu\text{mol/g}$, in den späteren Messungen wurden nur Werte zwischen 0,8 und 1,4 $\mu\text{mol/g}$ ATP detektiert. Ein ATP-Gehalt von im Mittel 0,8 $\mu\text{mol/g}$ in SAS erscheint im Vergleich mit anderen Linien zwar niedrig, liegt aber trotzdem noch deutlich im für Tumoren normalen Bereich von 0,5 – 2 mM (Mueller-Klieser and Walenta, 1993). Deshalb erschien es nicht notwendig, diese Proben von der Auswertung auszuschließen. Ob der niedrigere ATP-Gehalte in der zweiten Hälfte des Probenkontingentes eventuell auf eine längere Lagerzeit der Kryoschnitte zurückzuführen ist, oder ob es sich um eine natürliche Variation handelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Da diese Studie allerdings keine Hinweise dafür lieferte, dass der ATP-Gehalt mit anderen metabolischen Parametern korreliert ist und nur zur Visualisierung des vitalen Tumorgewebes genutzt wurde, scheint diese Frage auch von untergeordneter Bedeutung.

Auffällig ist auch der niedrige mittlere Pyruvatgehalt in den Schnitten der Linien UT-SCC 45, UT-SCC 8 und HSC4. Bei diesen Schnitten handelt es sich um Nachschnitte, die aus ca. 1-2 Jahre alten, in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Tumor-Reststücken angefertigt wurden. Diese Effekte könnten darauf zurückzuführen sein, dass der Metabolitstatus in den unfixierten Tumoren trotz der niedrigen Aufbewahrungstemperatur Veränderungen unterworfen ist. Auch der ATP-Gehalt dieser Linien liegt im unteren Wertebereich. Da Laktat in deutlich größeren Mengen im Tumor vorliegt, sind Schwankungen in einer Größenordnung um 1 $\mu\text{mol/g}$ bei diesem Metaboliten weniger offensichtlich und können nicht ausgeschlossen werden. Der Laktatgehalt der 110 untersuchten Tumoren zeigt so große Unterschiede, dass marginale Veränderungen der Werte die Aussagekraft der Ergebnisse nicht in Zweifel stellen.

Der Vergleich der Laktatproduktion der Zelllinien *in vitro* mit dem Laktatgehalt *in vivo* (Abb. 16) zeigte einen inversen Trend, der allerdings nicht statistisch signifikant ist. Diese Feststellung ist entgegen der Erwartung, dass Tumorklinien, die *in vivo* große Mengen Laktat anreichern *in vitro* in kurzer Zeit mehr Laktat produzieren als Linien mit einem niedrigen Laktatgehalt. Auffällig ist, dass in den beiden Linien mit dem niedrigsten in der Biolumineszenz gemessenen Laktatgehalt die über 24 h höchste Laktatproduktion auftreten. Eine mögliche Ursachen für diese großen Unterschiede könnten in einer

veränderten Laktatproduktionsrate *in vivo* liegen. Außerdem könnte der Laktatgehalt *in vivo* neben der intrinsischen Laktatproduktion von weiteren Faktoren bestimmt wird. In einer Analyse von zentralen Schnitten der Linien FaDu, UT-SCC-15 und UT-SCC5 wurden die Bilddateien mit Informationen zu Perfusion und Hypoxie aus der Dresdner Arbeitsgruppe mit den Biolumineszenzaufnahmen verglichen (Yaromina et al., 2009b). Auf mikroregionaler Ebene wurde ein Zusammenhang zwischen Laktatgehalt und Perfusion nachgewiesen, d.h. stärker durchblutete Areale wiesen niedrigere Laktatgehalte auf als weniger stark durchblutete Areale. Dies deutet darauf hin, dass in soliden Tumoren der Laktatgehalt auch vom Abtransport durch den Blutfluss bestimmt wird. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen dem Laktatgehalt und dem Ausmaß der Hypoxie im Tumorgewebe gefunden, so dass zumindest ein Teil des angereicherten Laktats aus der aeroben Glykolyse stammt (Yaromina et al., 2009b).

Vor dem Hintergrund, dass sowohl Laktat (Groussard et al., 2000) als auch Pyruvat (Salahudeen et al., 1991) in einer Scavenger-Reaktion radikale Sauerstoffspezies neutralisieren und damit die Strahlenwirkung schwächen können, war die zentrale Hypothese dieser Studie, dass ein prätherapeutisch hoher Laktat- und Pyruvatgehalt in soliden Tumoren eine hohe Strahlenresistenz kennzeichnet. Nach der fraktionierten Bestrahlung und strahlenbiologischen Charakterisierung von über 1000 Tumoren und der metabolischen Analyse von 110 Tumoren kann ein Teil dieser Hypothese als klar bestätigt werden: Zwischen der TCD₅₀ als Maß für die lokale Tumorkontrolle und dem prätherapeutischen Laktatgehalt besteht eine signifikante Korrelation Abb. 18. Im Gegensatz dazu wurde jedoch keine Korrelation zwischen prätherapeutischem Pyruvatgehalt und der TCD₅₀ festgestellt. Dies erscheint zunächst überraschend, da die Radikalfänger-Wirkung von Pyruvat im direkten Vergleich größer ist als die von Laktat (Sattler and Mueller-Klieser, 2009). Eine mögliche Erklärung für die fehlende strahlenprotektive Wirkung des Pyruvates könnte die sein, dass Pyruvat in niedrigen Konzentrationen in der Zelle vorliegt, während sich Laktat in großen Mengen ansammelt. Allerdings ist auch die strahlenprotektive Wirkung des Laktats bis jetzt nicht vollständig experimentell belegt und eine einfache Reproduktion der hier gezeigten Ergebnisse durch die exogene Laktatzugabe *in vitro* scheint nicht ohne weiteres möglich (Grotius et al., 2009).

Auch die Frage nach einer möglichen Ursache des sehr unterschiedlichen Laktatgehaltes in soliden Tumoren konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden, da die Analyse der Expressionsmuster der drei Gene *Idha*, *glut1* und *pfk1* und

des LDHA Proteins kein einheitliches Bild bietet. So zeigen zwar die beiden Linien UT-SCC 5 und CAL33 mit dem höchsten Laktatgehalt in vivo auch eine hohe LDHA-Expression, diese ist aber auch in UT-SCC 45 mit einem niedrigen Laktatgehalt gegeben. Auch eine sehr hohe Expression aller drei untersuchten Gene in UT-SCC 15 ist auffällig, insbesondere da sowohl Protein- als auch Metabolitlevel in dieser Linie immer im Mittelfeld liegen. Insgesamt gibt es weder einen Zusammenhang zwischen mRNA-Expression und Proteinexpression der LDH-A noch einen zwischen der mRNA-Expression der drei Gene und dem in der Biolumineszenz untersuchten Metabolitstatus. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Regulation der Glykolyse in den 10 untersuchten Zelllinien nicht einheitlich erfolgt, sondern dass unterschiedliche Mechanismen ineinander greifen und auch die Regulation der Enzymaktivität von Bedeutung zu sein scheint (Moreno-Sánchez et al., 2007).

Um der Frage nachzugehen, inwieweit das Tumorgewebe von murinen Leukozyten infiltriert wird, wurden CD45-Färbungen durchgeführt. Diese Frage ist deshalb von Bedeutung, da Abwehrzellen in entzündeten Arealen signifikante Mengen Laktat produzieren können (Haji-Michael et al., 1999). Eine große Anzahl an CD45-positiven Zellen könnte also den Metabolitgehalt in den Xenografts beeinflussen und zu falschen Rückschlüssen auf den Tumorstoffwechsel führen. Eine Überprüfung des Immunstatus scheint auch deshalb angebracht, da in Nacktmäusen eine größere Zahl natürlicher Killerzellen und eine höhere Makrophagenaktivität als in normalen Mäusen festgestellt wurde (Rofstad, 1989). Lediglich die Bildung von T-Lymphozyten ist in den athymischen Nacktmäusen unterdrückt, was die Abstoßung von humanen Tumorzellen limitiert und die Erzeugung von Xenografts ermöglicht (Cespedes et al., 2006). Ob eine signifikante Immunantwort, die z.B. die Ergebnisse von Bestrahlungsstudien verfälschen könnte, in athymischen Mäusen auftritt, wenn ein Xenograft implantiert wird, hängt von der humanen Tumorklinie ab. (Rofstad, 1989).

Aufgrund der im Rahmen dieser Studie gewonnenen Ergebnisse erscheint ein signifikanter Einfluss von eingewanderten Leukozyten auf den Metabolitstatus in den untersuchten Proben unwahrscheinlich. Zum einen war die Anzahl der detektierten CD45-positiven Zellen generell niedrig und überstieg nie 15 % der Gesamtzellzahl in einem Schnitt. In den meisten Schnitten lag sie sogar sehr weit unter diesem Anteil. Zum anderen zeigt der Vergleich der Daten der einzelnen Linien, dass eine hohe Leukozytenzahl nicht mit einem höheren Laktatgehalt korreliert ist.

Auch von der Dresdner Arbeitsgruppe wurde der Immunstatus in den xenotransplantierten Tumoren mit einem etablierten strahlenbiologischen Verfahren

strahlenbiologisch untersucht. Dazu wird das Wachstum von Tumoren nach einer Einzelbestrahlung unter abgeklemmten Blutfluss analysiert. Um eine eventuell auftretende Immunantwort zu unterdrücken, wird die Hälfte der tumortragenden Tiere vor dem Versuch ganzkörperbestrahlt. Treten dann zwischen den beiden Gruppen Unterschiede im Wachstumsverhalten auf, ist davon auszugehen, dass eine Immunantwort vorliegt (Huang et al., 1996). In den Kontrollexperimenten der Dresdner Arbeitsgruppe löste nur HSC4 eine signifikante Immunantwort in den Nacktmäusen aus (Yaromina et al., 2007), und auch in unseren histologischen Experimenten wiesen HSC4 Tumoren die größte Leukozytendichte auf. Aus diesem Grund wurden alle statistischen Analysen unserer Daten jeweils auch ohne HSC4-Werte durchgeführt. Dies führte jedoch zu keiner Veränderung der Ergebnissen, weshalb für diese Arbeit immer die Darstellung der Ergebnisse aller zehn Linien gewählt wurde.

5.3 Vergleich von 2 HNSCC-Linien während fraktionierter Strahlentherapie

In der im vorhergehenden Abschnitt dargestellten und publizierten Studie wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Laktatgehalt in xenotransplantierten HNSCC-Linien vor Behandlungsbeginn und der Strahlensensibilität festgestellt (Sattler et al., 2010b). Allerdings war der prätherapeutisch bestimmte Laktatgehalt in statistischen Analysen der Arbeitgruppe von Prof. Baumann nicht aussagekräftig genug, um als prädiktiver Marker den Erfolg einer fraktionierten Strahlentherapie vorhersagen zu können (persönliche Kommunikation). Ein möglicher Grund könnten unterschiedliche metabolische Veränderungen sein, die durch die fraktionierte Bestrahlung ausgelöst werden. Um diesen möglichen Einfluss einer Röntgentherapie zu untersuchen, wurden die beiden Zelllinien UT-SCC 5 und UT-SCC 14 ausgewählt, da sich diese deutlich in Laktatgehalt und Strahlenresistenz unterscheiden (Abb. 18). Die Analyse des Metabolitstatus vor und zu verschiedenen Zeitpunkten während der fraktionierten Röntgentherapie sollte Aufschluss darüber geben, ob und wie sich der ATP- und Laktatgehalt durch diese Behandlung ändert. Darüber hinaus wurde die Expression von sechs mRNAs untersucht, um festzustellen, ob und wann erste Veränderungen im Expressionsmuster erkennbar werden.

Auffällig ist zunächst, dass die in dieser Studie gemessenen Laktatgehalte in unbestrahlten Xenografts in beiden ausgewählten Linien höher sind als in der

vorangegangenen Studie (Sattler et al., 2010b). In UT-SCC 5 lag der Laktatgehalt zuerst bei 25,9 $\mu\text{mol/g}$, aktuell wurden 31,8 $\mu\text{mol/g}$ gemessen. Für UT-SCC 14 wurde in der ersten Studie ein Laktatgehalt von 11,8 $\mu\text{mol/g}$ bestimmt, im zweiten Projekt lag der Mittelwert unbestrahlter Tumoren bei 17,86 $\mu\text{mol/g}$ Laktat. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine Veränderung der verwendeten Zelllinien im Laufe der Zeit sein. Diese Vermutung wird durch den Vergleich von Daten der Dresdner Arbeitsgruppe unterstützt, da auch dort die Ergebnisse der ersten Studie in der zweiten Studie nicht exakt reproduziert werden konnten. Die in beiden Studien bestimmte Pimonidazol hypoxische Fraktion stieg in UT-SCC 14 von 6,2 % \pm 2,1 auf 18,5 % \pm 6 und fiel in UT-SCC 5 von 35,2 % \pm 8 auf 23 % \pm 5,2 (Yaromina et al., 2011; Yaromina et al., 2010). Die TCD_{50} nach fraktionierter Bestrahlung war in der zweiten Studie in beiden Linien über 13 - 15 % niedriger (44,2 Gy in UT-SCC14 und 101,8 Gy in UT-SCC5; Yaromina et al. 2011) als in der ersten Projektphase (52,1 Gy in UT-SCC 14 und 117,2 Gy in UT-SCC 5; Yaromina et al. 2010).

Im Verlauf der fraktionierten Strahlentherapie konnte in beiden xenotransplantierten HNSCC-Linien eine Veränderung des Metabolitstatus detektiert werden. Diese Veränderungen sind jedoch nicht in beiden Linien gleich. Im vitalen Tumorgewebe der strahlenempfindlichen UT-SCC 14 Xenografts ist sowohl der ATP- als auch der Laktatgehalt in mit 10 Fraktionen bestrahlten Proben signifikant niedriger als in unbestrahlten Tumoren. Im Gegensatz dazu war in strahlenresistenten Tumoren der Linie UT-SCC 5 keine Veränderung des ATP-Gehaltes messbar, lediglich der Laktatgehalt lag nach 10 Fraktionen signifikant unter dem Ausgangsniveau. Der Zeitpunkt, an dem Veränderungen des Tumorstoffwechsels erkennbar werden, ist also in beiden Linien gleich. Nach einer Bestrahlung mit 10 Fraktionen, was einer Dosis von 20 Gy innerhalb von zwei Wochen entspricht, manifestieren sich strahleninduzierte Veränderungen.

Bezüglich der strahleninduzierten Veränderungen des Glukosestoffwechsels liegen bisher nur wenige bekannte Studien vor. Eine vor kurzem veröffentlichte Arbeit zeigt Ergebnisse einer ^1H MRS-Messung des Laktat zu H_2O Verhältnisses (Lak/ H_2O) in xenotransplantierten non-Hodgkins Lymphomen (Lee et al., 2010). In diesem Fall wurde das Verhältnis von Lak/ H_2O vor und 24 h sowie 72 h nach einer Einzelbestrahlung mit 15 Gy gemessen und eine Verringerung um 38 bzw. 36 % festgestellt. Auch wenn sich die Wirkung einer fraktionierten Röntgentherapie nur schwer mit den Effekten einer Einzelbestrahlung vergleichen lässt, so zeigen die in dieser Arbeit nach einer Gesamtdosis von 20 Gy detektierten Veränderungen des Laktatgehalts von 25 % in UT-SCC 14 und 28 % in UT-SCC 5 doch eine ähnliche Größenordnung.

In einer weiteren Studie von Broggin-Tenzer et al. wurden Xenografts aus humanen A549 Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 1 Gy bestrahlt, die Tumoren 12 h später entnommen und Kryoschnitte angefertigt. Mit einem ähnlich dem in dieser Arbeit verwendeten Biolumineszenzsystem wurde der Metabolitstatus hinsichtlich der ATP-, Glukose- und Laktatverteilung untersucht. Allerdings wurde dort nicht quantifiziert, sondern nur die unterschiedliche Lichtausbeute pro Fläche registriert, ohne die Werte mit Standards ins Verhältnis zu setzen. Aus ihren Biolumineszenzmessung schließen die Autoren auf eine Halbierung des Laktats und eine Verdreifachung der Glukose in bestrahlten Tumoren im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen, während der ATP-Gehalt gleich blieb (Broggin-Tenzer et al., 2011). Da für den Laktat- und Glukosenachweise das weiter oben diskutierte und auch in dieser Arbeit benutzte Enzymsystem aus Oxidoreduktase und Luciferase verwendet wurde, bei dem häufig kein linearer Zusammenhang zwischen Lichtintensität und Konzentration besteht, scheint eine direkte Umsetzung in unterschiedliche Metabolitmengen zumindest fraglich.

Auch wenn die Vergleichbarkeit der beiden zu dieser Fragestellung bis jetzt bekannten Studien und den hier gezeigten Ergebnissen aufgrund der Quantifizierung und unterschiedlichen Bestrahlungsschemata eingeschränkt ist, zeigt sich dennoch die Tendenz eine Reduzierung des Laktatgehaltes nach Bestrahlung.

Analog zu den in der ersten Projektphase durchgeführten Expressionsanalysen wurden auch in der zweiten Phase Real-Time PCR Analysen durchgeführt. Das in der ersten Studie verwendete Haushaltsgen *hmb*s war zwar geeignet, wies aber einen *ct*-Wert oberhalb der Zielgene auf, was nicht optimal ist. Deshalb wurde in einer Voruntersuchung mit einem mRNA-Extrakt aus FaDu-Zellen ein neues Referenzgen ermittelt, dass eine höhere Expression und damit einen niedrigeren *ct*-Wert aufweist. In einer Studie über die Normalisierung von Real-Time PCR Analysen bei Brustkrebs erwiesen sich *tbp* als eines der drei am besten geeigneten Referenzgene (Lyng et al., 2008). Außerdem zeigte *tbp* die gleiche Expressionseffizienz wie alle sechs Zielgene und wurde deshalb als Referenzgen ausgewählt. Zusätzlich ist die Variation des *tbp* *Ct*-Wertes sowohl innerhalb einer Behandlungsgruppe als auch im Vergleich der verschiedenen Zelllinien sehr gering (Abb. 22). *tbp* wird also zu allen untersuchten Zeitpunkten der fraktionierten Bestrahlung gleich stark exprimiert und nicht durch die Therapie in der Expression beeinflusst. Eine stabile Expression des Referenzgens ist eine Voraussetzung zur Anwendung der $\Delta\Delta$ *ct*-Methode. Da diese durch *tbp* erfüllt wird, können die Expressionsanalysen ausgewertet werden.

In der vorhergehenden Studie wurden keine Zusammenhänge zwischen dem Metabolitstatus und der Expression der Gene *ldh-a*, *pfk-l* und *glut 1* gefunden, weshalb wurden aufgrund aktueller Literaturdaten sechs neue Gene ausgewählt wurden.

Auffällig ist, dass fünf von sechs Genen in unbestrahlten Proben der Linie UT-SCC 14 stärker exprimiert werden als in UT-SCC 5, nur die *pkm2*-Expression liegt in UT-SCC 5 über der von UT-SCC 14 (Abb. 23). Dies erscheint zunächst überraschend, da Tumoren der Linie UT-SCC 5 größere Mengen Laktat produzieren und eine gesteigerte glykolytische Aktivität eine höhere Expression glykolyse-assoziiierter Enzyme vermuten lässt. Ohne weitere Kenntnisse zum Expressions- und Aktivitätsstatus der analysierten Gene kann aber über mögliche Gründe für diese Unterschiede nur spekuliert werden. Der Vergleich von LDH-A mRNA- und Proteinexpression zeigte jedoch, dass eine hohe mRNA-Expression nicht in hohen Proteinmengen resultieren muss (Sattler et al., 2010b). Ausgehend vom momentanen Kenntnisstand erscheint es eher wahrscheinlich, dass die Zelllinie UT-SCC 5 über eine effektive Transkriptionkontrolle verfügt, während die Regulationsmechanismen in UT-SCC 14 erst auf der Ebene der Translation oder der Enzymaktivität wirken.

Deutliche Unterschiede zeigen sich vor allem in den mit drei Gy bestrahlten Proben und im weiteren Verlauf der Strahlentherapie. Während die mRNA-Expression in der strahlenresistenten Linie UT-SCC 5 nahezu unverändert bleibt, stieg die Expression von fünf Genen nach drei Fraktionen in UT-SCC 14 sprunghaft an und fällt dann wieder ab. Dies könnte darauf hinweisen, dass in strahlensensiblen Zellen bereits sehr früh im Therapieverlauf Regulationsmechanismen ausgelöst werden, um z.B. durch Strahlung ausgelöste Schäden an der enzymatischen Ausstattung der Zelle auszugleichen. Zu dieser Vermutung passend ist die Beobachtung, dass das erneute Absinken der mRNA-Expression und das Abfallen des ATP-Gehaltes im Tumorgewebe simultan nach 10 Fraktionen erfolgen. Zu diesem Zeitpunkt scheinen sich in UT-SCC 14 die Strahlenschäden zu manifestieren, so dass die Tumorzellen ihre Energieproduktion nicht mehr aufrecht erhalten können. Im Gegensatz dazu zeigen UT-SCC 5 Tumoren auch nach zehn Fraktionen eine unveränderte mRNA-Expression und können ihre Energieproduktion aufrecht erhalten, wie der ATP-Status belegt. Zum jetzigen Zeitpunkt sind keine Studien bekannt, die die Expression von glykolytischen Enzymen während einer Strahlentherapie untersuchen. Deshalb muss die Analyse weiterer Zelllinien zeigen, ob es sich um grundsätzliche Unterschiede zwischen strahlenresistenten und strahlenempfindlichen Tumoren handelt. Bestätigen sich diese Ergebnisse, wäre die

veränderte mRNA-Expression ein früher Marker für das Ansprechen von Tumoren auf eine fraktionierte Strahlentherapie.

Auch in dieser Studie wurde ein Schnitt jedes Tumors CD45 gefärbt, um den Immunstatus der Xenografts zu überprüfen. Im Vergleich zu den histologischen Analysen der ersten Studie war eine höhere Infiltration des Gewebes mit Leukozyten bereits in unbestrahlten Tumoren sichtbar, so dass die Bewertungskategorien neu definiert werden mussten. Ebenfalls in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Laktatmessung ist die Feststellung, dass wie in der ersten Studie UT-SCC 14 eine höhere Zahl an CD45-positiven Zellen aufweist als UT-SCC 5; das Verhältnis der beiden Linien zueinander ist also unverändert. Die weitere Zunahme der Leukozytendichte im Verlauf der fraktionierten Strahlentherapie könnte auf Apoptose oder Sepsis zurückzuführen sein. Diese Befunde besitzen jedoch keine klinische Relevanz, da die Wahl eines immundefizienten Tiermodells die Untersuchung von Einflüssen des Immunsystems auf die Tumorprogression ausschließt (Cespedes et al., 2006). Vielmehr war das Ziel dieser Analyse, mögliche Einflüsse des Immunstatus auf das metabolische Milieu zu erkennen. Da im Gegensatz zur ersten Studie eine große Anzahl CD45-positiver Zellen festgestellt wurde, mussten zusätzliche Analysen durchgeführt werden, um einen Einfluss auf den Metabolstatus auszuschließen. Zunächst wurden einige Tumoren der höchsten Bewertungskategorie ausgewählt, in einer Überlagerung der verschiedenen Aufnahmen eingefügt und die räumliche Anordnung der Leukozyten und Metabolitgehalte verglichen. Dieser Abgleich lieferte keinerlei Hinweise darauf, dass in Arealen mit großen Leukozyten-Clustern erhöhte Laktatgehalte gemessen werden. Auch der systematische Vergleich von CD45-Bewertung der einzelnen Tumoren mit ihrem mittleren Laktat- und ATP-Gehalt widerlegt die Vermutung, dass Leukozyten signifikante Veränderungen des metabolischen Milieus verursachen. Deshalb ist es auch nicht plausibel, dass stark strahlengeschädigtes Tumorgewebe aufgrund von neu eingewanderten CD45-positiven Zellen vital erscheint. Vielmehr wird angenommen, dass die im Rahmen dieser Arbeit im Verlauf der fraktionierten Röntgenbestrahlung gezeigten Veränderungen des Tumormilieus auf die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden HNSCC-Linien zurückzuführen sind. Da die residuale Immunantwort im verwendeten Nacktmausmodell jedoch eine gewisse Variabilität aufweist, deren Ursachen nicht geklärt werden konnten, sollte auch in zukünftigen Experimenten der Immunstatus überprüft werden.

5.4 Inhibitionsversuche

Neue Ansätze der Krebstherapie, in denen die Besonderheiten des Tumorstoffwechsels gezielt als Angriffsfläche genutzt werden, sind seit einigen Jahren verstärkt in den Fokus der Forschung gerückt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Experimente durchgeführt, um auszutesten, ob einige der publizierten, spektakulären Stoffwechsellinhibitoren in xenotransplantierten HNSCC-Tumoren Wirkung zeigen.

Zunächst sollte mit einer einmaligen Gabe von Brompyruvat und DCA die kurzfristige Wirkung dieser Substanzen untersucht werden. Die Anzahl der getesteten Proben und insbesondere der Kontrollen ist aber nicht ausreichend, um umfassende Aussagen treffen zu können. Allerdings kann ein schneller, gravierender Einfluss der beiden Substanzen in der gewählten Darreichungsform *in vivo* ausgeschlossen werden, obwohl in *in vitro* Studien kurzzeitige Effekte beschrieben wurden. Sandulache et al. konnten in FaDu Monolayer-Zellkulturen nach zwei Stunden Inkubation mit 50mM BrPA eine deutliche Abnahme des Redoxpotentials messen. Mit 2-Desoxyglukose, einem weiteren Hexokinase-Inhibitor der die gleiche Wirkung zeigte, wurde außerdem eine signifikante Reduktion der Laktatproduktion im FaDu Monolayer erzielt (Sandulache et al., 2011). In unserer Studie ist entgegen der Erwartung der Laktatgehalt in Xenografts, die mit der höheren BrPA-Dosis behandelt wurden, sogar signifikant höher als in mit PBS behandelten Kontrolltumoren. Da jeweils nur vier Kontrollschnitte zur Verfügung standen und die Kontrollen zum Teil linienuntypisch niedrige Laktatwerte aufwiesen, sollte diesem Ergebnis aber keine zu große Bedeutung beigemessen werden. Dennoch scheint der erfolgreiche Einsatz von BrPA zur deutlichen Senkung des Laktatgehaltes in diesen Tumorkulturen in der gewählten Darreichungsform unwahrscheinlich, so dass mit dieser Substanz keine weiteren Versuche durchgeführt wurden. Die einmalige, orale Gabe von DCA ist, verbunden mit einer kurzen Wirkungsdauer von zwei Stunden, wahrscheinlich nicht ausreichend, um detektierbare Änderungen des Metabolismus zu erzielen.

Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Versuch eine Woche lang DCA im Trinkwasser oder zwei mal täglich als Injektion *ip* verabreicht. Ebenfalls intraperitoneal wurde ein mal täglich CHC gegeben. Auch nach der einwöchigen Gabe von DCA konnte keine Auswirkung auf den ATP- oder Laktatgehalt in Xenografts der Linien FaDu und UT-SCC 5 beobachtet werden. Ebenso führte die Injektion von CHC zu keiner Veränderung dieser beiden Parameter. α -Cyano-4-Hydroxycinnamat (CHC) ist ein Inhibitor des Monocarboxylattransporter 1 (MCT1). Sonveaux et al. erzielten durch die Injektion von

CHC eine Verzögerung des Tumorwachstums und eine Strahlensensibilisierung in Mäusen (Sonveaux et al., 2008). In ihrer Arbeit vermuten die Autoren, dass in soliden Tumoren in einer „metabolischen Symbiose“ hypoxische Tumorzellen Glukose zu Laktat verstoffwechseln, welches bevorzugt von oxygenierten Tumorzellen über den MCT1 aufgenommen und in die Oxidative Phosphorylierung eingeschleust wird. Durch Inhibition des MCT1 steigt der Glukoseverbrauch in oxygenierten Zellen, so dass die hypoxischen Tumorzellen von der Nährstoffversorgung abgekoppelt werden und absterben (Feron, 2009).

Da von Sonveaux et al. (2008) eine Umverteilung des intratumoralen Laktates nach CHC-Gabe postuliert wurde, wurden neben der Ermittlung der Mittelwerte weitere Analysen durchgeführt. Zunächst zeigen die falschfarbekalibrierten ATP- und Laktataufnahmen, dass durch die CHC-Injektionen keine strukturelle Änderung der Tumoren hervorgerufen wird. Das Auftreten von Nekrosen und das Muster der Laktatverteilung ist in beiden Behandlungsgruppen heterogen. Um diesen Befund weiter abzusichern wurde eine quantitative Auswertung vorgenommen, in der ermittelt wurde, mit welcher Häufigkeit verschiedenen Laktatgehalte im vitalen Tumorgewebe gemessen wurden. Auch im Vergleich dieser Häufigkeitsverteilung konnte in Tumoren beider HNSCC-Linien kein Unterschied festgestellt werden. Es ist deshalb davon auszugehen, dass mit beiden Substanzen in der gewählten Darreichungsform keine Verringerung des Laktatgehaltes erzielt werden kann, obwohl dies in der neueren wissenschaftlichen Literatur beschrieben wurde. Die Gründe für diese Diskrepanz könnten neben vielen anderen Faktoren in zelllinienspezifischen Unterschieden liegen. Auch muss in Betracht gezogen werden, dass CHC nicht spezifisch auf MCT1 wirkt, sondern noch andere Monocarboxylattransporter getroffen werden (Sattler et al., 2010a). Des Weiteren ist auch nicht auszuschließen, dass die übrigen Transporter die Funktion von MCT1 übernehmen und damit den Funktionsverlust ausgleichen. In einer aktuellen Studie von I. Stratford zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der MCT4 Proteinexpression in Patientenbiopsien und deren Überleben (persönliche Kommunikation). Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass der Familie der Monocarboxylat-Transporter bei Krebserkrankungen eine Bedeutung zukommt. Diese Befunde und der Stand der Wissenschaft bezüglich der zellulären und molekularen Wirkung von DCA und CHC lassen weitere systematische Untersuchungen auf diesem Gebiet als dringend erforderlich erscheinen.

5.5 Messung von Nadelbiopsien

Durch die Entnahme von Biopsien bietet sich die Möglichkeit, verschiedene histologische und metabolische Parameter von Tumoren oder Xenografts in einem frühen Stadium zu analysieren und anschließend das weitere Wachstum und den Einfluß einer Behandlung im selben Individuum zu verfolgen. Mit einem solchen Verfahren könnte die prädiktive Aussagekraft von Markern verbessert werden, die bisher nur an einem Probenkontingent erhoben wurden (Yaromina et al., 2009a). Insbesondere scheint ein solches Verfahren geeignet um zu untersuchen, ob der Laktatgehalt in Xenografts mit der individuellen Strahlenantwort korreliert. Auch für Studien zur Wirksamkeit von Glykolyseinhibitoren wäre es wünschenswert, einen direkten Vergleich des Stoffwechselstatus vor und nach Behandlung durchführen zu können.

Die Biolumineszenzmessung des Laktatgehaltes von 38 Lateralschnitten aus Nadelbiopsien aus UT-SCC 5 Xenografts lieferte nur eine vorläufige Beurteilung zu den Möglichkeiten dieser methodischen Erweiterung. Zunächst erscheint die Messung und Auswertung prinzipiell möglich, da die Falschfarben kalibrierten Aufnahmen deutliche regionale Unterschiede im Laktatgehalt zeigen. Auch die Kontur der Schnitte ist klar zu erkennen, so dass eine Überlagerung mit den Durchlichtaufnahmen durchgeführt werden kann. Dies ermöglicht zumindest eine Erkennung von nekrotischem und vitalem Gewebe, eine genauere Differenzierung der Strukturen erscheint aber schwierig.

Die aus den Lichtintensitäten berechneten Laktatgehalte erscheinen zum Teil plausibel und sind in Übereinstimmung mit den in ganzen Schnitten gemessenen Werten. So weisen 12 Schnitte einen Laktatgehalt zwischen 20 und 35 $\mu\text{mol/g}$ auf. Im Gegensatz dazu lag der Laktatgehalt in 5 Schnitten über 50 $\mu\text{mol/g}$ und in 8 weiteren Schnitten so hoch, dass er nicht berechnet werden konnte. Allerdings besteht keine Korrelation zwischen dem Laktatgehalt der einzelnen Nadelbiopsieschnitte und dem Erfolg der fraktionierten Bestrahlung der Tumoren mit 90 oder 100 Gy. Ein möglicher Grund für das Fehlen einer solchen Korrelation könnte sein, dass der in der sehr kleinen Gewebeprobe ermittelte Laktatgehalt keine Aussage über den Gesamtgehalt des Tumors zulässt. Um die Aussagekraft der Laktatmessung von Nadelbiopsien zu erhöhen, wäre es deshalb notwendig, in einem Vergleichsexperiment Messwerte aus mehreren Tumor- und Biopsieschnitten einzelner Xenografts gegenüberzustellen. Yaromina et al. verglichen bereits in einer Studie mit vier humanen HNSCC-Linien vier histologische Parameter (Pimonidazol hypoxische Fraktion, relative Gefäßfläche, relativer Anteil perfundierter Gefäße und nekrotische Fraktion) in Gesamt- und Biopsieschnitten

(Yaromina et al., 2009a). Nur in der Linie UT-SCC 5 waren alle diese an Biopsien ermittelten Parameter signifikant mit den Gesamtwerten korreliert, allerdings hatten diese Ergebnisse keine Aussagekraft über den Erfolg einer fraktionierten Strahlentherapie.

Wenn die Laktatmessung eines Biopsieschnittes sich in weiteren Tests als repräsentativ für den gesamten Tumor erweist, könnte in einer breiter angelegten Studie die prädiktive Aussagekraft des Laktatgehaltes für individuelle Tumoren getestet werden. Im Rahmen einer solchen Studie sind einige technische Verbesserungen denkbar, etwa die Verwendung eines uneingefrorenen Laktatmixes mit höherer Lichtausbeute. Die dadurch ermöglichte kürzere Belichtungszeit würde Diffusionseffekte, die die Bildqualität und Messgenauigkeit beeinträchtigen, minimieren. Außerdem wäre es wünschenswert, drei Standardschnitte verschiedener Konzentration in Biopsiegröße in einem Standardschnitt zusammenzufassen. Dies würde eine ungefähre Einschätzung des Laktatgehalts einer Probe mit nur zwei Messungen erlauben und wäre ein Schritt hin zur routinemäßigen Anwendung.

5.6 Vergleich von MRT und Biolumineszenz

Eine *in vivo*-Diagnose des Laktatgehaltes wäre ein wichtiger Schritt um die bisherigen Ergebnisse für die Klinik nutzbar zu machen und eine Strahlentherapie individuell an den Patienten anzupassen. In früheren Versuchen konnte an einzelnen Schnitten verschiedener Tumorklinien ein ähnliches Verteilungsmuster des Laktates in MRT- und Biolumineszenzaufnahmen festgestellt werden (nicht publiziert). Ob mittels MRT eine ähnliche prognostische Aussagekraft erzielt werden kann, konnte aber nicht geklärt werden. Deshalb sollte ein gepaartes Experiment zunächst Aufschluss darüber geben, ob mittels MRT eine Einteilung hin Hoch- und Niedriglaktattumoren vorgenommen werden kann und ob eine Korrelation zwischen Biolumineszenz und MRT-Ergebnissen besteht.

Für die Vergleichsstudie wurden die beiden Linien UT-SCC 14 und UT-SCC 5 ausgewählt, die in früheren Studien stets große Unterschiede im Laktatgehalt aufwiesen (s. Abb. 15a und Abb. 26b). In den in der Vergleichsstudie untersuchten Tumoren zeigte sich diese Unterteilung allerdings nicht (Abb. 37). Ein Hauptgrund für diese veränderte Charakteristik liegt wahrscheinlich in der Zystenbildung der UT-SCC 14 Tumoren. Die in den Zysten angesammelte Gewebsflüssigkeit erscheint in den Biolumineszenzaufnahmen sehr laktatreich und es kann eine grundsätzliche Veränderung des Tumorstoffwechsels nicht ausgeschlossen werden. Beim Vergleich der MRT- und

Biolumineszenzaufnahmen mit der HE-Färbung ist vor allem auffällig, dass mittels MRT die stärksten Signale in Bereichen detektiert wurden, in denen im Schnitt kein Tumorgewebe vorhanden ist. Im Gegensatz dazu ist in einigen Tumorregionen, die in der Biolumineszenz hohe Laktatgehalte aufweisen, kein Laktat mittels MRT detektierbar. Erklärt werden kann dies durch die unterschiedlichen Messverfahren: Mit der Magnetresonanz kann nur freies Laktat, etwa in der Gewebsflüssigkeit und den Interzellularräumen, nachgewiesen werden. Bereits in früheren Studien anderer Arbeitsgruppen wurde eine unterschiedliche gute Nachweisbarkeit von Laktat mittels Magnetresonanzspektroskopie (MRS) in verschiedenen Geweben festgestellt. In einer Studie an Zellkulturen wurden in der MRS zwischen 60 und 77 % des insgesamt vorhandenen Laktats detektiert (Kotitschke et al., 1994). In Muskeln von Ratten konnten jedoch nur 21 bis 32 % des Gesamtlaktates nachgewiesen werden (Jouvensal et al., 1997). Im Gegensatz zur Magnetresonanz kann die induzierte, metabolische Biolumineszenz jedoch sowohl freies als auch gebundenes Laktat quantifizieren. Aus diesem Grund erscheint es plausibel, dass kein direkter Zusammenhang zwischen den Ergebnissen beider Methoden besteht. Trotzdem lassen sich einige Rückschlüsse aus den aktuellen Messungen ziehen: Eine direkte Übertragung der Erkenntnisse aus der Studie zur Strahlenresistenz in zehn humanen HNSCC-Linien ist auf MRT-Untersuchungen nicht möglich, da die gemessenen Laktatgehalte aufgrund der unterschiedlichen Methoden nicht vergleichbar sind. Die Abweichung der Messwerte ist auch nicht systematisch, so dass kein Umrechnungsfaktor bestimmt werden konnte, der die Werte vergleichbar macht. Da die mittels MRT erhaltenen Laktatwerte sehr eng zusammen liegen, erscheint es allerdings auch grundsätzlich zweifelhaft, ob mit diesem Vorgehen eine prognostische Aussage möglich wäre. Das Ziel, für einzelne Tumoren eine prädiktive Aussage zum Behandlungserfolg treffen zu können, scheint mit der in diesem MRT-Verfahren gegebenen Auflösung nicht erreichbar. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Le et al., die *in vivo* ^1H MRS Laktatmessungen bei Stage 4 HNSCC-Patienten durchführten. In dieser Studie wurde zwar ein stärkeres Laktatsignal in befallenen Lymphknoten als im subkutanen Normalgewebe festgestellt, dies korrelierte aber nicht mit dem Ansprechen auf eine Chemotherapie, was die Autoren hauptsächlich auf die niedrige Empfindlichkeit der Methode zurückführen (Le et al., 2008).

Studien anderer Arbeitsgruppen weisen jedoch darauf hin, dass andere Variationen der Magnetresonanzmessung für einen solchen Einsatz geeignet sein könnten. Tessier et al. stellten mittels ^1H high-resolution magic angle spinning spectroscopy in

histologisch als maligne bewerteten Prostata-Biopsien einen signifikant höheren Laktatgehalt als in benignen Biopsien fest (1,59 im Vergleich zu 0,61 mmol/kg (2008)).

5.7 Fazit

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Optimierung der metabolischen, induzierten Biolumineszenzmessung zum Nachweis von Stoffwechselprodukten in kryokonservierten Tumorschnitten führte zur Etablierung eines neuen digitalen Kamerasystems und der Optimierung des Ansatzprotokolls des Enzymmixes. Durch das Mitführen von Kontrollen und eine neue, teilautomatisierte Auswertung konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deutlich verbessert werden. Mit dem neuen Kamerasystem und dem neu etablierten Ansatz- und Messprotokoll wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit ca. 1500 Tumorschnitte gemessen und ausgewertet.

Insbesondere die Laktatbiolumineszenz lieferte in der Vergangenheit wichtige Beiträge zur Erforschung des Zusammenhanges zwischen Tumorstoffwechsel und der Malignität einer Krebserkrankung. Mit dem Abschluss einer Studie an zehn humanen xenotransplantierten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Laktatgehalt in soliden Tumoren und dem Erfolg einer fraktionierten Strahlentherapie besteht.

In einer weiterführenden Studie wurde im gleichen Xenograftmodell der Einfluss einer fraktionierten Strahlentherapie auf den Tumorstoffwechsel untersucht. Hier konnte in ersten Ergebnissen gezeigt werden, dass grundlegende Unterschiede zwischen strahlenresistenten und strahlensensiblen Tumoren bestehen. In strahlensensiblen Tumoren zeigt dabei eine signifikante Abnahme des ATP-Gehaltes nach zehn Fraktionen die Wirksamkeit der Therapie, während die Tumoren der strahlenresistenten Linie noch unverändert vitales Tumorgewebe aufwiesen. Weiterhin konnte in strahlensensiblen Tumoren zu einem sehr frühen Zeitpunkt der fraktionierten Bestrahlung ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression glykolyse-assoziiierter Gene detektiert werden. Dieser fehlte in strahlenresistenten Tumoren. Wenn diese Ergebnisse in weiteren Tumorkulturen bestätigt werden, könnte dies als Marker zur Abschätzung des Therapieerfolges einer fraktionierten Bestrahlung Anwendung finden.

Aufgrund aktueller Publikationen erscheint die Inhibition des Tumorstoffwechsels ein geeigneter Weg, hoch maligne Tumoren gezielt anzugreifen und den Therapieerfolg zu verbessern. In dem etablierten Xenograftmodell und mit der metabolischen, induzierten

Biolumineszenz konnte die Wirksamkeit dieser Inhibitoren jedoch nicht bestätigt werden, so dass weiter Forschungen auf diesem Gebiet notwendig erscheinen.

6 Danksagung

7 Literatur

Amann, T., and Hellerbrand, C. (2009). GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Expert Opin Ther Targets* 13, 1411-1427.

Baumann, M., Krause, M., and Hill, R. (2008). Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer* 8, 545-554.

Bayer, C., Schilling, D., Hoetzel, J., Egermann, H. P., Zips, D., Yaromina, A., Geurts-Moespot, A., Sprague, L. D., Sweep, F., Baumann, M., *et al.* (2008). PAI-1 levels predict response to fractionated irradiation in 10 human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Radiother Oncol* 86, 361-368.

Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C. T., Lopaschuk, G. D., Puttagunta, L., Bonnet, S., *et al.* (2007). A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11, 37-51.

Bristow, R. G., and Hill, R. P. (2005). Molecular and Cellular Basis of Radiotherapy. In *The basic science of oncology*, I.F. Tannock, R.P. Hill, R.G. Bristow, and L. Harrington, eds. (New York: The McGraw-Hill Companies), pp. 261-288.

Brizel, D. M., Schroeder, T., Scher, R. L., Walenta, S., Clough, R. W., Dewhirst, M. W., and Mueller-Klieser, W. (2001). Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51, 349-353.

Brockton, N., Dort, J., Lau, H., Hao, D., Brar, S., Klimowicz, A., Petrillo, S., Diaz, R., Doll, C., and Magliocco, A. (2011). High Stromal Carbonic Anhydrase IX Expression Is Associated With Decreased Survival in p16-Negative Head-and-Neck Tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80, 249-257.

Broggini-Tenzer, A., Vuong, V., and Pruschy, M. (2011). Metabolism of tumors under treatment: Mapping of metabolites with quantitative bioluminescence. *Radiother Oncol*.

Cespedes, M. V., Casanova, I., Parreno, M., and Mangués, R. (2006). Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol* 8, 318-329.

Claussen, C. D., and Horger, M. (2010). Grundprinzipien der diagnostischen Radiologie. In *Die Onkologie*, W.H.H.C.B. (Hrsg.), ed. (Heidelberg: Springer Medizin Verlag), pp. 373-380.

Czernin, J., Benz, M. R., and Allen-Auerbach, M. S. (2010). PET/CT imaging: The incremental value of assessing the glucose metabolic phenotype and the structure of cancers in a single examination. *Eur J Radiol* 73, 470-480.

DeBerardinis, R. J. (2008). Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genet Med* 10, 767-777.

Denko, N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 8, 705-713.

Fabian, C. (2009) Strahlenbiologische und metabolische Charakterisierung von Zelllinien humaner Plattenepithelkarzinome, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz.

Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., Forastiere, A., and Gillison, M. L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Ins* 100, 261-269.

Fang, J., Quinones, Q. J., Holman, T. L., Morowitz, M. J., Wang, Q., Zhao, H., Sivo, F., Maris, J. M., and Wahl, M. L. (2006). The H⁺-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma. *Mol Pharmacol* 70, 2108-2115.

Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol* 92, 329-333.

Ferreira, L. M. (2010). Cancer metabolism: the Warburg effect today. *Exp Mol Pathol* 89, 372-380.

Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., *et al.* (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 109, 3812-3819.

Fraga, H. (2008). Firefly luminescence: a historical perspective and recent developments. *Photochem Photobiol Sci* 7, 146-158.

Ganapathy, V., Thangaraju, M., and Prasad, P. D. (2009). Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther* 121, 29-40.

Gatenby, R. A., and Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4, 891-899.

Gillies, R. J., Robey, I., and Gatenby, R. A. (2008). Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med* 49 Suppl 2, 24S-42S.

Godinot, C., de Laplanche, E., Hervouet, E., and Simonnet, H. (2007). Actuality of Warburg's views in our understanding of renal cancer metabolism. *J Bioenerg Biomembr* 39, 235-241.

Goetze, K., Walenta, S., Ksiazkiewicz, M., Kunz-Schughart, L. A., and Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int J Oncol* 39, 453-463.

Grotius, J., Dittfeld, C., Huether, M., Mueller-Klieser, W., Baumann, M., and Kunz-Schughart, L. A. (2009). Impact of exogenous lactate on survival and radioresponse of carcinoma cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 85, 989-1001.

Groussard, C., Morel, I., Chevanne, M., Monnier, M., Cillard, J., and Delamarche, A. (2000). Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol* 89, 169-175.

- Haddad, R. I., and Shin, D. M. (2008). Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359, 1143-1154.
- Haji-Michael, P. G., Ladriere, L., Sener, A., Vincent, J. L., and Malaisse, W. J. (1999). Leukocyte glycolysis and lactate output in animal sepsis and ex vivo human blood. *Metabolism* 48, 779-785.
- Halestrap, A. P., and Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343 Pt 2, 281-299.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanekop, G. G., Bautz, M. T., and Ensink, F. B. M. (2010). Grundlagen der Symptomkontrolle in der Palliativmedizin In *Die Onkologie*, W. Hiddemann, and C. Bartram, eds. (Heidelberg: Springer Medizin Verlag), pp. 622-674.
- Hill, R. P., and Bristow, R. G. (2005). The Scientific Basis of Radiotherapy. In *The basic science of oncology*, I.F. Tannock, R.P. Hill, R.G. Bristow, and L. Harrington, eds. (New York: The McGraw-Hill Companies), pp. 289-321.
- Hörner, C. (2010) Messungen zum Glukosestoffwechsel in xenotransplantierten Humantumoren mit definierter Strahlensensibilität, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Hsu, P. P., and Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703-707.
- Huang, P., Taghian, A., Allam, A., Freeman, J., Duffy, M., and Suit, H. (1996). The effect of whole-body irradiation of nude mice on the tumor transplantability and control probability of a human soft tissue sarcoma xenograft. *Radiat Res* 145, 337-342.
- Jouvensal, L., Carlier, P. G., and Bloch, G. (1997). Low visibility of lactate in excised rat muscle using double quantum proton spectroscopy. *Magn Reson Med* 38, 706-711.
- Kanz, L. (2001). Neoplasien. In *Klinische Pathophysiologie*, W. Siegenthaler, ed. (Stuttgart: Thieme Verlag), pp. 1110-1120.
- Kawasaki, M., Uobe, K., and Tanaka, A. (1997). A novel immunohistochemical technique for the detection of human oral carcinomas transplanted in nude mice using mouse monoclonal antibodies. *Histochem Cell Biol* 107, 177-182.
- Kessler, R., Bleichert, F., Warnke, J. P., and Eschrich, K. (2008). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB3) is up-regulated in high-grade astrocytomas. *J Neurooncol* 86, 257-264.
- KID (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends., 7. Ausgabe edn (Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg).).
- Kim, J.-W., Gao, P., and Dang, C. V. (2007a). Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev* 26, 291-298.

Kim, J.-W., Gao, P., Liu, Y.-C., Semenza, G. L., and Dang, C. V. (2007b). Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol* 27, 7381-7393.

Ko, Y. H., Smith, B. L., Wang, Y., Pomper, M. G., Rini, D. A., Torbenson, M. S., Hullihen, J., and Pedersen, P. L. (2004). Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 269-275.

Koppenol, W. H., Bounds, P. L., and Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 11, 325-337.

Kotitschke, K., Schnackerz, K. D., Dringen, R., Bogdahn, U., Haase, A., and von Kienlin, M. (1994). Investigation of the ¹H NMR visibility of lactate in different rat and human brain cells. *NMR Biomed* 7, 349-355.

Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K. C., and Harris, A. L. (2005). Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor-associated stroma. *Neoplasia* 7, 1-6.

Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Winter, S., Leek, R., Sivridis, E., and Harris, A. L. (2009). Lactate dehydrogenase 5 expression in squamous cell head and neck cancer relates to prognosis following radical or postoperative radiotherapy. *Oncology* 77, 285-292.

Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, 472-482.

Lavi, J., Raunio, R., Malkov, Y., and Lovgren, T. (1983). The effect of luciferase and NADH:FMN oxidoreductase concentrations on the light kinetics of bacterial bioluminescence. *Biochem Biophys Res Commun* 111, 266-273.

Le, Q.-T., Koong, A., Lieskovsky, Y. Y., Narasimhan, B., Graves, E., Pinto, H., Brown, J. M., and Spielman, D. (2008). In vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy of lactate in patients with stage IV head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71, 1151-1157.

Lee, S. C., Poptani, H., Pickup, S., Jenkins, W. T., Kim, S., Koch, C. J., Delikatny, E. J., and Glickson, J. D. (2010). Early detection of radiation therapy response in non-Hodgkin's lymphoma xenografts by in vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy and imaging. *NMR Biomed* 23, 624-632.

Luo, W., and Semenza, G. L. (2011). Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget*.

Lyng, M. B., Laenkholm, A. V., Pallisgaard, N., and Ditzel, H. J. (2008). Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer* 8, 20.

Mazon, R., Tao, Y., Lusinchi, A., and Bourhis, J. (2009). Current concepts of management in radiotherapy for head and neck squamous-cell cancer. *Oral Oncol* 45, 402-408.

- Mazurek, S., Boschek, C. B., Hugo, F., and Eigenbrodt, E. (2005). Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 15, 300-308.
- Moeller, B. J., and Dewhirst, M. W. (2006). HIF-1 and tumour radiosensitivity. *Br J Cancer* 95, 1-5.
- Morchel, P., Melkus, G., Yaromina, A., Zips, D., Baumann, M., Jakob, P. M., and Flentje, M. (2011). Correlating quantitative MR measurements of standardized tumor lines with histological parameters and tumor control dose. *Radiother Oncol*.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marin-Hernández, A., and Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274, 1393-1418.
- Mueller-Klieser, W., and Walenta, S. (1993). Geographical mapping of metabolites in biological tissue with quantitative bioluminescence and single photon imaging. *Histochem J* 25, 407-420.
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118, 3030-3044.
- Paschen, W. (1985). Regional quantitative determination of lactate in brain sections. A bioluminescent approach. *J Cereb Blood Flow Metab* 5, 609-612.
- Paschen, W., Mies, G., Kloiber, O., and Hossmann, K. A. (1985). Regional quantitative determination of brain glucose in tissue sections: a bioluminescent approach. *J Cereb Blood Flow Metab* 5, 465-468.
- Paschen, W., Niebuhr, I., and Hossmann, K. A. (1981). A bioluminescence method for the demonstration of regional glucose distribution in brain slices. *J Neurochem* 36, 513-517.
- Pedersen, P. L., Mathupala, S., Rempel, A., Geschwind, J. F., and Ko, Y. H. (2002). Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta* 1555, 14-20.
- Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R.-H., and Huang, P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25, 4633-4646.
- Pfeifer, B., Preiß, J., and Unger, C. (2006). *Onkologie integrativ*, 1. edn (München: Urban & Fischer Verlag).
- Pinheiro, C., Albergaria, A., Paredes, J., Sousa, B., Dufloth, R., Vieira, D., Schmitt, F., and Baltazar, F. (2010). Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma. *Histopathology* 56, 860-867.
- Pötter, R., Georg, D., Handl-Zeller, L., Kranz, A., and Selzer, E. (2010). Strahlentherapie. In *Die Onkologie*, W.H.H.C.B. (Hrsg.), ed. (Heidelberg: Springer Medizin Verlag), pp. 437-468.
- Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N. M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437-443.

Quennet, V. (2007) Bedeutung des Glukosestoffwechsels für die Strahlenempfindlichkeit solider Tumoren, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Quennet, V., Yaromina, A., Zips, D., Rosner, A., Walenta, S., Baumann, M., and Mueller-Klieser, W. (2006). Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother Oncol* *81*, 130-135.

Ragin, C. C., and Taioli, E. (2007). Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer* *121*, 1813-1820.

Robey, I. F., Lien, A. D., Welsh, S. J., Baggett, B. K., and Gillies, R. J. (2005). Hypoxia-inducible factor-1alpha and the glycolytic phenotype in tumors. *Neoplasia (New York, NY)* *7*, 324-330.

Rofstad, E. K. (1989). Local tumor control following single dose irradiation of human melanoma xenografts: relationship to cellular radiosensitivity and influence of an immune response by the athymic mouse. *Cancer Res* *49*, 3163-3167.

Salahudeen, A. K., Clark, E. C., and Nath, K. A. (1991). Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest* *88*, 1886-1893.

Sandulache, V. C., Ow, T. J., Pickering, C. R., Frederick, M. J., Zhou, G., Fokt, I., Davis-Maleseovich, M., Priebe, W., and Myers, J. N. (2011). Glucose, not glutamine, is the dominant energy source required for proliferation and survival of head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer*.

Sattler, U. G., Hirschhaeuser, F., and Mueller-Klieser, W. F. (2010a). Manipulation of glycolysis in malignant tumors: fantasy or therapy? *Curr Med Chem* *17*, 96-108.

Sattler, U. G., Meyer, S. S., Quennet, V., Hoerner, C., Knoerzer, H., Fabian, C., Yaromina, A., Zips, D., Walenta, S., Baumann, M., and Mueller-Klieser, W. (2010b). Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother Oncol* *94*, 102-109.

Sattler, U. G., and Mueller-Klieser, W. (2009). The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis. *Int J Radiat Biol* *85*, 963-971.

Sattler, U. G., Walenta, S., and Mueller-Klieser, W. (2007). A bioluminescence technique for quantitative and structure-associated imaging of pyruvate. *Lab Invest* *87*, 84-92.

Schaefer, C., Mayer, W. K., Kruger, W., and Vaupel, P. (1993). Microregional distributions of glucose, lactate, ATP and tissue pH in experimental tumours upon local hyperthermia and/or hyperglycaemia. *J Cancer Res Clin Oncol* *119*, 599-608.

Schütte, J., and Bath, J. (2010). Zytostatische Chemotherapie. In *Die Onkologie*, W. Hiddemann, and C. Bartram, eds. (Heidelberg: Springer Medizin Verlag), pp. 401-436.

Schwickert, G., Walenta, S., Sundfjør, K., Rofstad, E. K., and Mueller-Klieser, W. (1995). Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res* *55*, 4757-4759.

Siewert, J. R., and Vogelsang, H. E. (2010). Grundlagen der onkologischen Chirurgie. In Die Onkologie, W. Hiddemann, and C. Bartram, eds. (Heidelberg: Springer Medizin Verlag), pp. 469-479.

Sola-Penna, M. (2008). Metabolic regulation by lactate. *IUBMB life* 60, 605-608.

Sonveaux, P., Vegran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., Saedeleer, C. J., Kennedy, K. M., Diepart, C., Jordan, B. F., *et al.* (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118, 3930-3942.

Stacpoole, P. W., Nagaraja, N. V., and Hutson, A. D. (2003). Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug. *J Clin Pharmacol* 43, 683-691.

Statistisches Bundesamt (2010). Gesundheit - Todesursachen in Deutschland. In Fachserie 12 Reihe 4, (Wiesbaden).

Swietach, P., Vaughan-Jones, R. D., and Harris, A. L. (2007). Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 26, 299-310.

Tamulevicius, P., and Streffer, C. (1995). Metabolic imaging in tumours by means of bioluminescence. *Br J Cancer* 72, 1102-1112.

Tamulevicius, P., and Streffer, C. (1997). Bioluminescence imaging of metabolites in a human tumour xenograft after treatment with hyperthermia and/or the radiosensitizer pimonidazole. *Int J Hyperthermia* 13, 235-245.

Tennant, D. A., Duran, R. V., Boulahbel, H., and Gottlieb, E. (2009). Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis* 30, 1269-1280.

Tennant, D. A., Duran, R. V., and Gottlieb, E. (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 10, 267-277.

Tessem, M.-B., Swanson, M. G., Keshari, K. R., Albers, M. J., Joun, D., Tabatabai, Z. L., Simko, J. P., Shinohara, K., Nelson, S. J., Vigneron, D. B., *et al.* (2008). Evaluation of lactate and alanine as metabolic biomarkers of prostate cancer using ¹H HR-MAS spectroscopy of biopsy tissues. *Magn Reson Med* 60, 510-516.

Tsutsumi, S., Fukasawa, T., Yamauchi, H., Kato, T., Kigure, W., Morita, H., Asao, T., and Kuwano, H. (2009). Phosphoglucose isomerase enhances colorectal cancer metastasis. *Int J Oncol* 35, 1117-1121.

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.

Walenta, S., Chau, T.-V., Schroeder, T., Lehr, H.-A., Kunz-Schughart, L. A., Fuerst, A., and Mueller-Klieser, W. (2003). Metabolic classification of human rectal adenocarcinomas: a novel guideline for clinical oncologists? *J Cancer Res Clin Oncol* 129, 321-326.

Walenta, S., and Mueller-Klieser, W. F. (2004). Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin Radiat Oncol* 14, 267-274.

Walenta, S., Salameh, A., Lyng, H., Evensen, J. F., Mitze, M., Rofstad, E. K., and Mueller-Klieser, W. (1997). Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol* 150, 409-415.

Walenta, S., Schroeder, T., and Mueller-Klieser, W. (2004). Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem* 11, 2195-2204.

Walenta, S., Wetterling, M., Lehrke, M., Schwickert, G., Sundfjør, K., Rofstad, E. K., and Mueller-Klieser, W. (2000). High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60, 916-921.

Warburg, O. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* 12, 1131-1137.

WHO (2008). World Cancer Report 2008, (Lyon: World Health Organisation - International agency for research on Cancer).

Wigfield, S. M., Winter, S. C., Giatromanolaki, A., Taylor, J., Koukourakis, M. L., and Harris, A. L. (2008). PDK-1 regulates lactate production in hypoxia and is associated with poor prognosis in head and neck squamous cancer. *Br J Cancer* 98, 1975-1984.

Wilson, G. D. (2007). Cell kinetics. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 19, 370-384.

Wittekind, C., and Meyer, H.-J. (2010). TNM: Klassifikation maligner Tumoren, 7. Auflage edn (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).

Xu, R. H., Pelicano, H., Zhou, Y., Carew, J. S., Feng, L., Bhalla, K. N., Keating, M. J., and Huang, P. (2005). Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 65, 613-621.

Yalcin, A., Telang, S., Clem, B., and Chesney, J. (2009). Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol* 86, 174-179.

Yanagawa, T., Watanabe, H., Takeuchi, T., Fujimoto, S., Kurihara, H., and Takagishi, K. (2004). Overexpression of autocrine motility factor in metastatic tumor cells: possible association with augmented expression of KIF3A and GDI-beta. *Lab Invest* 84, 513-522.

Yaromina, A., Eckardt, A., Zips, D., Eicheler, W., Schuetze, C., Thames, H., and Baumann, M. (2009a). Core needle biopsies for determination of the microenvironment in individual tumours for longitudinal radiobiological studies. *Radiother Oncol* 92, 460-465.

Yaromina, A., Krause, M., Thames, H., Rosner, A., Krause, M., Hessel, F., Grenman, R., Zips, D., and Baumann, M. (2007). Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 83, 304-310.

Yaromina, A., Kroeber, T., Meinzer, A., Boeke, S., Thames, H., Baumann, M., and Zips, D. (2011). Exploratory study of the prognostic value of microenvironmental parameters

during fractionated irradiation in human squamous cell carcinoma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **80**, 1205-1213.

Yaromina, A., Quennet, V., Zips, D., Meyer, S., Shakirin, G., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., and Baumann, M. (2009b). Co-localisation of hypoxia and perfusion markers with parameters of glucose metabolism in human squamous cell carcinoma (hSCC) xenografts. *Int J Radiat Biol* **85**, 972-980.

Yaromina, A., Thames, H., Zhou, X., Hering, S., Eicheler, W., Dorfler, A., Leichtner, T., Zips, D., and Baumann, M. (2010). Radiobiological hypoxia, histological parameters of tumour microenvironment and local tumour control after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* **96**, 116-22.

Yaromina, A., Zips, D., Thames, H. D., Eicheler, W., Krause, M., Rosner, A., Haase, M., Petersen, C., Raleigh, J. A., Quennet, V., *et al.* (2006). Pimonidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: the need for a multivariate approach in biomarker studies. *Radiother Oncol* **81**, 122-129.

Zhu, A., Lee, D., and Shim, H. (2011). Metabolic positron emission tomography imaging in cancer detection and therapy response. *Semin Oncol* **38**, 55-69.

Zips, D., Adam, M., Flentje, M., Haase, A., Molls, M., Mueller-Klieser, W., Petersen, C., Philbrook, C., Schmitt, P., Thews, O., *et al.* (2004). Impact of hypoxia and the metabolic microenvironment on radiotherapy of solid tumors. Introduction of a multi-institutional research project. *Strahlenther Onkol.* **180**, 609-615.

8 Lebenslauf

9 Anhang

9.1 Biolumineszenzdaten der fraktionierten

Bestrahlungsstudie

UT-SCC 14		Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$)				MW	SD
Tumor Nr.	fax	Segment I	Segment II	Segment III	Segment IV		
458	0	17,35	12,78	13,57	12,96	14,16	2,15
459	0	15,48	18,65	17,77	19,59	17,87	1,76
460	0	16,22	15,27	17,00	14,45	15,73	1,11
461	0	15,06	15,77	13,44	13,20	14,37	1,25
509	3	14,04	14,79	12,72	15,61	14,29	1,23
510	3	19,60	25,61	16,56	18,08	19,96	3,96
511	3	14,65	32,23	16,83	20,27	17,25	2,84
516	15	9,40	11,23	10,82	10,09	10,39	0,81
533	5	19,43	21,47	15,46	19,87	19,06	2,55
535	5	15,33	14,59	17,50	14,41	15,45	1,42
565	10	19,05	13,50	17,96	13,55	16,02	2,91
566	10	7,97	8,78	7,63	9,63	8,50	0,89
568	10	10,40	15,11	14,42	11,55	12,87	2,26
584	3	19,24	19,38	22,69	19,73	20,26	1,63
634	15	12,03	12,96	14,34	13,50	13,21	0,97
788	5	9,26	10,92	9,58	9,06	9,70	0,84
789	5	17,41	20,53	17,91	26,01	20,46	3,94
790	5	18,47	17,21	25,66	18,77	18,15	0,83
791	5	24,81	22,33	22,76	27,66	24,39	2,43
796	3	20,57	20,70	22,73	17,02	20,25	2,37
797	3	16,65	14,50	16,39	16,93	16,12	1,10
798	3	24,40	22,04	19,11	21,25	21,70	2,18
799	3	10,32	11,01	14,59	10,44	11,59	2,02
800	0	18,11	18,57	20,91	16,52	18,52	1,82
802	0	18,85	16,42	16,74	16,56	17,14	1,15
811	10	11,68	13,20	10,79	11,88	11,89	0,99
822	3	13,93	15,33	14,88	14,20	14,59	0,64
840	3	26,67	21,05	18,61	33,32	24,91	6,54
841	3	17,15	14,86	15,08	17,37	16,12	1,33
842	3	19,01	18,07	16,32	15,58	17,25	1,57
843	3	21,60	20,08	23,18	20,22	21,27	1,45
844	5	k.M.	14,36	11,01	12,36	12,58	1,69
845	5	27,30	15,20	16,05	17,80	19,09	5,58
846	5	16,11	15,57	14,16	14,65	15,12	0,88
847	5	22,18	21,04	21,02	18,80	20,76	1,41
861	0	16,34	21,95	18,32	15,56	18,04	2,85
863	0	18,82	24,05	20,50	21,44	21,20	2,19
889	0	16,23	15,55	16,88	17,72	16,60	0,93
896	10	10,73	15,77	13,60	14,70	13,70	2,17
897	10	20,41	13,80	21,98	25,11	22,50	2,39
920	10	9,63	12,46	11,13	13,82	11,76	1,80
924	15	14,68	11,87	13,06	12,98	13,15	1,16
954	0	15,51	22,09	17,89	18,16	18,41	2,72
967	0	24,84	22,79	23,94	26,20	24,44	1,44
968	5	28,05	23,73	27,52	26,40	26,43	1,93

UT-SCC 14		ATP-Gehalt ($\mu\text{mol/g}$)					
Tumor Nr.	fx	Segment I	Segment II	Segment III	Segment IV	MW	SD
458	0	1,36	1,67	1,55	1,50	1,52	0,13
459	0	1,54	1,51	1,81	1,84	1,68	0,18
460	0	1,58	1,61	1,17	1,80	1,54	0,27
461	0	1,70	1,46	1,59	1,70	1,61	0,12
509	3	1,69	1,51	1,84	1,71	1,69	0,14
510	3	1,88	1,48	1,89	1,71	1,74	0,19
511	3	2,13	3,01	2,33	1,98	2,15	0,18
513	15	0,66	0,64	0,61	0,47	0,60	0,08
515	15	0,39	0,36	0,38	0,42	0,39	0,02
516	15	0,18	0,43	0,58	0,68	0,47	0,22
533	5	1,57	1,68	1,78	1,87	1,73	0,13
535	5	1,81	1,38	1,33	1,49	1,50	0,21
565	10	0,82	0,60	0,67	0,65	0,69	0,10
566	10	1,52	1,24	1,42	1,42	1,40	0,11
567	10	0,34	0,28	0,30	0,26	0,30	0,03
568	10	0,37	0,52	0,49	0,69	0,52	0,13
584	3	1,42	1,61	1,50	1,66	1,55	0,11
634	15	0,83	0,77	0,74	0,60	0,73	0,10
788	5	0,78	0,62	0,77	0,62	0,70	0,09
789	5	1,77	1,55	1,85	2,20	1,84	0,27
790	5	1,81	1,63	3,10	1,87	1,77	0,13
791	5	0,79	1,41	1,58	1,39	1,29	0,34
796	3	1,49	1,20	1,33	1,44	1,36	0,13
797	3	1,80	1,83	1,79	1,71	1,78	0,05
798	3	1,74	1,79	1,91	1,12	1,64	0,36
799	3	1,46	1,13	1,56	1,66	1,45	0,23
800	0	1,37	1,64	1,51	1,48	1,50	0,11
802	0	1,57	1,61	1,25	1,24	1,42	0,20
810	10	0,60	0,68	0,81	0,59	0,67	0,10
811	10	1,08	1,31	0,88	1,12	1,10	0,18
822	3	1,48	1,51	1,68	1,68	1,59	0,11
840	3	1,41	1,78	1,82	1,85	1,72	0,20
841	3	0,78	0,75	0,86	0,90	0,82	0,07
842	3	1,34	1,52	1,21	1,22	1,33	0,14
843	3	1,40	1,59	1,69	1,67	1,59	0,13
844	5	1,40	2,16	1,08	1,42	1,30	0,19
845	5	1,68	1,78	1,61	1,59	1,67	0,08
846	5	1,45	1,52	1,72	1,58	1,57	0,12
847	5	1,57	1,28	1,46	1,47	1,45	0,12
861	0	1,09	1,66	1,62	1,89	1,57	0,34
863	0	1,67	1,41	1,63	1,50	1,55	0,12
889	0	1,09	1,22	1,27	1,64	1,31	0,24
895	10	1,11	1,32	1,05	1,27	1,19	0,13
896	10	1,06	1,09	1,11	1,34	1,15	0,13
897	10	0,41	0,44	0,40	0,45	0,42	0,02
920	10	0,91	0,75	0,83	0,95	0,86	0,09
924	15	0,86	0,60	0,61	0,53	0,65	0,15
925	15	0,31	1,02	0,78	0,90	0,75	0,31
926	15	0,19	0,32	0,37	0,62	0,37	0,18
927	15	0,50	0,56	0,51	0,51	0,52	0,03
933	5	1,21	1,17	1,47	1,23	1,27	0,14
941	5	1,23	0,61	1,31	1,50	1,16	0,39
942	10	0,91	0,86	0,88	0,72	0,84	0,08
943	15	1,14	0,99	1,54	1,00	1,17	0,26
954	0	1,80	1,62	2,01	2,05	1,87	0,20
967	0	1,72	1,72	1,92	1,75	1,78	0,10
968	5	1,30	1,55	1,26	1,26	1,34	0,14

UT-SCC 5		Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$)						
Tumor Nr.	fx	Segment I	Segment II	Segment III	Segment IV	MW	SD	
125	5	45,96	32,96	42,57	27,48	37,24	8,52	
126	5	33,98	35,57	35,63	41,85	36,75	3,48	
127	5	36,65	25,70	26,14	24,60	28,27	5,62	
128	5	42,49	36,47	41,85	41,45	40,57	2,77	
137	3	43,65	36,81	37,60	40,17	39,56	3,08	
138	3	40,16	32,35	42,00	23,53	34,51	8,43	
139	3	24,03	25,96	48,37	24,32	30,67	11,83	
140	3	26,18	32,07	25,84	26,99	27,77	2,91	
141	15	19,75	17,24	20,54	17,89	18,86	1,55	
142	15	14,00	19,81	18,16	22,17	18,53	3,44	
143	15	30,44	22,40	26,65	31,52	27,75	4,14	
144	15	20,92	19,70	25,42	34,11	25,04	6,53	
182	0	26,67	28,41	48,23	n.b.	34,44	11,98	
183	0	33,92	32,50	35,91	32,51	33,71	1,61	
184	0	k.M.	46,56	40,47	34,39	40,47	6,09	
187	0	27,85	25,01	33,35	29,20	28,85	3,47	
200	10	17,71	29,69	21,22	21,54	22,54	5,08	
201	10	22,07	22,45	20,55	16,85	20,48	2,56	
202	10	25,16	22,54	24,01	30,90	25,65	3,66	
389	0	n.b.	29,97	32,41	34,01	32,13	2,03	
390	0	32,27	32,66	27,10	26,13	29,54	3,40	
391	0	37,68	30,39	33,72	28,12	32,48	4,16	
392	0	30,63	30,97	42,04	34,11	34,43	5,30	
489	5	30,17	32,87	25,60	21,06	27,42	5,20	
490	5	29,87	31,81	31,02	23,44	29,04	3,81	
491	5	47,78	30,22	38,95	36,30	38,31	7,29	
492	5	23,51	25,55	30,76	23,15	25,74	3,51	
517	10	16,66	32,85	24,43	22,81	24,19	6,68	
518	10	19,79	23,82	18,28	21,85	20,94	2,42	
520	10	20,64	16,78	24,39	20,91	20,68	3,11	
529	0	34,51	28,27	43,68	25,86	33,08	7,95	
530	0	23,01	27,57	39,88	28,00	29,61	7,21	
531	0	32,44	28,68	24,82	28,46	28,60	3,11	
532	0	20,60	19,36	21,42	34,19	23,89	6,92	
584	3	36,06	35,04	22,59	33,90	31,90	6,27	
585	3	33,12	29,91	29,44	41,49	33,49	5,58	
586	3	36,55	26,53	31,72	20,71	28,88	6,81	
587	3	24,30	19,79	29,08	25,06	24,56	3,80	
592	15	24,69	32,19	24,98	25,71	26,89	3,56	
594	15	22,20	15,60	23,19	26,22	21,80	4,47	
595	15	33,47	31,21	20,02	30,26	28,74	5,97	
617	10	22,85	20,74	22,43	23,15	22,30	1,08	
654	5	k.M.	26,11	34,21	30,08	30,13	4,05	
783	3	31,99	22,53	24,32	31,76	27,65	4,93	
784	3	34,92	36,62	39,05	36,39	36,74	1,71	
785	3	34,21	37,85	24,40	37,82	33,57	6,35	
786	3	32,97	34,51	34,24	28,54	32,57	2,76	
793	10	21,20	19,51	16,47	23,08	20,07	2,80	
794	10	22,19	31,62	39,28	30,70	30,95	6,99	
796	10	24,36	23,24	20,22	18,49	21,58	2,70	
842	15	18,47	22,91	22,82	28,50	23,18	4,11	
844	15	27,61	24,84	22,54	23,43	24,61	2,21	
845	15	12,78	13,05	11,60	10,62	12,01	1,12	
846	15	23,92	30,24	27,46	27,93	27,39	2,61	
929	5	25,71	31,91	25,61	25,53	27,19	3,15	
930	5	23,56	26,64	23,40	25,66	24,82	1,59	
931	5	25,70	24,34	k.M.	25,01	25,02	0,68	

UT-SCC 5		ATP-Gehalt ($\mu\text{mol/g}$)					
Tumor Nr.	fx	Segment I	Segment II	Segment III	Segment IV	MW	SD
125	5	1,62	1,47	1,73	1,40	1,55	0,15
126	5	1,67	1,97	1,84	1,77	1,81	0,12
127	5	1,29	1,62	1,44	1,28	1,41	0,16
128	5	1,12	1,23	1,30	1,45	1,27	0,14
137	3	1,48	1,44	1,60	1,54	1,52	0,07
138	3	1,23	1,16	1,39	1,44	1,30	0,13
139	3	1,24	1,51	1,42	1,29	1,37	0,12
140	3	1,37	1,17	1,45	1,24	1,30	0,12
141	15	1,07	0,89	1,12	1,27	1,09	0,16
142	15	1,02	0,88	1,08	1,00	0,99	0,08
143	15	1,15	1,22	1,14	0,99	1,13	0,10
144	15	1,52	2,27	2,10	1,94	1,96	0,32
182	0	1,44	1,30	1,56	2,10	1,60	0,35
183	0	1,50	1,52	1,73	1,73	1,62	0,13
184	0	1,12	1,14	1,17	1,25	1,17	0,06
187	0	1,81	1,30	1,57	1,60	1,57	0,21
200	10	1,01	0,97	1,55	0,89	1,11	0,30
201	10	1,68	0,88	1,19	1,18	1,23	0,33
202	10	1,20	0,70	0,79	0,83	0,88	0,22
389	0	0,82	1,09	0,71	0,97	0,90	0,17
390	0	1,21	1,08	0,91	1,08	1,07	0,12
391	0	1,32	1,18	1,32	1,62	1,36	0,19
392	0	1,34	0,76	1,02	1,15	1,07	0,24
489	5	1,27	1,56	1,33	1,53	1,42	0,14
490	5	1,00	1,28	1,04	1,17	1,12	0,13
491	5	1,04	0,95	0,79	1,06	0,96	0,12
492	5	1,43	1,21	1,43	1,46	1,38	0,12
517	10	1,46	0,97	1,71	1,72	1,47	0,35
518	10	2,00	1,83	1,95	1,95	1,93	0,07
520	10	1,37	1,36	1,63	1,88	1,56	0,25
529	0	1,43	1,51	1,22	1,76	1,48	0,22
530	0	1,81	1,68	1,64	1,59	1,68	0,09
531	0	1,45	1,56	1,41	1,43	1,46	0,07
532	0	1,68	0,81	1,59	2,15	1,56	0,56
584	3	1,22	1,15	1,42	k.M.	1,26	0,14
585	3	1,20	0,92	1,05	1,52	1,17	0,26
586	3	1,41	1,45	1,22	1,29	1,34	0,11
587	3	1,16	1,15	1,25	1,28	1,21	0,07
592	15	1,70	1,42	1,60	2,00	1,68	0,24
594	15	1,36	1,57	1,34	1,38	1,41	0,11
595	15	1,59	1,56	1,13	1,21	1,37	0,24
617	10	1,19	1,67	1,53	2,06	1,61	0,36
654	5	1,83	1,49	1,54	1,58	1,61	0,15
783	3	1,04	1,15	1,19	1,30	1,17	0,11
784	3	1,33	0,95	1,24	1,09	1,15	0,17
785	3	1,68	1,96	1,75	1,94	1,83	0,14
786	3	1,49	1,79	1,83	1,56	1,67	0,17
793	10	1,04	1,06	1,12	0,97	1,05	0,06
794	10	1,45	1,31	1,68	0,78	1,31	0,38
796	10	1,48	1,71	1,77	1,78	1,68	0,14
842	15	0,99	0,91	0,96	0,92	0,94	0,04
844	15	1,34	1,82	1,50	1,45	1,53	0,21
845	15	1,00	0,94	0,78	0,66	0,85	0,16
846	15	1,38	1,11	1,47	1,23	1,30	0,16
929	5	0,90	1,10	1,23	1,27	1,12	0,17
930	5	0,93	0,77	0,94	0,63	0,82	0,15
931	5	1,05	1,25	0,98	1,25	1,13	0,14

9.2 RealTime-PCR-Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlungsstudie

UT-SCC 14 Tumor Nr.	<i>fx</i>	<i>C_t tbp</i>	<i>hk2</i>	<i>pkm2</i>	<i>mct1</i>	<i>pfk2</i>	<i>pdk1</i>	<i>gpi</i>
#460	0	25,822	5,12	1,68	0,92	2,92	2,84	0,49
#458	0	26,174	5,73	1,81	0,96	3,72	3,34	0,59
#459	0	25,578	17,04	1,53	1,17	11,99	7,75	1,00
#461	0	26,239	3,62	1,86	0,83	2,24	2,48	0,56
#509	3	25,226	21,31	2,25	1,38	14,96	8,82	0,94
#510	3	24,871	8,34	1,80	1,42	6,58	4,70	0,87
#511	3	24,837	1,00	1,59	1,09	4,60	3,47	0,69
#533	5	24,635	17,12	1,57	0,84	18,33	4,91	0,69
#535	5	25,223	1,27	1,99	1,13	6,23	3,40	0,60
#584	3	25,528	14,79	2,51	1,47	11,61	7,84	1,18
#789	5	26,086	15,08	2,73	0,83	15,96	3,46	0,63
#790	5	26,066	20,33	2,96	1,30	18,13	7,01	1,12
#791	5	24,808	14,44	1,20	1,20	10,53	5,69	0,83
#796	3	26,464	8,25	3,19	1,37	8,70	4,19	0,86
#797	3	25,913	10,81	2,71	1,41	8,48	6,51	0,97
#798	3	25,157	27,70	2,49	1,35	15,76	7,50	0,91
#799	3	25,901	10,54	3,44	1,36	10,38	5,83	0,80
#800	0	26,331	4,67	3,15	0,95	3,23	4,15	0,80
#802	0	27,317	2,15	3,53	1,32	2,31	3,55	0,66
#811	10	27,290	2,87	2,04	0,95	6,32	3,22	0,55
#822	3	25,607	21,22	3,53	1,62	9,92	6,94	1,13
#840	3	27,232	18,70	2,60	1,55	25,71	5,53	0,87
#841	3	25,023	8,28	3,22	1,47	8,60	4,56	0,57
#842	3	26,829	14,05	6,08	2,26	21,97	5,51	1,35
#843	3	25,813	20,59	4,09	1,81	21,43	6,30	1,39
#844	5	27,290	6,89	1,66	1,18	5,66	3,30	0,65
#845	5	25,985	14,80	2,77	1,13	15,12	3,86	0,62
#846	5	26,396	5,81	2,11	1,07	9,94	2,79	0,39
#847	5	25,597	13,48	3,50	1,66	16,56	4,24	0,94
#861	0	25,539	13,65	2,62	1,49	11,13	6,30	0,83
#863	0	26,461	8,07	4,26	1,58	7,83	4,27	1,22
#889	0	27,989	3,25	4,00	1,26	3,25	3,10	0,94
#896	10	26,010	4,44	2,51	1,05	7,47	2,68	0,65
#920	10	25,768	2,93	2,06	1,20	4,24	2,52	0,61
#941	5	27,212	8,33	3,44	1,24	8,02	4,95	0,96
#942	10	26,079	3,38	2,44	0,84	7,27	1,71	0,51
#954	0	25,291	7,01	3,41	1,14	8,55	3,21	0,68
#967	0	25,567	7,19	3,83	1,26	9,15	4,30	0,86
#968	5	26,353	7,43	2,67	0,80	9,21	2,15	0,43

UT-SCC 5 Tumor Nr.	<i>fx</i>	<i>C_T tbp</i>	<i>hk2</i>	<i>pkm2</i>	<i>mct1</i>	<i>pfk2</i>	<i>pdk1</i>	<i>gpi</i>
#125	5	26,070	1,93	4,81	1,53	7,11	4,47	0,34
#126	5	24,997	1,82	3,21	0,73	3,45	2,53	0,26
#127	5	25,536	2,01	4,44	0,89	5,82	2,75	0,27
#128	5	25,037	2,22	5,06	0,94	6,40	3,76	0,44
#137	3	25,209	2,49	4,03	1,12	4,86	3,37	0,39
#138	3	25,752	1,32	4,19	0,72	4,39	2,67	0,29
#139	3	24,318	2,66	3,33	0,98	6,52	3,54	0,33
#140	3	25,217	1,49	2,70	0,86	2,46	1,86	0,23
#141	15	26,261	0,66	3,34	0,78	2,46	1,79	0,15
#142	15	25,724	0,58	3,32	0,67	1,32	2,65	0,25
#143	15	24,722	3,15	6,15	0,91	4,80	3,28	0,57
#144	15	24,410	1,74	3,44	0,71	2,39	1,98	0,37
#182	0	26,359	1,31	5,36	1,55	3,12	5,12	0,40
#183	0	25,491	1,25	4,10	0,66	3,18	2,27	0,34
#184	0	24,254	1,78	4,17	0,65	2,78	3,19	0,34
#187	0	25,296	1,82	4,50	0,63	6,33	2,41	0,30
#201	10	25,032	1,28	4,57	0,82	3,36	2,61	0,31
#389	0	25,175	2,11	4,21	0,91	6,07	4,25	0,40
#390	0	25,657	2,70	3,98	0,79	6,28	3,86	0,40
#391	0	25,647	1,75	4,44	0,84	4,14	2,58	0,29
#392	0	26,171	0,89	3,42	0,86	3,22	1,99	0,35
#489	5	24,629	3,18	4,14	0,80	9,12	3,72	0,41
#490	5	24,357	2,29	4,03	0,75	6,03	3,53	0,37
#517	10	24,091	2,30	3,06	0,83	4,75	3,55	0,35
#518	10	24,856	0,62	3,03	0,60	2,58	1,35	0,16
#520	10	24,358	2,09	3,05	0,74	4,94	3,33	0,29
#529	0	25,111	1,64	4,90	0,73	4,48	3,00	0,45
#530	0	24,803	3,02	4,18	0,80	5,85	2,91	0,38
#531	0	25,222	2,05	3,32	0,71	5,16	2,70	0,28
#532	0	25,232	1,24	3,77	0,55	2,97	2,51	0,25
#585	3	24,482	2,08	3,18	0,62	5,21	2,49	0,33
#586	3	26,393	4,20	9,15	1,18	5,61	5,05	0,66
#587	3	24,364	3,15	2,65	0,65	3,41	2,52	0,38
#594	15	25,224	1,88	3,97	0,73	6,32	3,45	0,37
#654	5	25,166	1,38	4,40	0,67	5,29	2,53	0,35
#783	3	24,590	2,33	1,72	0,73	2,95	2,51	0,23
#784	3	24,755	2,12	1,30	0,77	3,62	2,71	0,19
#785	3	26,302	0,50	1,44	0,88	5,69	3,80	0,24
#786	3	24,327	2,76	4,90	0,84	3,80	4,56	0,42
#794	10	24,788	0,80	2,66	0,50	1,78	2,14	0,21
#842	15	25,005	1,72	1,52	0,50	4,78	2,70	0,24
#846	15	24,685	1,38	1,70	0,76	2,13	3,21	0,23
#929	5	25,357	1,02	1,20	0,47	2,70	1,82	0,19
#930	5	25,418	5,72	2,02	0,67	5,31	3,57	0,31
#931	5	26,398	0,92	4,12	0,76	2,42	1,63	0,26

9.3 Inhibitionsversuche

9.3.1 Einmahlige Gabe

UT-SCC-5

	Tumor Nr.	Segment	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)	SD	ATP ($\mu\text{mol/g}$)	SD
PBS	830	I	7,26	1,49	1,98	0,37
		II	9,87	1,76	2,00	0,34
	823	I	18,54	1,75	1,60	0,47
		II	21,85	1,65	1,06	0,37
	MW		14,38	6,93	1,66	0,44
DCA, 50 mg/kg	817	I	16,78	1,48	1,09	0,28
		II	21,61	1,71	1,18	0,28
	819	I	21,16	1,63	1,69	0,25
		II	17,15	1,43	1,37	0,13
	824	I	15,89	1,70	1,82	0,38
		II	18,61	2,31	1,47	0,39
	828	I	12,28	1,31	1,34	0,43
II		13,20	1,69	1,59	0,36	
MW		17,09	3,36	1,44	0,25	
DCA, 100 mg/kg	820	I	12,49	2,63	1,74	0,46
		II	15,74	2,75	1,55	0,44
	822	I	24,74	1,66	1,47	0,35
		II	23,15	1,74	1,57	0,33
	827	I	16,19	1,96	2,44	0,32
		II	17,24	1,72	2,21	0,35
	829	I	21,12	1,44	1,85	0,22
		II	21,49	1,55	2,12	0,23
MW		19,02	4,22	1,87	0,35	
BrPA, 5 mg/kg	811	I	18,36	1,50	1,40	0,36
		II	18,33	1,90	1,37	0,33
	815	I	23,59	1,56	1,23	0,46
		II	23,06	1,32	1,52	0,27
	818	I	13,87	1,89	2,27	0,29
		II	16,08	1,74	2,18	0,22
	821	I	24,01	2,30	1,60	0,30
II		22,53	2,17	1,96	0,31	
MW		19,98	3,84	1,69	0,39	
BrPA, 50 mg/kg	812	I	31,25	2,68	1,51	0,39
		II	26,78	2,11	1,81	0,33
	813	I	23,08	1,53	1,65	0,37
		II	24,29	1,68	1,64	0,32
	816	I	23,03	2,38	1,48	0,30
		II	27,15	2,12	1,46	0,27
	825	I	23,77	2,29	1,52	0,44
II		21,76	2,15	2,05	0,32	
MW		25,14	3,09	1,64	0,20	

FaDu						
	Tumor Nr.	Segment	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)	SD	ATP ($\mu\text{mol/g}$)	SD
PBS	851	I	11,27	1,93	2,03	0,23
		II	10,15	1,68	1,44	0,19
	842	I	13,27	1,56	1,61	0,27
		II	14,21	1,63	1,40	0,24
	MW		12,23	1,85	1,62	0,29
DCA, 50 mg/kg	845	I	12,09	1,77	1,53	0,30
		II	12,26	1,86	1,80	0,29
	848	I	18,24	1,92	2,07	0,29
		II	17,05	1,85	1,71	0,30
	855	I	13,22	2,08	1,72	0,21
		II	11,82	2,01	1,80	0,22
	881	I	11,34	1,65	0,60	0,22
		II	10,47	1,67	0,71	0,29
	MW		13,31	2,80	1,49	0,54
DCA, 100 mg/kg	847	I	12,29	1,92	1,81	0,25
		II	12,88	1,85	1,86	0,27
	854	I	16,44	1,71	1,63	0,38
		II	14,13	1,37	1,63	0,35
	856	I	9,10	1,31	2,05	0,23
		II	9,14	1,25	2,02	0,26
	882	I	12,85	2,09	1,20	0,36
		II	12,05	1,93	1,47	0,31
	MW		12,36	2,43	1,71	0,29
BrPA, 5 mg/kg	849	I	13,77	1,77	1,96	0,29
		II	12,95	1,64	1,83	0,22
	850	I	8,83	1,46	1,92	0,27
		II	8,53	1,68	1,85	0,22
	852	I	14,22	1,63	1,41	0,27
		II	15,50	1,84	1,59	0,24
	853	I	19,17	1,58	1,92	0,26
		II	17,46	2,06	2,14	0,26
MW		13,80	3,75	1,83	0,23	
BrPA, 50 mg/kg	841	I	16,26	2,16	1,81	0,32
		II	17,25	2,31	1,90	0,25
	843	I	13,21	2,29	1,96	0,35
		II	12,99	2,02	1,78	0,28
	846	I	20,39	2,36	1,49	0,24
		II	18,25	2,18	1,68	0,23
	858	I	15,11	2,09	1,82	0,32
		II	13,48	2,11	1,88	0,31
MW		15,87	2,67	1,79	0,15	

9.3.2 Einwöchige Gabe

UT5					
	Tumor	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)	SD	ATP ($\mu\text{mol/g}$)	SD
DCA-Trinkwasser (100mg/kg)	175	30,12	3,34	1,95	0,36
	180	36,74	3,49	2,28	0,33
	183	33,73	3,52	2,28	0,37
	186	25,39	3,27	2,50	0,29
	189	18,70	2,84	2,07	0,28
	MW	28,94	7,12	2,21	0,21
Kontrolle (Trinkwasser)	179	28,88	3,29	2,54	0,30
	181	30,28	3,74	1,89	0,38
	184	46,14	3,29	2,38	0,29
	187	30,62	2,90	2,05	0,27
	190	27,29	3,04	2,21	0,33
	MW	32,64	7,66	2,21	0,26
DCA Injektionen (2x/d 50mg/kg)	111	31,82	3,46	2,32	0,22
	116	n.b.	3,85	2,54	0,22
	147	24,62	2,86	3,02	0,22
	204	26,33	3,25	2,42	0,31
	224	18,99	2,93	2,78	0,26
	MW	25,44	5,28	2,62	0,28
Kontrollinjektionen (2x/d H ₂ O)	96	15,33	2,53	2,09	0,33
	196	25,41	2,94	2,47	0,31
	202	28,17	3,25	1,89	0,23
	225	22,08	2,52	2,47	0,20
	229	21,26	2,71	2,71	0,35
	MW	22,45	4,84	2,33	0,33
CHC Injektionen (150mg/kg)	106	25,13	2,86	1,64	0,33
	107	28,80	3,72	2,34	0,24
	113	28,08	2,94	1,66	0,32
	167	29,47	2,96	2,52	0,30
	200	25,50	3,20	2,76	0,22
	MW	27,40	1,97	2,19	0,51
Kontrollinjektionen (H ₂ O)	103	28,60	3,09	2,72	0,21
	171	20,63	2,52	2,66	0,21
	198	26,92	2,91	2,21	0,23
	233	23,60	3,41	2,00	0,25
	97	45,17	3,57	2,33	0,25
	MW	28,98	9,55	2,39	0,31

		FaDu			
	Tumor	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)	SD	ATP ($\mu\text{mol/g}$)	SD
DCA-Trinkwasser (100mg/kg)	309	24,72	3,37	2,46	0,15
	311	22,31	2,79	2,90	0,18
	317	30,12	3,31	2,95	0,15
	321	24,42	3,09	1,81	0,29
	324	15,60	2,85	2,60	0,19
	338	18,53	2,86	2,43	0,19
	MW	22,62	5,10	2,52	0,41
Kontrolle (Trinkwasser)	303	n.b.	1,86	3,19	0,17
	305	16,90	2,72	2,86	0,19
	306	18,80	2,93	2,18	0,22
	320	18,19	2,91	2,42	0,17
	330	19,45	2,81	2,30	0,25
	MW	18,34	1,09	2,59	0,42
DCA Injektionen (2x/d 50mg/kg)	267	28,49*	4,81	3,72*	0,22
	269	19,78	3,01	2,01	0,27
	273	27,91	3,54	1,89	0,25
	288	12,26	2,98	2,19	0,21
	291	19,43	3,05	2,37	0,22
	MW	19,85	6,39	2,12	0,21
Kontrollinjektionen (2x/d H ₂ O)	264	19,13	2,88	2,98	0,14
	275	19,80	2,67	2,45	0,25
	284	14,27	2,90	2,60	0,22
	285	10,33	2,26	2,76	0,22
	287	17,12	2,87	2,56	0,22
	MW	16,13	3,89	2,67	0,21
CHC Injektionen (150mg/kg)	250	19,53	2,80	2,50	0,16
	268	20,66	2,83	2,67	0,21
	271	31,53	3,79	2,08	0,35
	276	17,92	2,95	2,76	0,22
	279	18,75	2,69	2,92	0,22
	283	19,53	3,36	2,41	0,20
	MW	21,32	5,09	2,56	0,30
Kontrollinjektionen (H ₂ O)	266	19,36	2,91	2,67	0,19
	277	22,36	2,85	2,24	0,23
	278	21,17	2,86	2,62	0,25
	280	16,72	2,80	2,28	0,19
	314	15,87	3,19	2,78	0,14
	MW	19,10	2,79	2,52	0,24

*nicht hitzefixiert, nicht einberechnet

9.4 Nadelbiopsiemessungen

Biopsie aus Tumor Nr.	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)	SD	Dosis	Fläche
UT5 #633	38,5	5,8	90	1,375
UT5 #642	n.b.	5,8	100	1,667
UT5 #644	23,7	5,8	100	1,146
UT5 #659	27,7	5,2	100	1,511
UT5 #683	37,2	5,9	90	1,696
UT5 #684	49,3	5,4	90	1,624
UT5 #686	n.b.	6,7	90	2,176
UT5 #701	45,5	5,7	100	2,883
UT5 #702	19,5	6,0	100	1,082
UT5 #705	40,6	7,2	100	1,304
UT5 #706	29,1	4,7	100	0,543
UT5 #708	n.b.	9,3	100	1,233
UT5 #709	54,4	6,0	90	0,859
UT5 #711	29,1	4,4	90	1,357
UT5 #712	38,5	5,9	90	1,814
UT5 #717	n.b.	6,7	90	1,394
UT5 #720	41,1	5,4	90	1,242
UT5 #741	55,2	6,1	100	2,142
UT5 #743	n.b.	6,7	100	1,67
UT5 #744	n.b.	10,8	100	0,809
UT5 #753	9,3*	3,2	90	1,803
UT5 #754	n.b.	6,2	90	2,365
UT5 #755	26,4	4,5	90	1,508
UT5 #802	58,9	7,8	100	1,688
UT5 #804	40,2	5,0	100	1,439
UT5 #806	46,2	5,9	100	1,173
UT5 #807	n.b.	5,6	100	1,816
UT5 #808	32,4	4,9	100	1,639
UT5 #817	n.b.	7,7	90	1,694
UT5 #820	33,9	5,6	90	1,458
UT5 #821	32,3	5,1	90	0,525
UT5 #823	51,7	6,0	90	1,097
UT5 #839	51,2	6,8	90	0,959
UT5 #842	34,6	5,3	100	0,772
UT5 #843	45,0	5,3	90	0,607
UT5 #847	25,4	6,0	100	1,433
UT5 #851	50,5	7,4	100	1,47
UT5 #852	21,6	4,7	100	0,99
UT5 #853	47,4	6,5	90	1,95

9.5 Verwendete Geräte

-80°C Truhe Here Freeze	Thermo Scientific, Bonn
AccuJet pro	Brand, Wertheim
Brutschrank Heraeus Hanau	Heraeus, Hanau
Casy one	Schärfe, Reutlingen
CCD-Kamera	Hamamatsu, Herrsching
Dispenser Handystep Electronic	Brand, Wertheim
Färbeschiffchen	VWR, Darmstadt
FastPrep-24	M.P. Biomedicals, Irvine, USA
Feuchte Kammer	VWR, Darmstadt
Flexiperm	Greiner, Frickenhausen
Geldokumentationsanlage	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gelkammer Biorad München	Biorad, München
iXon IQ DU-888,	Andor, Belfast, Irland
Kryostat	SLEE, Mainz
Kryotom	SLEE, Mainz
Küvetten	VWR, Darmstadt
Megafuge 1,0 R, Rotor 2252	Heraeus, Hanau
Mikroskop Olympus IM	Olympus, Hamburg
Nanodrop 1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
pH Meter	Schott, Mainz
Photomikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Photonenzähler 2400	Hamamatsu, Herrsching
Realtime Gerät 7300 ABI	Foster City, USA
Secfroid Miniliyo I	Dromorand SA, Schweiz
Spiegelreflexkamera D80,	Nikon, Japan
Sterilwerkbank	Gelair, Meckenheim
Stickstoffanlage	Air Liquide, Düsseldorf
Tischzentrifuge 3000	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Ehret, Emmendingen
Vortexer	Bender+Hohlbein, Zürich
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Hannover
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

9.6 Verbrauchsmaterial

96-Well Platte	Greiner, Frickenhausen
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einwegskalpelle	Braun, Melsungen
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
Objektträger SuperFrostPlus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	Roth Karlsruhe

PCR Tubes	Molecular BioProducts, San Diego, USA
Pipettenspitzen (10 µl)	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Greiner, Frickenhausen
Precelly 1.4 mm Keramik	PeqLab
Reaktionsgefäße (0,5 ml - 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Sechs-Well-Platten	Greiner, Frickenhausen
Spitzen für Multipette	VWR, Darmstadt
Zellkulturflaschen (25, 75 cm ²)	Greiner, Frickenhausen

9.7 Kits

DAB+	Dako, Hamburg
ARK (Animal-Research-Kit) Peroxidase	Dako, Hamburg
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
L-Laktat Kit	r-biopharm, Darmstadt
NucleoSpin® Total RNA-Protein Extraktion Kit	Macherey-Nagel, Düren
RevertAid First Strand cDNA Synthesis	Fermentas, St. Leon Roth

9.8 Reagenzien, Chemikalien, Enzyme und Antikörper

1,4-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Casy Clean	Schärfe Reutlingen
Casyton	Schärfe Reutlingen
DMEM 4,5 g/l Glukose, mit L-Glut	PAA Pasching, Österreich
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FCS PAA	PAA Pasching, Österreich
Firefly lanterns Photinus pyralis	Sigma-Aldrich, Steinheim
Flavinmononucleotid	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd 37 %ig Fluka/Sigma-	Aldrich, Steinheim
Glukose	Merck, Darmstadt
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Roche, München
Glutamat-Pyruvat-Transaminase	Roche, München
Goat anti-Rat IgG	Dianova, Hamburg
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Hexokinase	Roche, München
Laktatdehydrogenase	Roche, München

L-Laktat	AppliChem, Darmstadt
Luziferase (<i>Vibrio fischeri</i>)	Roche, München
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
mouse anti-human Cytokeratin AE1/AE3	Dako, Hamburg
NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase	Roche, München
Natrium-Arsenat	Merck, Darmstadt
Natriumglutamat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	AppliChem, Darmstadt
Natriumpyruvat	AppliChem, Darmstadt
nicht-essentielle Aminosäuren	PAA Pasching, Österreich
Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid	Roche, München
PBS Biochrom AG Berlin	Biochrom AG Berlin
Perchlorsäure	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglycol	Merck, Darmstadt
Polyvinylalkohol	Merck, Darmstadt
Rat Anti-CD45-mouse	Abcam, Cambridge, UK
Roti-Histokit II	Roth, Karlsruhe
TissueTek	Sakura, Torrance, CA, USA
Trypsin/EDTA	PAA Pasching, Österreich

9.9 Software

Adobe Photoshop CS3	Adobe Systems GmbH, München
AndorIQ	Andor, Belfast, Irland
EndNote X.0.2	Thomson Reuters, New York City, USA
ImageJ 1.40	National Institute of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Origin 8G	OriginLab Corporation, Northampton, USA
Wasabi	Hamamatsu, Herrsching

9.10 Puffer für die Biolumineszenz

Laktat: 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0)

KH ₂ PO ₄	5,57 g/l
Na ₂ HPO ₄	8,39 g/l

Glukose: 0,3 M Phosphatpuffer (pH 7,0)

KH ₂ PO ₄	13,22 g/l
Na ₂ HPO ₄	28,80 g/l

ATP: 0,2 M HEPES-Puffer (pH 7,6) für Standards

Hepes 52,06 g/l

ATP: 0,2 M HEPES-Puffer (pH 7,6) mit Natriumarsenat für die Enzymlösung

Hepes 52,06 g/l

Natriumarsenat 31,201g/l