
Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Glykolytische Aktivität von Ovarialkarzinomzelllinien
in vitro* und *in vivo
und die Bedeutung von HIF-1 α

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin

der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Thomas Mann
aus Grünstadt

Mainz, 2011



Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

13.12.2011

Gliederung

1	Einleitung	1
1.1	Ovarialkarzinome als Tumorentität	1
1.2	Therapieansätze	1
1.2.1	Glukosemetabolismus	2
1.2.2	Anti-HIF-1 α Therapie	4
1.3	Glukosemetabolismus als Prognosefaktor	5
1.4	Aufgabenstellung	6
2	Materialien und Methoden	7
2.1	Zellkultur	7
2.1.1	Zelllinien	7
2.1.2	Kultivierung der Zelllinien	7
2.1.3	Automatisierte Zellzählung	8
2.1.4	Kryokonservierung der Zelllinien	8
2.1.5	Auftauen der Zelllinien	9
2.1.6	Quantifizierung des Zellwachstums	9
2.1.7	Mykoplasmen-PCR	9
2.2	Metabolitmessungen in der Monolayer-Zellkultur	11
2.2.1	Vorbereitung für Laktat- und Glukosemessungen	11
2.2.2	Probengewinnung	11
2.2.3	Laktatproduktionsmessung mittels Photometrie	12
2.2.4	Glukoseverbrauchsmessung mittels Photometrie	15
2.3	In-Cell-Western	17
2.4	Metabolitmessungen Xenografts	19
2.4.1	Xenotransplantate	19
2.4.2	Herstellung der Gefrierschnitte	19
2.4.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	21
2.4.4	Cytokeratin-Färbung	21
2.4.5	Bildgebende Biolumineszenz	22
2.4.6	Biolumineszenzkameras	22
2.4.7	Aufbau der Messkammer	24

Gliederung

2.4.8	Biolumineszenzmessung	24
2.4.9	Unterschiede der verschiedenen Metabolite	26
2.4.10	Kalibrierung der Biolumineszenzreaktion	26
2.4.11	Computergestützte Auswertung	26
2.4.12	Falschfarbenkalibrierung	27
2.5	Statistische Auswertung	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Quantifizierung des Zellwachstums	30
3.2	Metabolitmessungen in Monolayer-Zellkultur	31
3.2.1	Laktatproduktion in Monolayer-Zellkultur	32
3.2.2	Glukoseverbrauch in Monolayer-Zellkultur	35
3.3	HIF-1 α -Expressionen	37
3.4	Metabolitmessungen im Xenograft	38
3.4.1	ATP-Bestimmung in den Wildtyp-Xenografts	39
3.4.2	Laktat-Bestimmung in den Wildtyp-Xenografts	41
3.4.3	Glukose-Bestimmung in den Wildtyp-Xenografts	42
3.4.4	Pyruvat-Bestimmung in den Wildtyp-Xenografts	43
3.4.5	Laktat/Pyruvat-Verhältnis in den Wildtyp-Xenografts	45
3.4.6	ATP-Bestimmung in den transfizierten Xenografts	46
3.4.7	Laktat-Bestimmung in den transfizierten Xenografts	48
3.4.8	Falschfarbenkalibrierung	49
4	Diskussion	53
4.1	Diskussion der Methoden	53
4.1.1	Methoden der Zellkultur	54
4.1.2	Methoden zur Quantifizierung des Zellwachstums	54
4.1.3	Methoden zur Metabolitbestimmung in Monolayer-Zellkultur	55
4.1.4	In-Cell-Western	55
4.1.5	Methode der Biolumineszenz	56
4.1.6	Diskussion der Mykoplasmen-PCR	58
4.2	Diskussion der Ergebnisse	58
4.2.1	Wachstumskurven	59
4.2.2.1	Laktatproduktion <i>in vitro</i>	61

Gliederung

4.2.2.2	Glukoseverbrauch <i>in vitro</i>	62
4.2.3	HIF-1 α -Expressionen <i>in vitro</i>	63
4.2.4.1	ATP-Konzentrationen im Xenograft	65
4.2.4.2	Laktatkonzentrationen im Xenograft	66
4.2.4.3	Glukosekonzentration im Xenograft	66
4.2.4.4	Pyruvatkonzentration im Xenograft	67
4.2.5	Vergleich <i>in vitro</i> vs. <i>in vivo</i>	67
5	Zusammenfassung	69
6	Anhang	70
6.1	Abbildungsverzeichnis	70
6.2	Tabellenverzeichnis	71
6.3	Abkürzungen	72
6.4	Puffer und Lösungen	74
6.5	Kits	76
6.6	Antikörper	76
6.7	Geräte	76
6.8	Materialien	77
6.9	Software	78
7	Bibliografie	79

1 Einleitung

1.1 Ovarialkarzinome als Tumorentität

Nach statistischen Angaben des Robert Koch Institutes befinden sich bösartige Neubildungen nach Erkrankungen des Herz- Kreislaufsystems auf Platz zwei der Todesursachen in den Industrienationen. Nach Hochrechnungen erkrankten im Jahr 2004 436500 Menschen und 210000 Menschen verstarben im gleichen Zeitraum an einer malignen Krebserkrankung.

Veröffentlichungen des Statistischen Bundesamtes zeigen, dass ca. 9660 Frauen pro Jahr an einem Ovarialkarzinom erkranken. Dies sind 4,7 % aller malignen Neubildungen bei Frauen. Allerdings liegt der Anteil an durch Neubildungen der Ovarien verstorbener Frauen, bei 5,6 % aller Krebserkrankungen, was die schlechte Prognose dieser Tumorentität aufzeigt. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen 67 und 68 Jahren. In den vergangenen 30 Jahren hat sich die Prognose eines Ovarialkarzinoms durchaus verbessert. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt trotz alledem zurzeit bei nur 47 % (Robert-Koch-Institut & Deutschland. Statistisches Bundesamt., 2010).

1.2 Therapieansätze

Die aktuelle Standardtherapie bei Vorliegen eines Ovarialkarzinoms besteht in der Kombinationstherapie aus operativer Entfernung des Primärtumors, sowie einer adjuvanten Chemotherapie.

Im Rahmen einer explorativen Laparotomie wird eine histologische Probe der Tumormasse gewonnen, wodurch die pathologische Diagnose durch eine Schnellschnittdiagnose gesichert werden kann. Erst im Anschluss an die sichere pathologische Diagnosestellung wird die operative Entfernung fortgesetzt. Bei gesicherter Diagnose besteht das weitere Vorgehen in einer kompletten operativen Entfernung beider Ovarien, sowie des Uterus, Omentum majus, Teilen des Peritoneums und angrenzender Lymphknoten. Das weitere Vorgehen richtet sich nach dem infiltrativen Ausmaß der Raumforderung.

Die adjuvante Chemotherapie folgt im Anschluss an die Operation. Das Therapiekonzept wird an den jeweiligen Zustand der Patientin angeglichen. Die Standardtherapie besteht aus einer Kombinationstherapie zweier Chemotherapeutika, Carboplatin und Paclitaxel. In der Regel erstreckt sich die Therapie über 15 Wochen mit jeweils dreiwöchigen Pausenintervallen. Carboplatin wirkt apoptotisch durch eine Intra- und Interstrang-Quervernetzung der DNA-Stränge. Die Wirkung von Paclitaxel beruht auf einer Abbaustörung der Mikrotubuli, wodurch eine Zellteilung in der Mitose unmöglich wird. Eine adäquate Schmerztherapie sollte über die gesamte Therapiedauer durchgeführt werden.

Beim Auftreten von Tumorrezidiven nach erfolgter Operation und durchgeführter Chemotherapie wird in den meisten Fällen ein palliatives Therapiekonzept angestrebt.

1.2.1 Glukosemetabolismus

Unter dem Begriff der Glykolyse versteht man allgemein die Verstoffwechslung von Glukose zu Pyruvat, unter aeroben Bedingungen, oder zu Laktat in anaerober Stoffwechsellage. Die Glykolyse verläuft in zehn enzymatisch katalysierten Reaktionen in allen eukaryotischen Zellen ab. Dabei entstehen unter aerober Stoffwechsellage aus einem Glukosemolekül zwei Pyruvatmoleküle, sowie zwei Moleküle ATP. Durch weitere Verstoffwechslung der entstandenen Pyruvatmoleküle kann die Körperzelle weitere 34 Moleküle ATP gewinnen. Also entstehen durch reine Glykolyse zwei von insgesamt 36 Molekülen ATP pro Glukosemolekül (Abbildung 1.1). Besteht nun eine anaerobe Stoffwechsellage, kann das für die Glykolyse benötigte NAD^+ nicht mehr zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ regeneriert werden, da diese Reaktion nur in Anwesenheit von Sauerstoff in der Atmungskette abläuft. In diesem Fall wird das entstandene Pyruvat mittels $\text{NADH} + \text{H}^+$ durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat und NAD^+ reduziert (Abbildung 1.2). Durch das neu entstandene NAD^+ kann die Glykolyse erneut ablaufen. Diesen Mechanismus der anaeroben Glykolyse machen sich Zellen in Sauerstoffmangelsituationen zu nutze. So kann ein arbeitender Muskel ohne die Anwesenheit von Sauerstoff oder Erythrozyten, die keine Mitochondrien besitzen, in denen die Atmungskette ablaufen kann, weiter Energie in Form von ATP generieren.

Solide Tumoren, die oftmals schlecht vaskularisiert sind und aus diesem Grund eine schlechte Grundversorgung mit Sauerstoff aufweisen, machen sich die Prinzipien der anaeroben Glykolyse zu nutze.

Da durch alleinige Glykolyse wesentlich weniger Energie gewonnen werden kann als unter aeroben Bedingungen, muss die anaerobe Glykolyse wesentlich öfter ablaufen. Dabei wird verständlicherweise mehr Glukose verbraucht. Dieser Effekt wird 1861 von Louis Pasteur an Hefen beobachtet und demnach als „Pasteur-Effekt“ bezeichnet.

Im Jahr 1928 beschreibt Herbert Grace Crabtree durch Beobachtungen an Hefen, dass auch unter Anwesenheit von genügend Sauerstoff anaerobe Glykolyse betrieben wird. Er stellt fest, dass bei einer Glukosekonzentration von über 100 mg/l in der Nährlösung der „Crabtree-Effekt“ einsetzt (Walenta & Mueller-Klieser, 2004).

Otto Heinrich Warburg entdeckt zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts, dass Tumorzellen ungewöhnlich hohe Laktatkonzentrationen aufweisen. Diese hohen Laktatwerte bleiben bestehen, obwohl genügend Sauerstoff für eine aerobe Glykolyse vorhanden ist. Bereits 1924 leitet er die unter dem Namen „Warburg-Effekt“ bekannte Hypothese zur Krebsentstehung ab. Warburg vermutet, dass eine Sauerstoffmangelversorgung z.B. durch defekte Mitochondrien zur Krebsentstehung beitragen könnte. In neueren Studien wurde gezeigt, dass eine Anregung der aeroben Glykolyse das Tumorwachstum hemmt, wogegen eine Steigerung der anaeroben Glykolyse das Tumorwachstum verstärkt (Schulz *et al.*, 2006).

Interesse besteht an der Entwicklung eines Hemmstoffs, welcher nicht die Blut-Hirnschranke passieren kann und somit eine potentielle Neurotoxizität ausschließt. Sollte dies gelingen, stünden der Medizin Medikamente zur Verfügung, die in vielen onkologischen Bereichen eingesetzt werden könnten (Pelicano *et al.*, 2006).

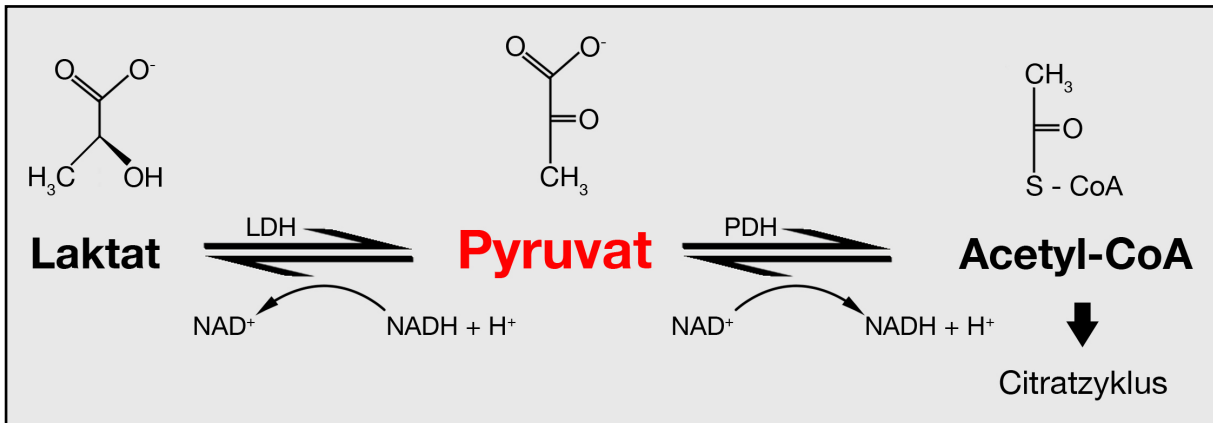


Abbildung 1.2: Hauptverarbeitungswege von Pyruvat

Pyruvat wird hauptsächlich durch den Pyruvatdehydrogenasekomplex (PDH) oxidativ zu Acetyl-CoA dekarboxyliert, welches in den Citratzyklus einfließt. Bei anaerober Stoffwechsellage wird Pyruvat zu Laktat reduziert. Das dabei entstandene NAD^+ kann erneut in der Glykolyse verwendet werden.

1.2.2 Anti-HIF-1 α Therapie

HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor) aktiviert die Transkription von Genen, die bei wichtigen Vorgängen des Stoffwechsels von Krebszellen eine entscheidende Rolle spielen. Neben der Angiogenese und der Zellmigration spielt HIF-1 beim Glukosemetabolismus eine entscheidende Rolle (Semenza, 2003). In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Tumorarten eine deutliche Überexpression von HIF-1 α vorlag und damit ein erhöhter Anstieg der Mortalität einhergeht. Liegt eine erhöhte Konzentration von HIF-1 α im Tumor vor, gilt dies als positiver prädiktiver Wert für ein besonders malignes Tumorwachstum (Vaupel, 2004).

Da ein erhöhter Wert von HIF-1 α nicht nur für eine generell schlechtere Prognose der Patienten spricht, sondern auch die Therapieoptionen durch ein verschlechtertes Ansprechen verschiedener Therapeutika stark beeinflusst, liegt es nahe HIF-1 α als direkten Angriffspunkt einer medikamentösen Tumortherapie in Betracht zu ziehen (Cairns *et al.*, 2007). In den vergangenen Jahren hielten immer mehr monoklonale Antikörper als Therapeutikum Einzug in die Medizin. Einige monoklonale Antikörper, welche durch ihre Angriffspunkte sehr nahe mit dem Stoffwechsel von HIF-1 α in Verbindung stehen, werden heute schon therapeutisch eingesetzt. So z. B. der humanisierte Antikörper Bevacizumab (Avastin[®]), der als Zielstruktur VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) angreift und in der Therapie bei

Darmkrebs, Brustkrebs und dem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) eingesetzt wird.

In Abbildung 1.3 sind die Signalübertragungswege von HIF-1 α schematisch dargestellt.

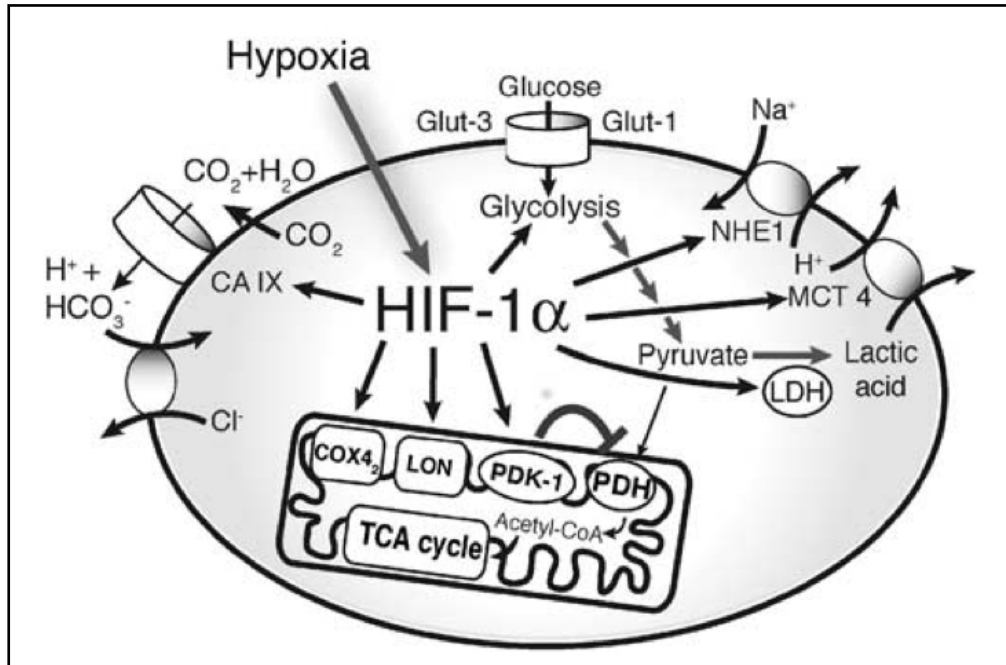


Abbildung 1.3: Signalübertragungswege von HIF-1 α

HIF-1 α kontrolliert metabolische und pH regulierende Signalübertragungswege. Zellen reagieren bei Hypoxie mit einer durch HIF-1 α ausgelösten Überexpression von Glut-1-, Glut-3-Transportern und Enzymen der Glykolyse. Durch Steigerung der Laktatdehydrogenase wird die Produktion von Laktat aus Pyruvat gefördert. Des Weiteren wird mithilfe von PDK-1 (Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-1) die Produktion von Acetyl-CoA gehemmt. Durch Änderungen an den Untereinheiten der Cytochrom C Oxidase (COX) wird die Effizienz der Atmungskette unter Hypoxie gesteigert. Aus: (Weidemann & Johnson, 2008)

1.3 Glukosemetabolismus als Prognosefaktor

Wie bereits eingangs erwähnt neigen maligne Tumore zu einer erhöhten Produktion von Laktat (Walenta *et al.*, 2000) und direkt durch die entstehende Hypoxie zu einem Anstieg der Konzentration an HIF-1 α . Beide Faktoren gehen mit einer verschlechterten Prognose für den Patienten einher. Eine Erhöhung von LDH (Laktatdehydrogenase) gemessen im Serum des Patienten kann als Hypoxiemarker herangezogen werden und spielt in der Ischemiediagnostik (z. B. bei einem akuten Mesenterialinfarkt) eine große Rolle, ist allerdings als Prognosefaktor in der Tumordiagnostik unbrauchbar.

Eine erfolgversprechende Methode in der Diagnostik stellt die Messung der Glukoseaufnahme im Tumorgewebe mittels ^{18}F -2-FDG (Fluordesoxyglukose) PET (Positronen-Emissions-Tomographie) dar (Denko, 2008). Dieses Verfahren wird bereits seit längerer Zeit in der

Onkologie benutzt, um Glukosemetabolismus im Tumorgewebe zu beurteilen und damit eine prognostische Aussage treffen zu können.

1.4 Aufgabenstellung

Wie viele vorangegangene Studien gezeigt haben, spielt in der Pathophysiologie von Tumoren der Glukosestoffwechsel eine ganz besondere Rolle. Da es sich bei Ovarialkarzinomen um eine sehr maligne Tumorentität handelt, bei der trotz deutlicher Fortschritte in der Therapie immer noch eine sehr hohe Mortalität vorliegt, besteht ein enormer Bedarf an neuen erfolgversprechenden Therapiekonzepten.

Zu diesem Zweck wurden zwei Ovarialkarzinomzelllinien ausgewählt, die bereits in der Monolayer-Zellkultur etabliert und deren Metabolisierungsverhalten teilweise bekannt ist. Es wurde gezielt nach Zelllinien mit unterschiedlicher glykolytischer Aktivität gesucht. Die Wahl fiel auf die niedrig-glykolytische Zelllinie IGROV1 und die höher glykolytische Zelllinie OC 316.

Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung des Glukosemetabolismus für das Wachstumsverhalten von Tumorzellen systematisch zu untersuchen. Des Weiteren sollte der Verlauf des Metabolismus über einen definierten Zeitraum begutachtet werden. Dies alles sollte mit Hilfe von Wachstumsanalysen, Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchskurven ermittelt werden. Um eine Aussage über die Übertragbarkeit der Daten auf solide Tumoren zu gestatten, sollten Konzentrationen verschiedener Metabolite in Xenotransplantaten der beiden Ovarialtumorlinien gemessen werden. Die Konzentrationsmessungen wurden mithilfe der Biolumineszenzmessung realisiert. Der Vorteil dieser Methode liegt in der räumlichen Darstellbarkeit der Verteilung und Konzentration von verschiedenen Metaboliten.

Des weiteren sollte es die Aufgabe dieser Arbeit sein, die Bedeutung von HIF-1 α in Bezug auf den Glukosestoffwechsel weiter zu untersuchen, um eine Aussage über den Sinn neuer Therapiekonzepte, welche HIF-1 α als direktes Angriffsziel benutzen, machen zu können. Da vorangegangene Studien gezeigt haben, dass eine Herunterregulierung des HIF-1 α Proteinkomplexes bei Zelllinien mit niedriger glykolytischer Aktivität nur einen sehr eingeschränkten Effekt zeigt, beschränkt die vorliegende Untersuchung sich auf die Effekte bei der hoch-glykolytischen Zelllinie OC 316. Die Effekte sollten sowohl *in vitro*, also in Monolayer-Zellkultur als auch *in vivo*, also in soliden Xenotransplantaten, untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Für die *in vitro*-Untersuchungen an isolierten Tumorzellen stehen durch Kooperation mit dem Krebsforschungsinstitut des Veneto in Padua zwei Wildtyp-Zelllinien zur Verfügung. Es handelt sich bei beiden Zelllinien um Adenokarzinome des Ovars. Bei der Einen handelt es sich um die niedrig-glykolytische Zelllinie IGROV1, welche aus einer Tumorbiopsie einer 47-jährigen Patientin stammt und 1985 als Monolayer-Zelllinie etabliert wurde (Benard *et al.*, 1985). Bei der zweiten Zelllinie handelt es sich um die hoch-glykolytische Zelllinie OC 316. Diese konnte aus sekundär gebildeter Aszitesflüssigkeit einer 60 Jahre alten Patientin gewonnen werden (Alama *et al.*, 1996).

Zur genaueren Untersuchung des HIF-Proteinkomplexes (Hypoxia Inducible Factor) und dessen Bedeutung für den Tumorstoffwechsel und die Tumervaskularisation wurden in Padua beide Zelllinien mit einem lentiviralen Vektor transfiziert. Dieser enthält eine „anti-HIF-1 α “ shRNA, welche zu einer stabilen Herunterregulation von HIF-1 α führt. Alle transfizierten Zelllinien tragen zusätzlich die Bezeichnung „ Δ HIF-1 α “. Als Kontrolle wurde ein Leervektor, genannt „LUC“, in die Zelllinien eingebracht. Eine vorangegangene Studie zeigte, dass eine Anti-HIF-1 α Transfektion bei der niedrig-glykolytischen Zelllinie IGROV1 keinen signifikanten Effekt aufweist (Favaro *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurden nur die beiden Wildtyp-Zelllinien, sowie die Anti-HIF-1 α transfizierte Zelllinie OC 316 Δ HIF-1 α und die Kontrollzelllinie OC 316 LUC für die Untersuchungen verwendet. Alle vier Zelllinien wurden freundlicher Weise von Herrn Dr. Indraccolo (Padua) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien werden in einem Inkubator (Firma) bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Jeden Montag werden die Zellen mit einer Zellzahl von $0,4 \times 10^4$ Zellen/cm² passagiert, so dass innerhalb von sieben Tagen eine Konfluenz von 90 bis 100 % vorhanden ist. Medienwechsel werden mittwochs und freitags durchgeführt. Als Medium wird bei allen Zelllinien RPMI 1640 (Fa. PAA) mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum), 10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) als Puffer, 1 mM Natriumpyruvat und 1 % L-Glutamat verwendet.

Zum Passagieren der Zellen wird zuerst der komplette Medienüberstand entfernt und der in der Kulturflasche verbleibende Zellrasen mit HANK's Lösung gespült. Durch den Spülvorgang werden Medienreste entfernt und Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen, welche für die Zelladhäsion von großer Bedeutung sind, komplex gebunden. Nach dem Abschütten der Spüllösung werden die Zellen in Trypsin bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre

inkubiert. Die Zelllinie IGROV1 benötigt sechs Minuten, die Zelllinien der OC 316 Reihe drei Minuten Inkubationszeit. Die Inkubation wird durch Zugabe von Zellmedium gestoppt und die abgelösten Zellen werden resuspendiert. Da alle verwendeten Zelllinien sehr empfindlich auf Trypsinreste im Medium reagieren, werden die Zellen bei jeder Passage einmal im Zellmedium bei 20 °C für 6 Minuten mit 1000 rpm abzentrifugiert (Megafuge 1,0R, Heraeus). Im Anschluss werden die Zellen erneut in Medium resuspendiert. Um die Zellen für die nächste Passage und anstehenden Versuchsreihen definiert auszusäen, werden die Zellkonzentrationen, durchschnittliche Zelldurchmesser und das durchschnittliche Zellvolumen mit einem computergesteuerten Zellzählgerät (Casy® Modell TT, Schärfe System) bestimmt.

Die beiden Zelllinien OC 316 Δ HIF-1 α und OC 316 LUC werden mit 0,5 μ g/ml Puromycin kultiviert. Beide Zelllinien enthalten in ihrem Vektor ein Resistenzgen gegen Puromycin. Da dieses Antibiotikum stark zytotoxisch wirkt, kann durch diese Methode eine Selektion der Zellen erfolgen, die ihren Vektor abstoßen. Auf eine Zugabe von weiteren Antibiotika und Antimykotika zum Zellmedium wird bewusst verzichtet.

2.1.3 Automatisierte Zellzählung

Zur automatisierten Zellzählung wird ein Zählgerät (Casy® Modell TT, Schärfe System) benutzt, welches sich das Widerstandsmessprinzip zur Zelldetektion zu Nutze macht. Zur Messung werden 100 μ l der resuspendierten Zellsuspension benötigt. Die Zellsuspension wird in 10 ml einer speziellen isotonen Lösung (Casy® Ton) resuspendiert und zur Messung in das Zählgerät gestellt. Die weitere Messung verläuft vollautomatisiert ab. Ein definiertes Volumen der Messflüssigkeit wird durch eine Kapillare in das Gerät eingezogen. Während des Durchtritts durch die Kapillare kann anhand der Volumenverdrängung der Zellen in der isotonen Flüssigkeit deren äquivalente Größe bestimmt werden. Mithilfe des bereits erwähnten Widerstandsmessprinzips kann anhand von elektrischen Impulsen, die beim Kapillardurchtritt entstehen, die Zellzahl ermittelt werden. Nach zweifach durchgeführter Messung wird auf dem Ausgabebildschirm ein Diagramm mit der Partikelgröße auf der x-Achse und der Anzahl der Signale auf der y-Achse dargestellt. Mithilfe eines Cursors kann der gewünschte Messbereich genau definiert werden, um z.B. Schmutzpartikel und tote Zellen von der Messung auszuschließen. Die Zellzahl/ml, der durchschnittliche Zelldurchmesser und das durchschnittliche Zellvolumen werden dann auf dem Ausgabebildschirm dargestellt.

2.1.4 Kryokonservierung der Zelllinien

Um einen langfristigen Bestand an Zellreserven vorweisen zu können, werden Zellen in flüssigem Stickstoff bei -192 °C eingelagert. Um die Zellen für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff vorzubereiten, werden sie wie im Abschnitt 2.1.2 beschrieben abgelöst, dann in 10 ml 0,1 M PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen und bei 4 °C für 6 Minuten mit

1600 rpm (Megafuge 1,0R, Heraeus) abzentrifugiert. Im Anschluss wird das entstandene Zellpellet in vorgekühltem Medium resuspendiert. In dem verwendeten Medium befinden sich 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid), um die Zellen beim Einfriervorgang vor Kristallbildung zu schützen. Die Zellsuspension wird in spezielle Kryoröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 1 ml überführt. In einem Kryoröhrchen befinden sich zwischen $0,5$ und 6×10^6 Zellen. Die Röhrchen werden in einem speziellen Einfrierbehälter für 24 Stunden bei -80 °C eingelagert. Nach Ablauf der 24 Stunden können die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

2.1.5 Auftauen der Zelllinien

Beim Auftauen der Zellen aus der Kryokonservierung muss die gefrorene Zellsuspension zunächst langsam erwärmt werden. Hierzu wird das Kryoröhrchen vorsichtig im Wasserbad für kurze Zeit geschwenkt, bis die Zellsuspension am Rand des Röhrchens angetaut ist. Der Inhalt wird nun vorsichtig in ein vorbereitetes 15 ml Falcon mit 9 ml Zellmedium geschüttet. Die Zellen werden wie bei der Vorbereitung zum Einfrieren bei 4 °C für 6 Minuten mit 1600 rpm abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das Zellpellet in Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen definiert ausgesät. In den folgenden zwei Tagen muss jeweils das Medium gewechselt werden, um das verwendete DMSO vollständig zu entfernen. Im weiteren Verlauf werden die Zellen mindestens zwei weitere Male passagiert, bevor mit Versuchen begonnen wird.

2.1.6 Quantifizierung des Zellwachstums

Um eine Zelllinie zu charakterisieren, müssen Versuche zur Beurteilung des Zellwachstums durchgeführt werden. Die Ergebnisse helfen im Umgang mit der jeweiligen Zelllinie und sind essentiell für die Durchführung weiterführender Versuche.

Die Zellen werden definiert mit $0,5 \times 10^4$ Zellen/cm² in 24 Well Platten ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Nun wird täglich bei vier Wells das Medium durch HANK's Lösung und Trypsin ausgetauscht. Dies geschieht analog, wie bei der Zellpassagierung unter 2.1.2 beschrieben. Nachdem die Zellen von der 24 Well Platte abgelöst und in Zellkulturmedium resuspendiert worden sind, wird eine automatisierte Zellzählung wie unter 2.1.3 beschrieben durchgeführt. Die Zellzahl/ml, der durchschnittliche Zelldurchmesser und das durchschnittliche Zellvolumen dienen bei der computergestützten Auswertung der Beurteilung des Zellwachstums. Anhand der ermittelten Daten kann beurteilt werden, über wie viele Tage der Versuch weiterzuführen ist. Aus den gewonnenen Daten werden so genannte Wachstumskurven erstellt.

2.1.7 Mykoplasmen-PCR

Mit einer Größe von $0,1$ - $0,3$ µm gehören Mykoplasmen zu den kleinsten sich selbst reproduzierenden Prokaryonten (Hahn, 2009). Aufgrund der geringen Größe kann eine Kontami-

nation mit Mykoplasmen nicht unter einer lichtmikroskopischen Beurteilung erkannt werden. Da Mykoplasmen in Zellen sowohl extra- als auch intrazellulär vorhanden sein können, besteht die Möglichkeit, dass der Zellmetabolismus durch eine Kontamination beeinträchtigt wird. Aus diesem Grund sollten Mykoplasmen-PCRs (Polymerase Chain Reaction) im Abstand von drei Monaten wiederholt werden.

Zur Überprüfung auf eine Kontamination wird ein kommerzielles Kit (Vendor®GeM-Mykoplasmen-Detektionskit) verwendet. Laut Hersteller sind mit diesem Kit 2-5 Mykoplasmen pro Probenvolumen detektierbar. Die mitgelieferten Primer erlauben die Vervielfältigung eines Abschnitts der 16S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms. Das amplifizierte PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 270 bp. Folgende Mykoplasmenspezies werden durch das verwendete Kit detektiert: *M. orale*, *M. hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pneumoniae*, *M. synoviae* und wegen der Sequenzhomologie des verwendeten Genomabschnittes auch *Acholeplasma laidlawii*, sowie verschiedene *Ureaplasma*-Spezies (Vendor®GeM 11-2007).

Bei jedem Testdurchlauf wurde eine Positiv- und Negativkontrolle, sowie eine interne Kontrolle der PCR durchgeführt.

Für die Durchführung des Tests wird als Probenmaterial 100 µl Zellkulturüberstand benötigt. Der Überstand wird in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß für 5 Minuten im Thermocycler (Biometra, T-Personal 48) auf 99,9 °C erhitzt, um Proteine im Medienüberstand zu denaturieren. Die denaturierten Proteine werden anschließend für 5 Sekunden bei 13000 rpm (Biofuge 15, Heraeus) abzentrifugiert.

Das Probenmaterial kann nun für die PCR eingesetzt werden. Das Pipettierschema und die Programmierung des Thermocyclers sind in Tabelle 2.1 und 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.1/2.2: Pipettierschema und Ablauf der Mykoplasmen-PCR

Lösung	Volumen/Probe	Anzahl der Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer (Min)
Aqua dest.	15 µl	1	94	2
10x Puffer	2,5 µl		55	2
dNTPs / Primer	2,5 µl		72	2
MgCl ₂	2,5 µl	34	94	0,5
Interne Kontrolle	1,0 µl		55	1
Taq Polymerase	0,5 µl		72	1
Probe	1,0 µl	1	72	4
			4	--

Nach Ablauf der PCR erfolgt die Gelauftragung der PCR-Produkte in einem 1,5 %igen Agarosegel. Zur Herstellung des Agarosegels wird 0,75 g Agarose in 50 ml 0,5x TBE Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) in der Mikrowelle erhitzt und mit 2,5 µl Ethidiumbromid versetzt.

Die fertige Agarose härtet dann unter Abkühlung in der vorbereiteten Gelkammer aus. In die erste Geltasche wird ein 100 bp Marker aufgetragen. Die PCR-Proben werden mit 2 µl 5x Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen aufgetragen. Nach 20 minütiger Elektrophorese bei 160 V erfolgte die Bandenauswertung unter UV-Licht.

2.2 Metabolitmessungen in der Monolayer-Zellkultur

2.2.1 Vorbereitung für Laktat- und Glukosemessungen

Alle Versuchsansätze für die Metabolitmessungen werden in Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² durchgeführt. Die Zellen werden im Rahmen einer Passage gewonnen und definiert mit einer Zellzahl von $0,5 \times 10^4$ Zellen/cm² in ausreichend viele Zellkulturflaschen ausgesät. Bei einem Messansatz über 6 Stunden mit einer Startmessung bei 0 Stunden und stündlicher Probengewinnung werden dementsprechend mindestens sieben Zellkulturflaschen benötigt. Es bietet sich allerdings an, mehrere Flaschen als Reserve bereitzuhalten. Durch diesen Versuchsaufbau kann eine Aussage über die Laktatproduktion bzw. den Glukoseverbrauch über einen vordefinierten Zeitraum getroffen werden. Die Zellen werden über 96 Stunden ohne Medienwechsel bei 37°C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Medium wird das Standardmedium RPMI 1640 mit den unter 2.1.2 beschriebenen Zusätzen verwendet. Die beiden transfizierten Zelllinien OC 316 ΔHIF-1α und OC 316 LUC werden mit 0,5 µg/ml Puromycin im Medium kultiviert. Am Tag der Probengewinnung besitzt der Zellrasen eine 70-80 %ige Konfluenz.

Alle Versuchsansätze werden für jede Zelllinie mindestens dreimal in unterschiedlichen Passagen durchgeführt.

2.2.2 Probengewinnung

Am Tag der Probengewinnung wird für jede gewünschte Inkubationszeit ein Medienwechsel in einer einzelnen Zellkulturflasche durchgeführt, worauf jede Kultur dann über die jeweils vorgegebene Dauer bei 37°C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre weiter inkubiert wird. Bei den Medienwechseln wird 2,16 ml Zellkulturmedium auf den Zellrasen gegeben. Es bietet sich an, die jeweiligen Medienwechsel in zeitversetzter Reihenfolge durchzuführen, um die anschließenden Probengewinnungen aus den einzelnen Kulturflaschen zeitnah durchführen zu können. (siehe Abbildung 2.1).

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden 500 µl Medium in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß mit 500 µl 10 %iger Perchlorsäure (PCA) pipettiert. Durch die Perchlorsäure werden die im Medienüberstand befindlichen Proteinreste denaturiert. Diese Probe wird sofort auf Eis gestellt. Nach 30 Minuten können die denaturierten Proteine für 5 Minuten bei 13000 rpm (Biofuge 15, Heraeus) abzentrifugiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Diese Probe wird dann bis zur photometrischen Messung bei -80 °C eingelagert.

In den verbleibenden 10 Minuten bis zur nächsten Probenentnahme bleibt genügend Zeit, um den Zellrasen wie unter 2.1.2 beschrieben abzulösen und eine automatisierte Zellzählung (siehe 2.1.3) durchzuführen. Ein Waschen und Abzentrifugieren der Zellen entfällt hierbei, da im Anschluss an die Zellzählung alle Zellen verworfen werden. Mithilfe der gemessenen Zellzahl und des durchschnittlichen Zellvolumens kann im späteren Vorgehen eine Aussage über die Metabolitkonzentration auf das Zellvolumen bezogen oder pro Zelle angegeben werden.

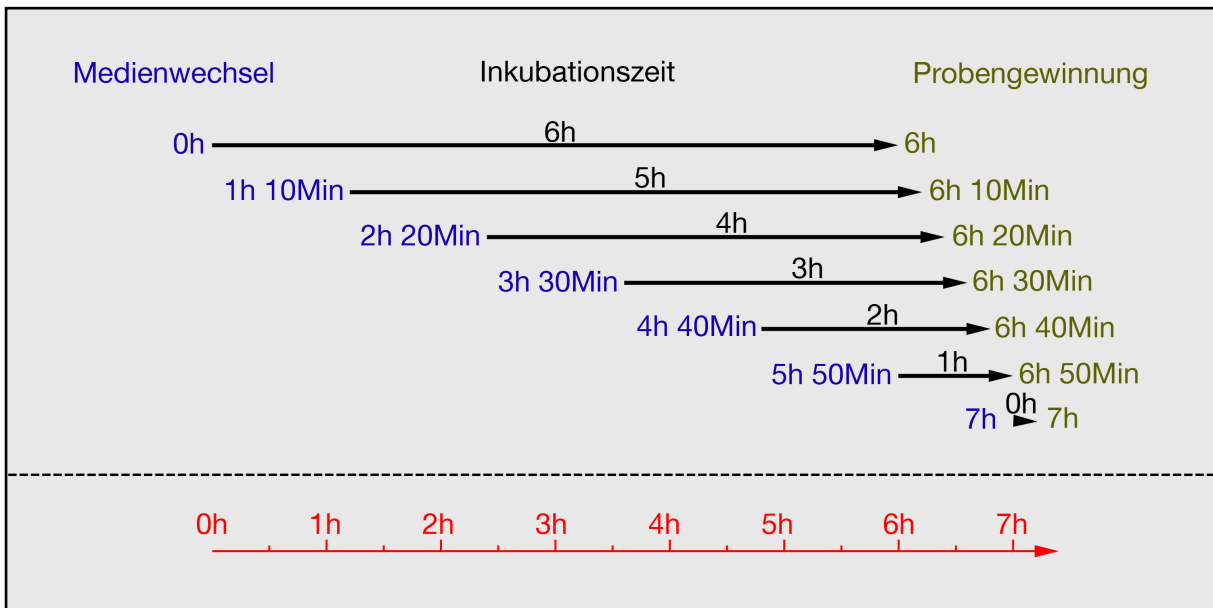


Abbildung 2.1: Zeitmanagement bei der Probengewinnung

Die Medienwechsel erfolgen jeweils um 1h und 10 Minuten zeitversetzt, damit bei der Probengewinnung jeweils 10 Minuten für jede Zellkulturflasche verbleiben.

2.2.3 Laktatproduktionsmessung mittels Photometrie

Die Laktatkonzentrationen in den vorliegenden Medienüberständen werden photometrisch in einer 96 Well-Platte (BioRad Microplate Reader 3550-UV oder Bechman Coulter® DTX 880 Multimode Detector) gemessen. Da Laktat nicht direkt mittels Photometrie bestimmt werden kann, wird durch Zugabe von NAD (Nicotinamid-adenin-dinucleotid) und in Gegenwart von L-LDH (L-Laktat-Dehydrogenase) Laktat zu Pyruvat oxidiert. Hierfür wird ein kommerzielles Messkit verwendet (r-biopharm). Bei dieser Reaktion wird gleichzeitig NAD zu $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ reduziert. Die während der Reaktion gebildete NADH-Menge ist der Menge an L-Laktat äquivalent. NADH kann aufgrund seiner Absorptionsmaxima bei 334, 340 oder 365 nm photometrisch bestimmt werden (Abbildung 2.2 a).

Das Problem, welches bei dieser Reaktion entsteht, ist dass das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite von L-Laktat liegt. Durch Zugabe des Enzyms GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase) und in Gegenwart von L-Glutamat wird das entstandene Pyruvat durch Transaminie-

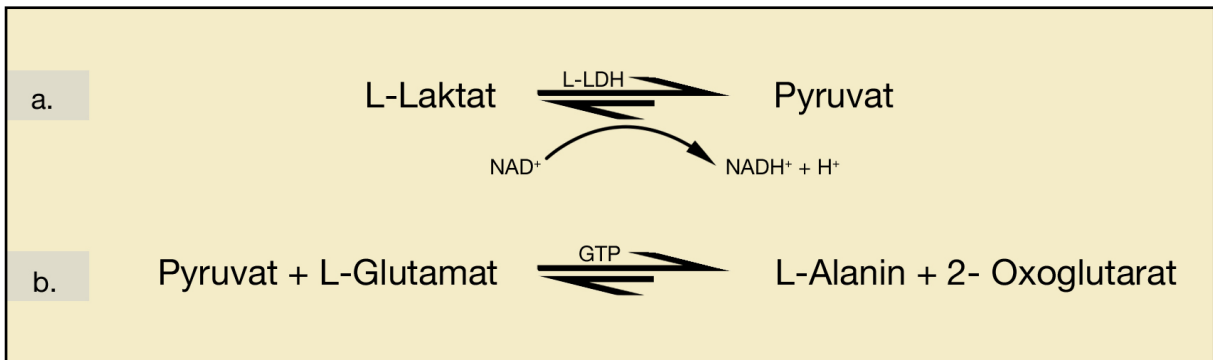


Abbildung 2.2: Prinzip der photometrischen Laktatbestimmung

a.: Reaktion zur photometrischen Bestimmung von NADH. Die Menge an entstandenem NADH ist der Laktatmenge äquivalent.

b.: Um das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite von Pyruvat zu verschieben, wird es durch Zugabe von GTP in Gegenwart von L-Glutamat in L-Alanin umgewandelt. Aus dem hinzugegebenen L-Glutamat entsteht 2-Oxoglutarat.

rung in L-Alanin umgewandelt. Aus dem hinzugegebenen L-Glutamat entsteht durch Oxidation 2-Oxoglutarat (Abbildung 2.2 b).

Um die bei 340 nm gemessenen Extinktionen einem festen Laktatgehalt zuordnen zu können, werden bei jedem Versuch Kalibrierlösungen mit bekanntem Laktatgehalt in aufsteigender Konzentration mit gemessen. Für die Kalibrierung wird eine 0,2 M Natrium-Laktat Lösung in 0,1 M PBS angesetzt. Aus dieser Lösung und Zellkulturmedium werden Kalibrierlösungen in aufsteigender Konzentration von 0-10 mM hergestellt (Tabelle 2.3). Die Kalibrierlösungen werden genau wie die Medienüberstände 1:1 mit 10 %iger Perchlorsäure versetzt, um alle Proteine im Zellkulturmedium zu denaturieren. Nach 30 Minuten können die denaturierten Proteine für 5 Minuten bei 13000 rpm (Biofuge 15, Heraeus) abzentrifugiert werden und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden.

Tabelle 2.3: Pipettierschema für die Kalibrierlösungen der Laktatmessungen

mM	0	1	2	4	6	8	10
0,2 M Na-Laktat	0 µl	1 µl	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl	10 µl
Medium	100 µl	99 µl	98 µl	96 µl	94 µl	92 µl	90 µl

Alle Proben und Kalibrierungslösungen werden zusammen in einer 96 Well-Platte gemessen. Es wird für jede einzelne Probe eine photometrische Dreifachbestimmung durchgeführt. Dabei besteht die Möglichkeit bis zu drei komplette Versuchsansätze und eine Kalibrierungsgerade in einer 96 Well-Platte zu messen (Abbildung 2.3). Nach diesem Pipettierschema wird nach vorherigem Durchmischen des Probengefäßes in jedes Well ein Probenvolumen von 6 µl gegeben. Alle Proben werden in einem Behälter, der mit Eis gefüllt ist, aufgetaut um sie vor Überwärmung zu schützen. Zu dem Probenvolumen wird pro Well 125 µl von Reagenz 1, bestehend aus Aqua dest., Glycylglycinpuffer mit Glutamat, NAD und GPT hinzugefügt. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Reagenzien befindet sich in Tabelle 2.4.

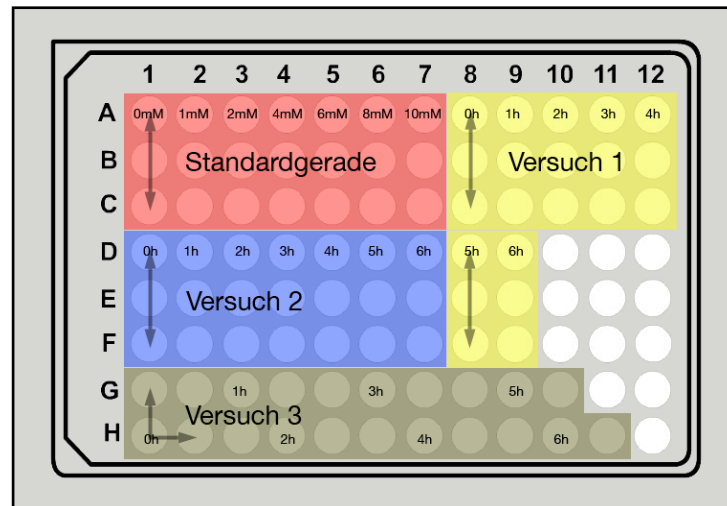


Abbildung 2.3: Pipettierschema einer 96 Well-Platte

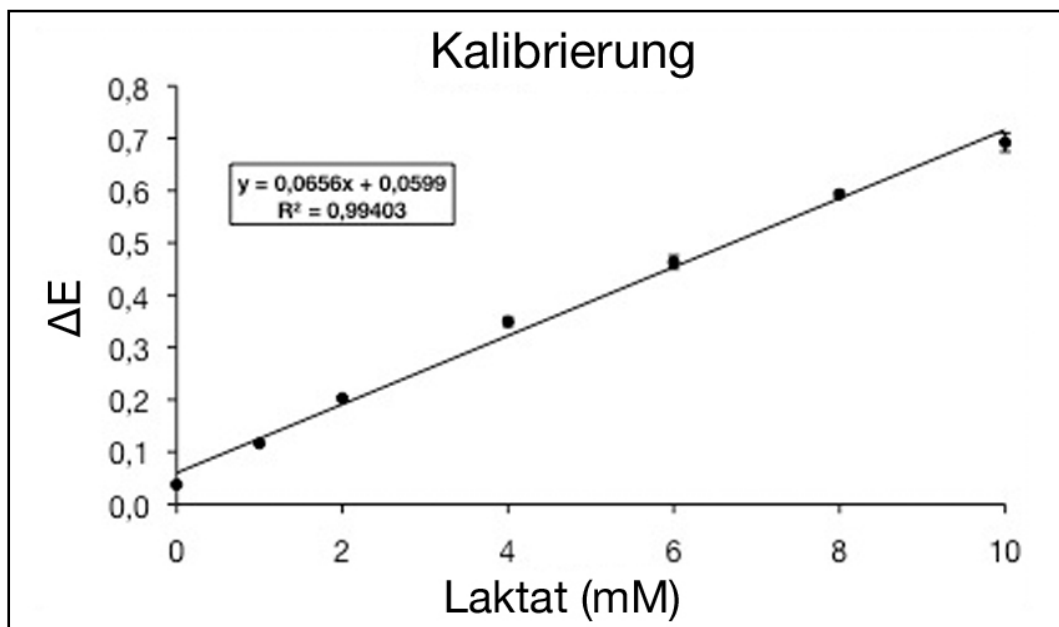


Abbildung 2.4: Standardgerade einer photometrischen Laktatbestimmung

Die 96 Well-Platte wird in den Microplaterereader gestellt, wo nach zwei Minuten Wartezeit und fünf Sekunden maschinellen Schüttelns der Platte die Extinktionen (Extinktionen 1) bei 340 nm gemessen werden. Nun folgt die Zugabe von 10 µl Reagenz 2, bestehend aus LDH und Trispuffer pH 7,4 (Tabelle 2.4). Die Platte wird erneut in den Microplaterereader gestellt und die Extinktionen werden bei 340 nm nach 20, 25, 30, 35 und 40 Minuten gemessen. Wenn die Reaktion vollständig abgelaufen ist, verändern sich die Extinktionen nicht mehr. Nach Herstellerangaben sollte dieser Punkt nach ca. 30 Minuten erreicht sein. Erfahrungen zeigen, dass die Reaktion nach 35 bis 40 Minuten vollständig abgelaufen ist. Die Extinktionen der ersten Messung (Extinktionen 1) werden von denen der zweiten Messung (Extinktionen 2) subtrahiert. Anhand der gemessenen Extinktionen der Kalibrierungslösun-

gen wird eine Kalibrierungsgerade erstellt und die Laktatkonzentrationen der Proben mithilfe von Computerauswertung errechnet. Eine Kalibrierungsgerade ist in Abbildung 2.4 exemplarisch dargestellt.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung Laktat Messkit

	Reagenzien	Volumen/Well
Reagenz 1	Aqua dest.	53,06 µl
	Glycylglycinpuffer mit Glutamat	58,96 µl
	NAD	11,80 µl
	GPT	1,18 µl
	Σ Reagenz 1	125 µl
Reagenz 2	LDH	1 µl
	Trispuffer pH 7,4	9 µl
	Σ Reagenz 2	10 µl

2.2.4 Glukoseverbrauchsmessung mittels Photometrie

Der Glukoseverbrauch wird aus den gleichen Medienüberständen ermittelt wie bei der Laktatproduktionsmessung unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Zur Messung der Glukosekonzentration wird ebenfalls ein kommerzielles Messkit (r-biopharm) verwendet. Hierbei macht man sich das Absorptionsmaximum von NADPH bei 340 nm zunutze. NADPH ist hierbei der Menge an D-Glukose äquivalent. Die Gesamtreaktion besteht aus zwei einzelnen Reaktionsschritten. Die erste Reaktion stellt den ersten Schritt der Glykolyse dar, die zweite Reaktion den ersten Schritt des Pentosephosphatwegs. Im ersten Schritt wird D-Glukose und ATP (Adenosintriphosphat) in Gegenwart des Enzyms Hexokinase (HK) unter gleichzeitiger Bildung von ADP (Adenosindiphosphat) zu D-Glukose-6-Phosphat (G-6-P) phosphoryliert (Abbildung 2.5 a). Im zweiten Schritt wird das entstandene D-Glukose-6-Phosphat und NADP in

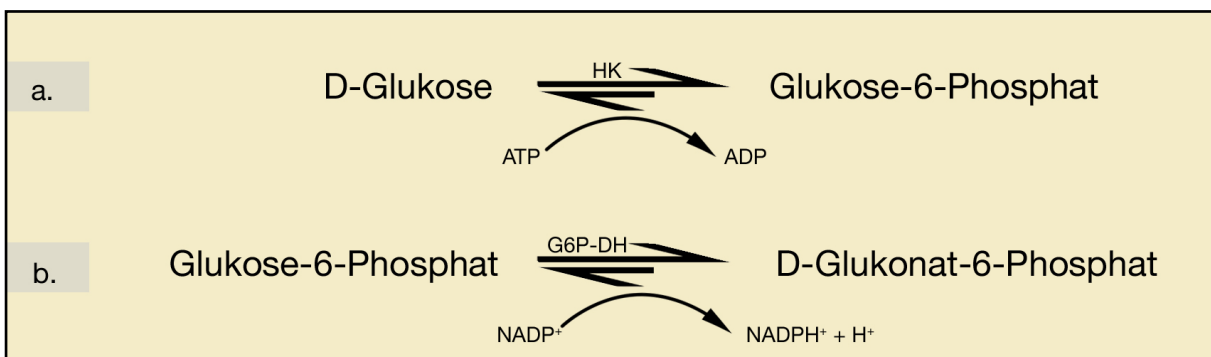


Abbildung 2.5: Prinzip der photometrischen Glukosebestimmung

- a.: Im ersten Schritt wird D-Glukose und ATP in Gegenwart des Enzyms Hexokinase unter gleichzeitiger Bildung von ADP zu D-Glukose-6-Phosphat phosphoryliert.
 b.: Im zweiten Schritt wird das entstandene D-Glukose-6-Phosphat und NADP in Gegenwart des Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) zu D-Glukonat-6-Phosphat oxidiert.

Gegenwart des Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) zu D-Glukonat-6-Phosphat oxidiert. Hierbei entsteht das gewünschte NADPH (Abbildung 2.5 b).

Analog zum Laktatkit besteht das Messkit für die Glukosebestimmung ebenfalls aus zwei Reagenzien. Im Gegensatz zum Laktatmesskit müssen die Reagenzien nicht mehr selbst pipettiert werden, sondern werden vom Hersteller in Pulverform bzw. als Fertiglösung zur Verfügung gestellt und müssen nur noch mit Aqua dest. oder PBS angesetzt bzw. gebrauchsfertig gemacht werden. Suspension 1 liegt in Pulverform vor und enthält nach Angaben des Herstellers Triethanolaminpuffer pH 7,6, ca. 110 mg NADP, ca. 260 mg ATP und Magnesiumsulfat. Suspension 2 liegt als Fertiglösung vor und enthält ca. 320 U Hexokinase sowie ca. 160 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase.

Auch bei der Glukosebestimmung wird eine Kalibrierung mit den Proben zusammen gemessen, um den genauen Glukosegehalt berechnen zu können. Hierzu wird eine 0,1 M Glukoselösung in PBS angesetzt. Die Glukoselösung wird zusammen mit glukosefreiem RPMI 1640 Zellkulturmedium zu Standardproben in aufsteigender Konzentration von 0-7,5 mM pipettiert. Bei den Kalibrierungslösungen werden ebenfalls, 1:1 in 10 %iger Perchlorsäure, alle Proteine denaturiert. Das Pipettierschema der Standardproben ist in Tabelle 2.5 zu sehen.

Tabelle 2.5: Pipettierschema für die Glukose-Kalibrierungslösung

mM	0	0,75	1,5	3	4,5	7,5	15
0,1 M Glukose	0 µl	7,5 µl	15 µl	30 µl	45 µl	75 µl	150 µl
Medium	1000 µl	992,5 µl	985 µl	970 µl	955 µl	925 µl	850 µl

Da es sich hier um eine 0,1 M Glukoselösung handelt und nicht wie bei den Laktatstandards um eine 0,2 M Natrium-Laktatlösung, ergeben sich durch die Verdünnung mit 10 %iger Perchlorsäure andere Konzentrationen (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Konzentrationen für die Glukose-Kalibrierungslösung nach Verdünnung mit Perchlorsäure

mM	0	0,375	0,75	1,5	2,25	3,75	7,5
----	---	-------	------	-----	------	------	-----

Das Vorgehen bei der Messung verläuft bis auf kleine Änderungen analog zur Laktatmessung. Die Proben werden erneut langsam aufgetaut und nach vorgesehenem Pipettierschema 6 µl Probenvolumen pro Well pipettiert. Es wird in jedes Well 139 µl der Reagenz 1 hinzugegeben und nach zweiminütiger Wartezeit und 5 Sekunden Schütteln werden die ersten Extinktionen bei 340 nm gemessen. Im Anschluss an die Messung werden 25 µl der Reagenz 2 in jedes Well pipettiert (Tabelle 2.7). Die Extinktionen werden nach 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten gemessen. Die Reaktion kommt zwischen 20 und 25 Minuten zum Stillstand. Zur Auswertung wird dieselbe Methode wie zur Laktatbestimmung verwendet.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung Glukose Messkit

	Reagenzien	Volumen/Well
Reagenz 1	Aqua dest.	83 µl
	Suspension 1	56 µl
	∑ Reagenz 1	139 µl
Reagenz 2	PBS	24 µl
	Suspension 2	1 µl
	∑ Reagenz 2	25 µl

2.3 In-Cell-Western

Beim In-Cell-Western handelt es sich um eine direkte photometrische Proteindetektion der Monolayer-Zellkultur in einer 96 Well-Platte.

Die Zelllinien IGROV1, OC 316, OC LUC und OC 316 ΔHIF-1α werden mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² in eine 96 Well-Platte mit Zellkultur fähiger Beschichtung ausgesät (Abbildung 2.6). Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre wird ein Medienwechsel durchgeführt. Hierbei werden 50 % mit einem Cobaldchlorid (CoCl₂) versetzten Medium aufgefüllt und die andere Hälfte der Platte mit normalem RPMI 1640 Zellkulturmedium beschickt. Das Cobaldchlorid wird in einer Konzentration von 0,1 mM verwendet, um eine chemische Hypoxie zu erzeugen. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre wird das Medium durch Abklopfen entfernt und jedes Well wird zweimal mit 200 µl kaltem PBS gespült. Bei allen folgenden Schritten ist es äußerst wichtig, die Zellen nicht antrocknen zu lassen. Das PBS wird entfernt und durch 125 µl/Well Methanol ersetzt. Dieser Arbeitsgang wird komplett

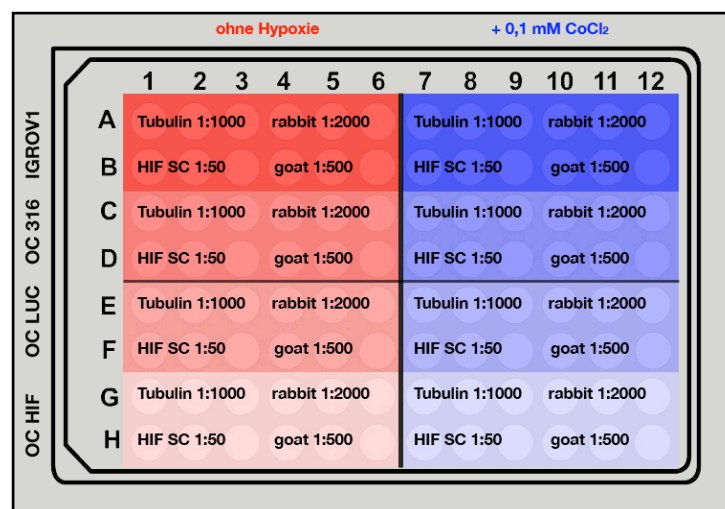


Abbildung 2.6: Pipettierschema beim In-Cell-Western

unter dem Abzug ausgeführt. Bei dem verwendeten Methanol ist darauf zu achten, dass es vor Verwendung auf -20°C gekühlt wird. Nach 10 Minuten Inkubation folgt eine Spülung aller Wells mit 200 μl PBS, worauf die Zellen für 10 weitere Minuten mit 125 μl 0,1% Triton in PBS permeabilisiert werden. Es folgt erneut eine Spülung mit 200 μl PBS. Anschließend wird mit 125 μl Roti®Block (1:10 in PBS) für eine Stunde geblockt, um Fremdproteine bzw. nicht zelluläre Oberflächen abzusättigen und ein unspezifisches Bindungsverhalten des Antikörpers zu vermeiden. Alle Inkubationen werden ab sofort auf einem Taumelschüttler (REAX 3, Heidolph) durchgeführt. Es folgt eine Spülung mit 200 μl PBS und im Anschluss wird jedes Well mit 125 μl PBS aufgefüllt. Nun erfolgt die Zugabe des Erstantikörpers (50 μl), bzw. 50 μl Roti®Block (1:10 in PBS). Da hierzu die Lösung in jedes einzelne Well pipettiert werden muss, wird immer bei drei Wells das PBS entfernt und mit Inkubationslösung aufgefüllt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde. Jedes Well wird nun zweimal jeweils für zwei Minuten mit PBS gespült und für fünf Minuten in 50 μl Peroxidaseblock (3 % H_2O_2 in PBS) inkubiert. Durch die Zugabe des Peroxidaseblocks wird die Grundlage für die spätere Farbreaktion mit TMB (Tetramethylbenzidin) geschaffen, da TMB als Substrat für die Peroxidasen des Zweitantikörpers dient und somit eine ungewollte Peroxidasenreaktion verhindert wird.

Es wird erneut mit 200 μl PBS gespült und alle Wells werden mit 125 μl PBS aufgefüllt. Nun erfolgt die Zugabe des Zweitantikörpers (50 μl) nach dem gleichen Verfahren wie beim Erstantikörper. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten. Zum Abschluss wird dreimal für fünf Minuten mit PBS gespült: Zweimal mit 200 μl und beim letzten Mal mit 100 μl .

Nun erfolgt die Messung der Leerwertextinktionen mit der letzten PBS-Füllung. Die Leerwerte werden bei 655 nm und 450 nm gemessen (BioRad Microplate Reader 3550-UV).

Das PBS wird entfernt und die Wells werden mit 100 μl TMB aufgefüllt. Durch die hervorgerufene Peroxidasereaktion entsteht ein blau-grüner Farbstoff, der bei 655 nm photometrisch detektiert wird. Die Reaktion läuft ca. 50-70 Minuten bis sie zum Stillstand kommt und die Extinktionen das Maximum erreicht haben. Zur Kontrollmessung werden in jedes Well 50 μl 0,5 M Schwefelsäure (H_2SO_4) hinzugegeben, was einen Farbumschlag in das gelbe Farbspektrum bewirkt. Es werden erneut einmalig die Extinktionen bei 450 nm gemessen. Von den ermittelten Extinktionen werden die Leerwertextinktionen subtrahiert. Die so ermittelten Extinktionen ΔE werden mit den Extinktionen der Negativkontrolle verrechnet. Die Ergebnisse werden in Bezug auf das Haushaltsprotein α -Tubulin dargestellt.

In Tabelle 2.8 sind der Primär- bzw. Sekundärantikörper aufgeführt, welche für den Nachweis des HIF-Proteinkomplexes verwendet wurden.

Tabelle 2.8: Beim In-Cell-Western Blot verwendete Antikörper

In Klammern stehen die Verdünnungsverhältnisse bzw. die Artikelbezeichnung des Herstellers.

Primärantikörper (1:50)	Sekundärantikörper (1:500)
HIF-1 α (C-19) / Santa Cruz® (# sc-8711)	donkey anti-goat IgG-HRP / Santa Cruz® (# sc-2020)

2.4 Metabolitmessungen Xenografts

2.4.1 Xenotransplantate

Zur Herstellung der Xenotransplantate werden SCID-Mäuse verwendet. Bei der SCID-Mutation der Maus handelt es sich um einen autosomal-rezessiven Defekt, lokalisiert auf dem zentromeren Ende des Chromosoms 16. Durch den Gendefekt kommt es zu Fehlfunktionen des T-Zell-Rezeptors (TCR) bei T-Vorläuferzellen, sowie zu einem Fehlen der zellgebundenen Immunglobuline bei B-Vorläuferzellen. Die SCID-Mäuse besitzen also keine reifen funktionsfähigen T- und B-Lymphozyten. Die NK-Zellen (natürliche Killerzellen) hingegen sind in normaler Anzahl und mit voller Funktionsfähigkeit vorhanden. Da den Mäusen ein spezifisches Immunsystem zur Erkennung von allogenen sowie xenogenen Antigenen fehlt, sind sie prädisponiert für eine Xenotransplantation humaner Krebszellen (Bosma *et al.*, 1983).

Xenotransplantate werden durch subcutane Injektion der Tumorzellen (5×10^4 Zellen/Injektion) in beide Flanken der Maus hergestellt. Alle verwendeten Mäuse sind zum Zeitpunkt der Injektion sechs bis acht Wochen alt (Favaro *et al.*, 2008). Die Entnahme der Xenotransplantate erfolgt unter direkter Kryokonservierung der Tumore. Eine Einlagerung der Tumore erfolgte nach Lieferung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Xenotransplantate der Zelllinien IGROV1, OC 316, OC LUC und OC 316 Δ HIF-1 α wurden im Istituto Oncologico Veneto-Instituto di Ricovero e Cura Scientifico, Padua (Italien) angefertigt und von Herrn Dr. Indraccolo (Padua) zur Verfügung gestellt.

2.4.2 Herstellung der Gefrierschnitte

Um die Gefrierschnitte der Xenotransplantate herzustellen, werden die Tumoren bei ausreichender Größe in zwei gleich große Stücke unterteilt. Ein Teil wird für die Anfertigung der Gefrierschnitte zum Temperaturgleich in das Kryomikrotom (Slee, Mainz) gelegt, wobei die andere Tumorthälfte wieder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert wird. Der Tumor wird nach ca. 20 Minuten Temperaturlausgleich für den Schneidevorgang präpariert. Vom Tumor werden überschüssige Gewebereste der Maus, wie z. B. Haut, Haare oder Muskelgewebe mit einem Skalpell entfernt. Das verbleibende Xenotransplantat wird auf einem Schneideblock in Einbettmedium aufgeblockt und für einige Minuten ausgehärtet. Bevor der eigentliche Schneidevorgang beginnt, werden mit einer Biopsiegabel zwei parallel verlaufende Löcher in einem

90° Winkel zur Schnittfläche in den Tumor gestochen. Dies dient der späteren Orientierung bei der Auswertung der Tumorschnitte. Die Schnittserie beginnt mit einem 10 µm Schnitt für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung). Wenn die Schnittdicke seit dem letzten Schnitt verändert wurde, wird ein Fehlschnitt durchgeführt, um die neu eingestellte Schnittdicke zu garantieren. Nun folgt die erste Schnittserie, die für die Biolumineszenzmessung verwendet wird. Es wird begonnen mit drei Schnitten der Dicke 16 µm für Glukose-, ATP- und Laktatbestimmung, gefolgt von einem 20 µm Schnitt für die Pyruvatbestimmung. Alle Schnitte für die bildgebende Biolumineszenz werden auf 60 x 24 mm großen vorgekühlten Deckgläsern aufgenommen. Der Schnitt für die Glukosemessung wird direkt bei -20 °C ein-

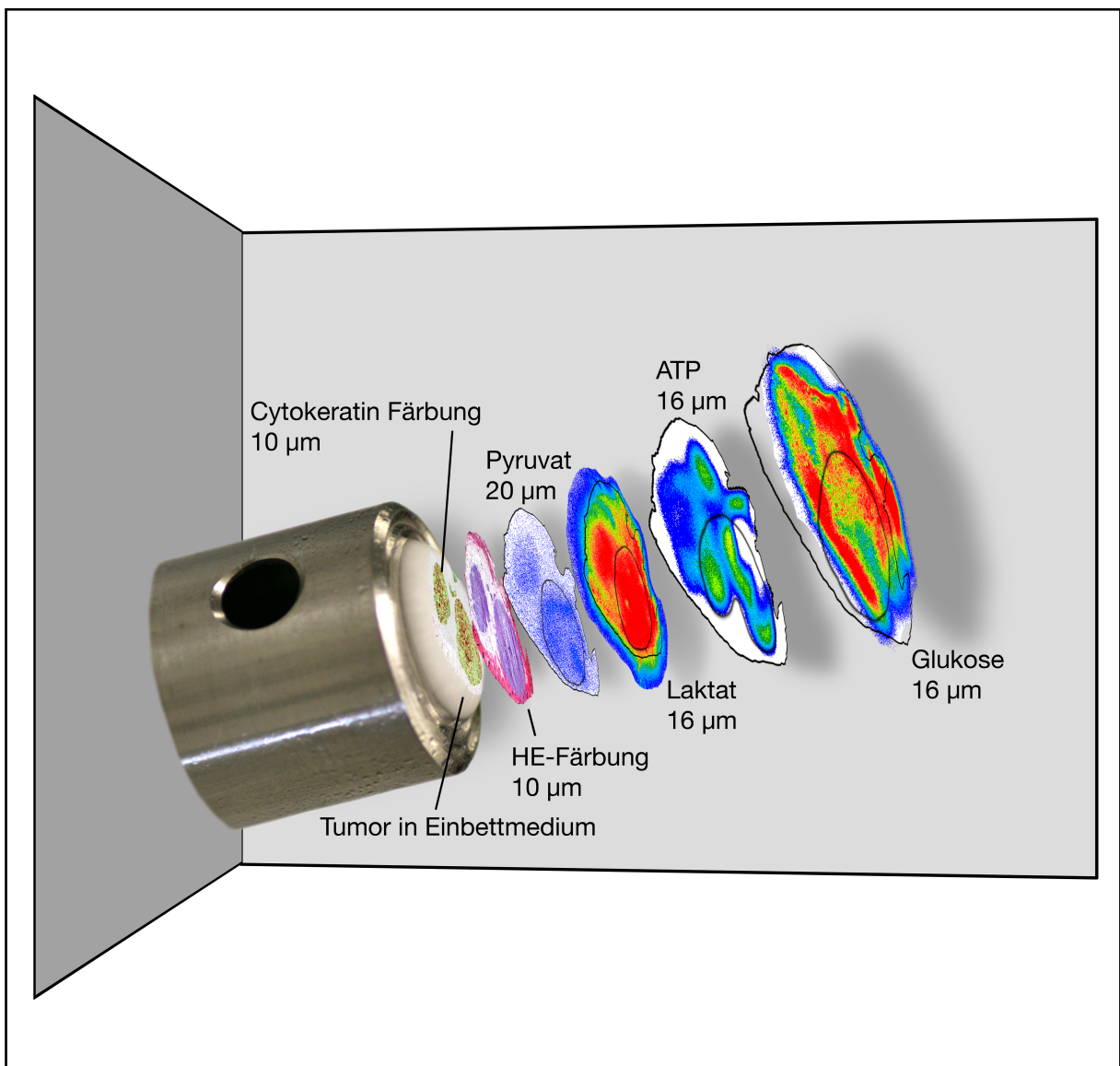


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung zur Herstellung von Schnittserien

Die Herstellung der Schnittserien erfolgt in der dargestellten Reihenfolge: Glukose (16 µm), ATP (16 µm), Laktat (16 µm), und Pyruvat (20 µm). Zur Orientierung bei der computergesteuerten Auswertung und für spätere histologische Untersuchungen folgen fünf 10 µm dicke histochemische Schnitte. In der Grafik ist ein Schnitt mit einer HE-Färbung und ein Schnitt mit einer Cytokeratin Färbung dargestellt.

gelagert, wogegen die Schnitte für ATP-, Laktat-, und Pyruvatmessungen für 10 Minuten auf ein 100 °C warme Heizplatte gelegt werden, um im Anschluss ebenfalls bei -20 °C eingelagert zu werden. Durch die Erwärmung der Schnitte werden endogene Enzyme im Tumorgewebe denaturiert, was einen unerwünschten endogenen Abbau der Metabolite verhindert. Des Weiteren wird Flüssigkeit im Gewebe verdampft. Nach den Schnitten für die Metabolitmessungen werden fünf 10 µm dicke Schnitte für histochemische Färbungen angeschlossen. Für Färbungen vorgesehene Schnitte werden auf SuperFrost® Plus Objektträger (Menzel) mit einer Größe von 75 x 25 x 1,0 mm aufgenommen. Mit den ersten beiden Schnitten wird eine HE-Färbung bzw. CK-Färbung (Cytokeratin-Färbung) durchgeführt (Abbildung 2.7). Dies ist für die spätere Auswertung der Messschnitte von Bedeutung. Alle Schnitte für histochemische Färbungen trocknen für 24 Stunden bei Raumtemperatur, bevor sie bei -20 °C eingefroren werden.

2.4.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung ist die gebräuchlichste histologische Färbung und ermöglicht eine Differenzierung zwischen vitalem und nekrotischem Tumorgewebe. Gefärbte Schnitte werden verwendet um eine arealsspezifische Auswertung der Biolumineszenzbilder zu ermöglichen. Die 10 µm dicken Schnitte werden für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für sieben Minuten in Aceton fixiert. Im Anschluss an die Fixierung werden die Objektträger für zwei Minuten in Mayers saures Hämalaun (Merck) getaucht. Danach erfolgt das Bläuen der Schnitte für fünf Minuten unter leicht fließendem Leitungswasser. Anschließend erfolgt eine kurze Spülung in destilliertem Wasser. Nun werden die Objektträger für 15 Sekunden in Eosin „G“ (Merck) getaucht, bevor alle Schnitte dreimalig in destilliertem Wasser gespült werden. Zum Entwässern der Schnitte werden sie nacheinander in eine Alkoholreihe mit 70 %, 80 %, 96 % und 100 % Isopropanol gegeben. Die Schnitte verweilen für fünf Minuten in der Küvette mit 100 % Isopropanol, um im Anschluss ebenfalls für jeweils fünf Minuten in drei Küvetten mit Xylol eingetaucht zu werden. Schließlich werden die Schnitte mit Roti®-Histokitt (Roth) eingedeckt und können nach dem Trocknen fotografiert werden.

2.4.4 Cytokeratin-Färbung

Die Vorteile der bildgebenden Biolumineszenz besteht in der quantitativen Metabolitdetektion innerhalb kleinster Tumorareale. Um humanes Tumorgewebe zu lokalisieren und Bindegewebe der Maus von der Messung auszuschließen, muss das Tumorgewebe spezifisch gefärbt werden. Hierfür eignet sich die CK-Färbung.

Cytokeratine sind epitheliale Strukturproteine, welche u.a für die Zellstabilität und Formgebung verantwortlich sind. Zur Färbung wird ein Mouse anti-human Antikörper mit Breitspektrumaffinität auf Cytokeratin ausgewählt. Dadurch kann das Tumorgewebe spezifisch unter

Aussparung des Bindegewebes der Maus angefärbt werden. Das verwendete kommerzielle Färbekit ermöglicht eine Bindung des Erst- und Zweitantikörpers im Reaktionsgefäß. Durch das Abfangen des überschüssigen Zweitantikörpers kann eine ungewollte Bindung mit Fremdanthigenen verhindert werden.

Die Gefrierschnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und für fünf Minuten in Aceton fixiert. Für die CK-Färbung wird das ARK™ (Animal Research Kit) der Firma Dako in Kombination mit einem Cytokeratin pan Antikörper verwendet. Die Färbung wird nach dem Protokoll des Herstellers mit anschließender Hämatoxylin Kernfärbung durchgeführt.

2.4.5 Bildgebende Biolumineszenz

Das Verfahren der bildgebende Biolumineszenz erlaubt eine arealsspezifische Metabolitbestimmung in Kryotomschnitten von Tumorbiopsien und Xenotransplantaten. Diese Methode ist für die Metabolite ATP, Laktat, Glukose (Mueller-Klieser & Walenta, 1993) und Pyruvat (Sattler *et al.*, 2007) etabliert.

Der Nachweis der genannten Metabolite durch Biolumineszenz beruht auf der chemischen Reaktion von Luziferasen. Durch diese Enzyme werden Reaktionen katalysiert, die Photonen emittieren. Die Intensität der Lichtemission ist hierbei in einem bestimmten Abschnitt des Reaktionsablaufs proportional zur Konzentration der nachzuweisenden Metabolite. Für den Nachweis von ATP wird die Luziferase aus dem Abdomen eines Leuchtkäfers (Lampyridae) (Roche) verwendet. ATP wird hierbei unter Beteiligung von Luciferine in einer direkten Lichtreaktion umgesetzt. Bei Laktat und Pyruvat wird das Coenzym NADH bzw. NADPH erzeugt. Diese Coenzyme sind an der Reduktion von FMN (Flavin-Mononukleotid) zu FMNH₂ beteiligt, welches in einer Aldehydreaktion unter Beteiligung von bakterieller Luziferase wieder zu FMN oxydiert wird. Bei dieser Reaktion entsteht aus dem langkettigen Aldehyd Fettsäure. Des Weiteren werden bei dieser Reaktion Photonen emittiert.

Die der Messung zugrunde liegenden Lichtreaktionen sind in Abbildung 2.8 genauer dargestellt.

Eine genaue Zusammensetzung der Reagenzien für die Biolumineszenzmessung ist im Anhang aufgelistet.

Die komplette Apparatur inklusive Mikroskop, Messkammer und Biolumineszenzkamera befindet sich in einer lichtundurchlässigen Black-Box. Das Labor ist aufgrund der temperaturlabilen Reagenzien klimatisiert und während der Messungen stark abgedunkelt.

2.4.6 Biolumineszenzkameras

Im Laufe der Experimente wurden für die Metabolitmessungen in den Xenotransplantaten zwei verschiedene Biolumineszenzkameras verwendet (C2400 Hamamatsu, Herrsching und Andor IQ). Nachfolgend sind die Eigenschaften beider Geräte aufgeführt:

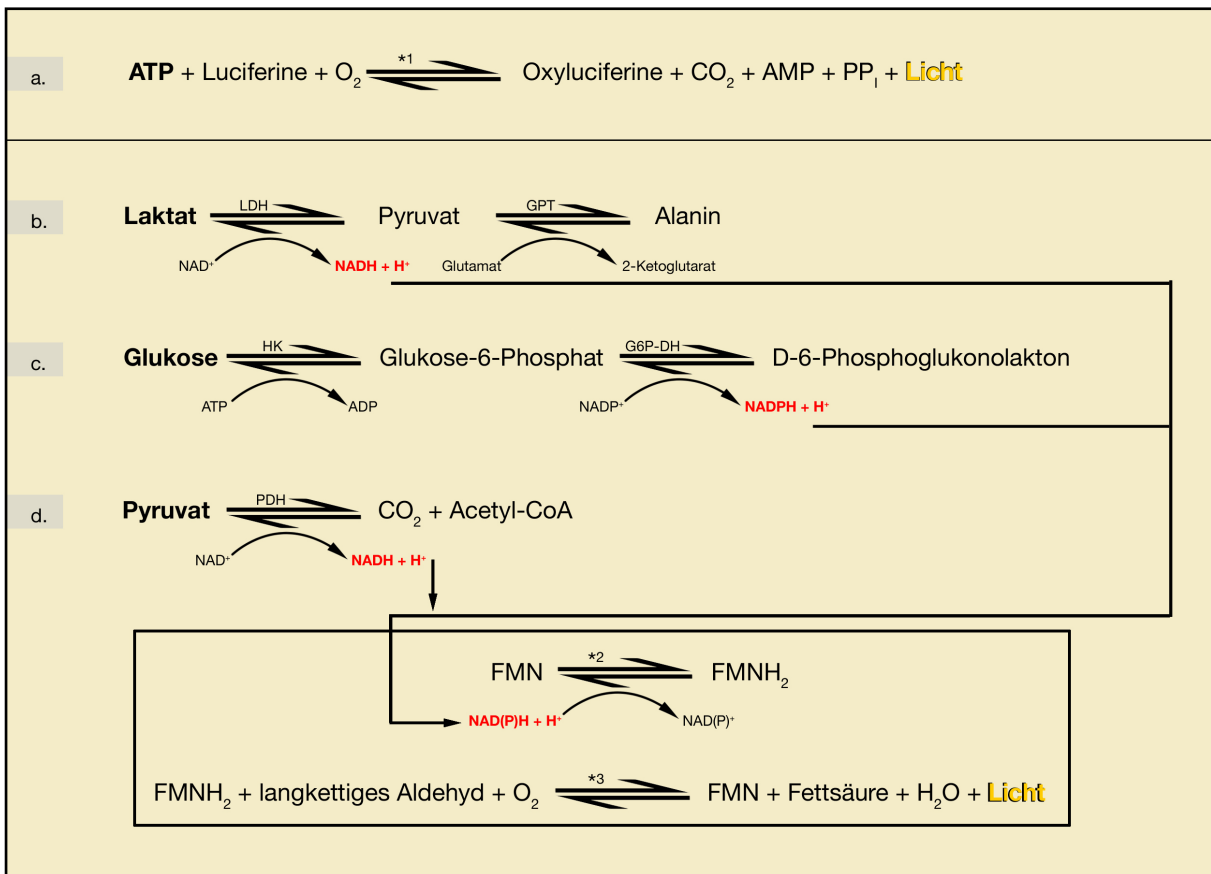


Abbildung 2.8: Lichtreaktionen für Metabolitmessungen

*1: Luziferase des Leuchtkäfers (Lampyridae); *2: NAD(P)H-FMN Oxidoreduktase; *3: bakterielle Luziferase

a.: Reaktion zum Nachweis von ATP.

b.: Reaktion zum Nachweis von Laktat.

c.: Reaktion zum Nachweis von Glukose.

d.: Reaktion zum Nachweis von Pyruvat.

Die Lichtreaktion unter a. ist eine eigenständige Reaktion, basierend auf der Lichtreaktion des Leuchtkäfers, wogegen die Reaktionen b.-c. alle in der gleichen Lichtreaktion, basierend auf bakterieller Luziferase, enden.

Hamamatsu C2400:

Der Photonendetektor und eine CCD-Kamera (Charge-coupled Device) sind in Reihe geschaltet auf einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot, Zeiss Oberkochen) montiert. Die in der Photokathode auftreffenden Photonen setzen Elektronen frei, die durch eine Verstärkereinheit (Multichannel-Plate, MCP) geleitet, vervielfacht und auf einen Phosphorschirm projiziert werden. Diese Projektion wird mithilfe der CCD-Kamera in ein digitales Videosignal umgewandelt und mittels digitaler Datenverarbeitung weiter verarbeitet. Es werden 25 Einzelbilder/Sekunde mit einer Auflösung von 768x574 Pixel aufgezeichnet. Bei einer angenommenen Messzeit von einer Minute entspricht dies 1500 Einzelbildern. Die Bilder werden zu einem einzigen Bild mit einer Informationstiefe von 16 Bit addiert und im TIF-Format (tagged image file format) gespeichert.

Andor™ iXon^{EM+}:

Der große Vorteil der Biolumineszenzkamera der Firma Andor ist, dass diese ohne sich verbrauchende Verstärkereinheit (Multichannel-Plate, MCP) auskommt. Statt dessen wird das Signal elektronisch durch eine „blackilluminated“ EM-CCD Kamera verstärkt. Um das Hintergrundrauschen zu reduzieren, befindet sich der digitale Bildsensor in einer Vakuummülle und wird auf -70 °C gekühlt. Dadurch kann eine anhaltende Bildqualität über Jahre garantiert werden. Das Biolumineszenzbild wird nicht durch eine Aufsummierung mehrerer Einzelbilder erzeugt, sondern als Langzeitbelichtung über die komplette Messzeit. Ein weiterer Vorteil ist die etwas höhere Auflösung von 1024x1024 Pixel der Kamera.

2.4.7 Aufbau der Messkammer

Die Messkammer, in der die eigentliche Lichtreaktion stattfindet, befindet sich auf dem Objektisch des Lichtmikroskops mit einem 1,25x-Objektiv. In der aus Kupfer gefertigten Messkammer ist eine Reaktionskammer aus Aluminium eingebracht, welche mithilfe einer Schublade in die Messkammer eingeführt wird. In der Reaktionskammer befindet sich eine ca. 1 cm große Öffnung, deren Boden mit einem eingearbeiteten Deckglas abgedichtet ist (Reaktionsmulde). Die komplette Messkammer wird mittels Wasserkühlung auf 20 °C (ATP, Laktat und Glukose) bzw. 30 °C (Pyruvat) gekühlt. Die Raumtemperatur sollte bei ca. 22 °C (ATP, Laktat und Glukose) bzw. 26 °C (Pyruvat) liegen (Abbildung 2.9).

2.4.8 Biolumineszenzmessung

Vor Beginn der Messung muss die Raumtemperatur und die Temperatur der Messkammer auf den benötigten Stand reduziert werden. Die Tumorschnitte werden bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Vor jeder Messung werden die Tumorschnitte auf einer Heizplatte für 1-2 Sekunden erhitzt, um den Schnitt aufzutauen und überschüssige Flüssigkeit zu verdampfen. Nun wird der Schnitt, mit dem Gewebe nach unten, auf der Reaktionskammer fixiert und mithilfe der Biolumineszenzkamera fotografiert. Dieses Bild ist für die spätere Computerauswertung von großer Bedeutung. Die Reaktionskammer wird wieder aus der Messkammer entfernt und das Deckglas mit dem Tumorschnitt leicht angehoben, um die Reaktionslösung auf das Deckglas der Reaktionskammer zu geben. Es werden 60 µl der gekühlten Reaktionslösung blasenfrei auf das Deckglas pipettiert und der Tumorschnitt langsam abgesenkt. Sobald das Gewebe die Reaktionsflüssigkeit berührt, wird die Inkubationszeit gestartet. Die Schublade mit der Reaktionskammer wird in die Messkammer gestellt, die Black-Box wird lichtdicht verschlossen und nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Messung gestartet. Während der

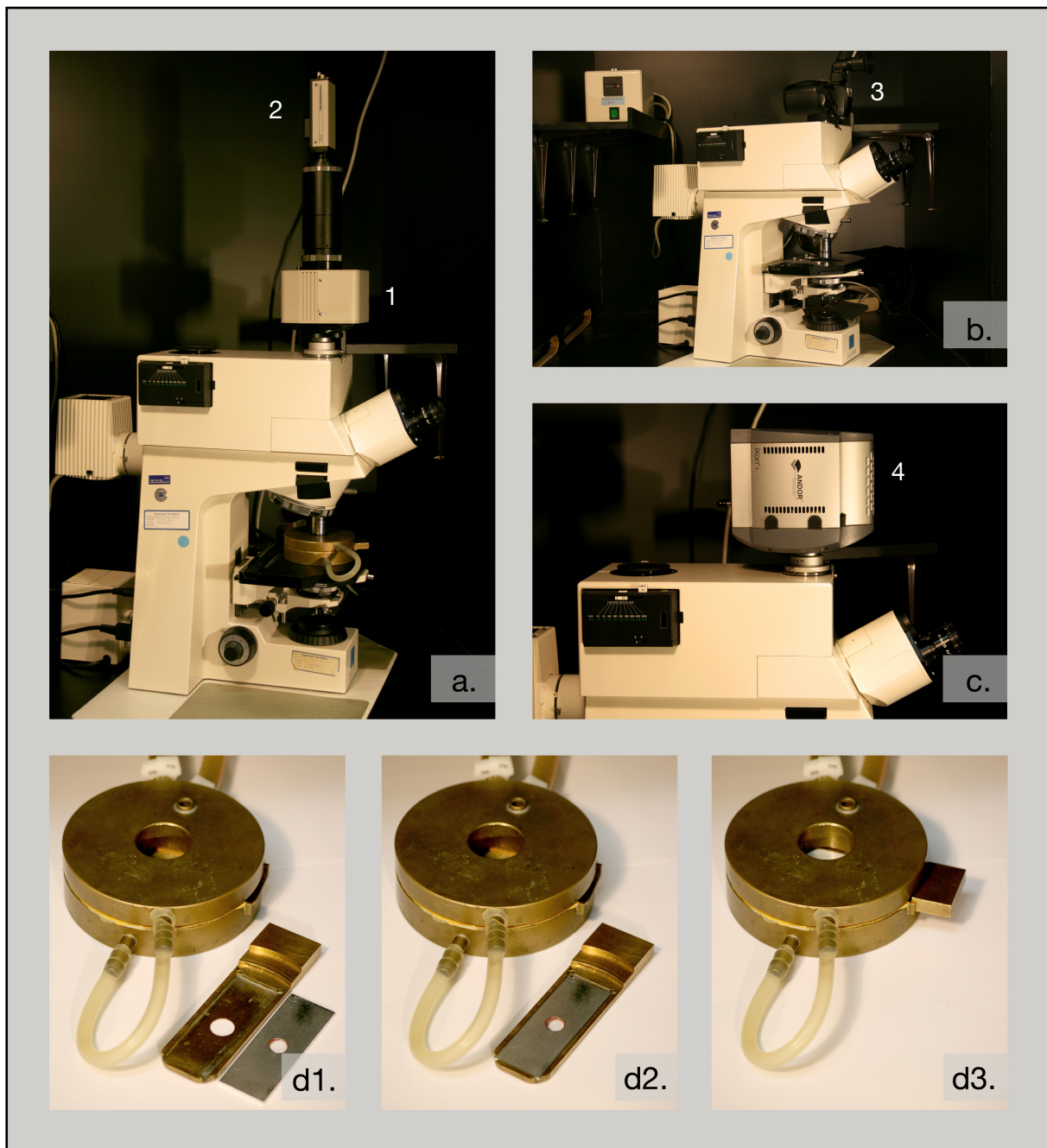


Abbildung 2.9: Apparatur für die bildgebende Biolumineszenz

- a.: Versuchsaufbau mit Mikroskop (Axiophot, Zeiss) und Biolumineszenzkamera (C2400 Hamamatsu): Multichannel-Plate (1) und CCD-Kamera (2).
- b.: Mikroskop (Axiophot, Zeiss) mit Digitalkamera (D100, Nikon) (3) zur Dokumentation der histochemischen Färbungen.
- c.: Biolumineszenzkamera der Firma Andor (AndorTM iXonEM+) (4).
- d1.: kupferne Messkammer mit angeschlossener Wasserkühlung. Rechts daneben: Probenschlitten und Reaktionskammer.
- d2.: Reaktionskammer im Probenschlitten.
- d3.: geschlossene Messkammer.

Messung muss die Lampe des Lichtmikroskops ausgeschaltet sein. Nach jeder Messung wird erneut jeder Tumorschnitt mithilfe der Biolumineszenzkamera fotografiert, um ein Verdrutschen des Schnittes kurz vor oder während der Messung zu dokumentieren.

Die Reaktionskammer wird gereinigt und für die nächste Messung vorbereitet.

2.4.9 Unterschiede der verschiedenen Metabolite

Die Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Lichtreaktionen wurden bereits in Abschnitt 2.4.5 erläutert. Hier sollen die messspezifischen Unterschiede dargestellt werden.

In Abhängigkeit von Metabolit und Reaktionslösung unterscheiden sich die Inkubationszeit und die Messzeit sehr stark (Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Messbedingungen bei den vier Metaboliten

	Inkubationszeit	Messzeit	Raumtemperatur	Temperatur der Messkammer
ATP	15 s	45 s	22 °C	20 °C
Laktat	15 s	35 s	22 °C	20 °C
Glukose	15 s	60 s	22 °C	20 °C
Pyruvat	10 s	140 s	26 °C	30 °C

2.4.10 Kalibrierung der Biolumineszenzreaktion

Da bei dem verwendeten Biolumineszenzverfahren das emittierte Licht proportional zur Umsatzrate des zu messenden Metabolits ist, kann mithilfe von Lösungen bekannter Metabolitkonzentration eine Kalibrierungskurve erstellt werden.

Hierzu wird Einbettmedium mit bekannten Konzentrationen von ATP, Laktat, Glukose und Pyruvat versetzt und anschließend nach demselben Verfahren wie die Tumorschnitte im Mikrokryotom geschnitten. Aus den Ergebnissen der Biolumineszenzmessungen dieser Standardschnitte werden Kalibrierungskurven angefertigt. Da die Reaktionen bei der Biolumineszenz sehr stark temperaturempfindlich sind, werden die Kalibrierungsmessungen zeitnah zu den Messungen der Tumorschnitte durchgeführt.

Die fertigen Kalibrierungskurven wurden freundlicherweise von Frau Meyer und Frau Dr. Sattler zur Verfügung gestellt.

2.4.11 Computergestützte Auswertung

Um Tumorgewebe als funktionelles vitales Gewebe identifizieren zu können, muss als erstes die Auswertung der ATP-Messung erfolgen. Die ausgewählten Areale (ROI, Region Of Interest), die ausreichend ATP (mindestens 0,2 $\mu\text{mol/g}$) enthalten, werden als Referenzareale für die anderen Metabolite in Parallelschnitten genutzt.

Zu Beginn werden die Durchlichtbilder, die von jedem Tumorschnitt vor dem Messvorgang angefertigt wurden, und die eigentlichen Biolumineszenzbilder von 16 Bit-Bildern in Bilder mit 8 Bit Informationstiefe umgewandelt (ImageJ 1.37v) und unter einem neuen Namen gespeichert. Dieser Schritt ist nötig, da Photoshop (Adobe Photoshop CS2/CS3) keine 16 Bit-Bilder in TIF-Format öffnen kann. Die Bilder werden nun zusammen mit den vorher fotografierten HE und CK-Bildern in Photoshop geöffnet. Da es sich um Parallelschnitte aus einem Tumor handelt, können das Durchlichtbild, HE- und CK-Bild auf das Biolumineszenzbild halbtransparent überlagert werden. Hierzu empfiehlt sich, für jedes Bild eine neue Bildebene zu verwenden. Es wird in einer neuen Bildebene eine Maske der „Region of Interest“ (ROI) angefertigt, die alle Areale enthält, die ausgewertet werden sollen. Diese Maske wird unter einem neuen Namen als 8 Bit-TIFF-Datei gespeichert.

Bis zu diesem Punkt ist die Auswertung bei beiden Kameramodellen identisch. Die Kamera-Software der zweiten Kamera (Andor IQ 1.8) hat eine Funktion für die Auswertung einer ROI integriert. Bei Biolumineszenzbildern, die mit der Kamera von Hamamatsu aufgenommen werden, muss die Auswertung mit ImageJ erfolgen.

Auswertung mit ImageJ:

Die angefertigte Maske und das 16 Bit-Biolumineszenzbild werden in ImageJ geöffnet. Als erstes muss das 8 Bit-Maskenbild in ein 16 Bit-Bild umgewandelt werden, um die Kompatibilität zu dem Biolumineszenzbild zu gewährleisten. Mit Hilfe des Zauberstab-Werkzeugs wird die Maske markiert, kopiert, im Biolumineszenzbild eingefügt und an die korrekte Position verschoben. Der Farbbereich außerhalb der Maske wird entfernt (Edit → Clear Outside). Aus dem verbleibenden Areal des 16 Bit-Graustufenbilds wird mithilfe eines Plugins (SixteenBit Histogram) ein tabellarisches Histogramm erzeugt. In diesem Histogramm ist jedem Graustufenwert eine Pixelanzahl zugeordnet. Diese Tabelle kann in eine Exeltabelle (Microsoft® Excel) kopiert werden und mit der erzeugten Kalibrierungskurve ausgewertet werden. So kann ein Durchschnittswert der Metabolitkonzentration in $\mu\text{mol/g}$ für jede ROI angegeben werden.

Auswertung mit Andor IQ 1.8:

Bei der neueren Biolumineszenzkamera besteht die Möglichkeit das Maskenbild direkt in der Andor-Software zu öffnen und auf das Biolumineszenzbild zu kopieren. Es wird der mittlere Graustufenbereich (Mittelwert), das Maximum und die Standardabweichung, sowie die Fläche der ROI angezeigt. Aus diesen Werten kann wiederum in einer Exeltabelle mithilfe der Kalibrierungskurve ein Durchschnittswert der Metabolitkonzentration in $\mu\text{mol/g}$ für die ausgewerteten Tumorschnitte angegeben werden.

2.4.12 Falschfarbenkalibrierung

Mithilfe von HE- und Cytokeratinfärbungen von Parallelschnitten der gemessenen Tumorschnitte ist es möglich, mit ebenenbasierter Grafiksoftware (Adobe Photoshop CS, CS2 und

CS3) eine Maske zu erstellen, die eine Unterscheidung zwischen vitalem Tumorgewebe, Nekrosen und Stroma des Wirtstiers gestattet. Diese Maske wird mithilfe des Biolumineszenzbilds der ATP Messung modifiziert, damit der Bereich des vitalen Tumorgewebes noch genauer abgegrenzt werden kann. Die so erstellte Maske wird nun auf die Biolumineszenzbilder der Laktat-, Glukose- und Pyruvatmessungen übertragen und ermöglicht somit eine genaue arealsspezifische bzw. strukturbezogene Auswertung des vitalen Tumorgewebes. Da es sich um Parallelschnitte handelt, muss die Maske bei jedem Tumorschnitt etwas angepasst werden.

Die Methode der bildgebenden Biolumineszenz ermöglicht es aus den Biolumineszenzbildern ein farbiges Bild zu erzeugen. Die 16 Bit (C2400 Hamamatsu) bzw. 14 Bit Graustufenbilder (Andor™ iXon^{EM+}) werden als 8 Bit Bilder gespeichert. Im nächsten Schritt wird eine tabellarische Zuordnung der Graustufen zu verschiedenen RGB Farben vorgenommen (Microsoft® Exel). Diese wird mithilfe der Kalibrierungswerte der jeweiligen Messung und des maximalen Grauwerts des Biolumineszenzbilds erstellt. Mit dem Grafikprogramm ImageJ und einem speziellen Plugin (LUT Panel 2.2) kann aus dem 8 Bit Biolumineszenzbild mithilfe der tabellarischen Farbzuordnung ein so genanntes Falschfarbenbild erstellt werden.

Exemplarisch wurde von jeder Zelllinie die Schnittserie eines einzelnen Tumors ausgewählt, um die Besonderheiten der Metabolitverteilung im Tumorschnitt zu erläutern. In Abbildung 3.15 im Ergebnisteil befinden sich die Falschfarbenbilder und Bilder der HE-Färbungen der beiden Wildtypzelllinien IGROV1 und OC 316.

2.5 Statistische Auswertung

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde versucht, alle Experimente mindestens dreimal zu wiederholen, zudem erfolgten Mehrfachbestimmungen bei einzelnen Proben.

Bei allen Metabolitbestimmungen in Monolayer-Zellkultur sind im folgenden Abschnitt Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen und deren Standardabweichungen aufgeführt.

Die Metabolitkonzentrationen in den Xenotransplantaten sind Mittelwerte aus einer arealsspezifischen Auswertung. Bei den Tumoren aus den beiden Wildtypzelllinien wurden pro Zelllinie fünf Tumore mit jeweils drei Tumorschnitten gemessen. Bei der Zelllinie OC 316 LUC wurden sieben Tumoren mit jeweils zwei bis vier Tumorschnitten und bei der Zelllinie OC 316 Δ HIF-1 α wurden acht Tumore mit ebenfalls zwei bis vier Tumorschnitten gemessen. Alle Daten sind in Boxplots grafisch dargestellt. Die genauen Eigenschaften der Boxplots sind in Abbildung 2.10 gezeigt.

Die Daten aus dem In-Cell-Western wurden aus einem Einzelexperiment mit einer Dreifachbestimmung der einzelnen Proben gewonnen.

Zur statistischen Analyse der Daten wurden die Programme Exel (Microsoft® Exel for Mac 2008, Microsoft, USA) und Origin (Origin 7G, Origin Lab, Northampton, USA) verwendet.

Mithilfe von Microsoft® Excel wurden die Daten der deskriptiven Statistik (Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimalwerte und Maximalwerte) berechnet, sowie zur Bestimmung der Signifikanz der t-Test verwendet. Die grafische Analysen sowie Regressionsanalysen wurden mithilfe von Origin durchgeführt.

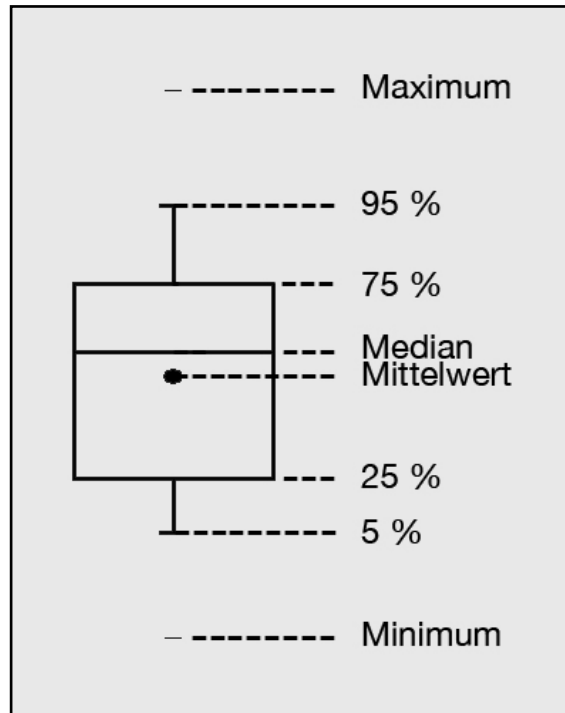


Abbildung 2.10: Eigenschaften der Boxplots

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit werden die metabolischen Eigenschaften zweier verschiedener Ovarialkarzinomzelllinien in Monolayer-Zellkultur mit deren Stoffwechseleigenschaften im soliden Xenotransplantat verglichen.

Bei den in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen Zelllinien wurden Laktatproduktions- sowie Glukoseverbrauchsmessungen in Monolayer-Zellkultur durchgeführt. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse werden mit den Metabolitkonzentrationen im Xenotransplantat der jeweiligen Zelllinie verglichen. Hierzu wurden mithilfe des unter Abschnitt 2.4.5 beschriebenen bildgebenden Biolumineszenzverfahrens die Metabolite ATP, Laktat, Glukose sowie Pyruvat bestimmt. Zur Kontrolle der Transfektion der Zelllinien OC 316 Δ HIF-1 α und OC 316 LUC wurde mithilfe des In-Cell-Western Blot die Quantität des HIF-1 α Proteinkomplexes überprüft.

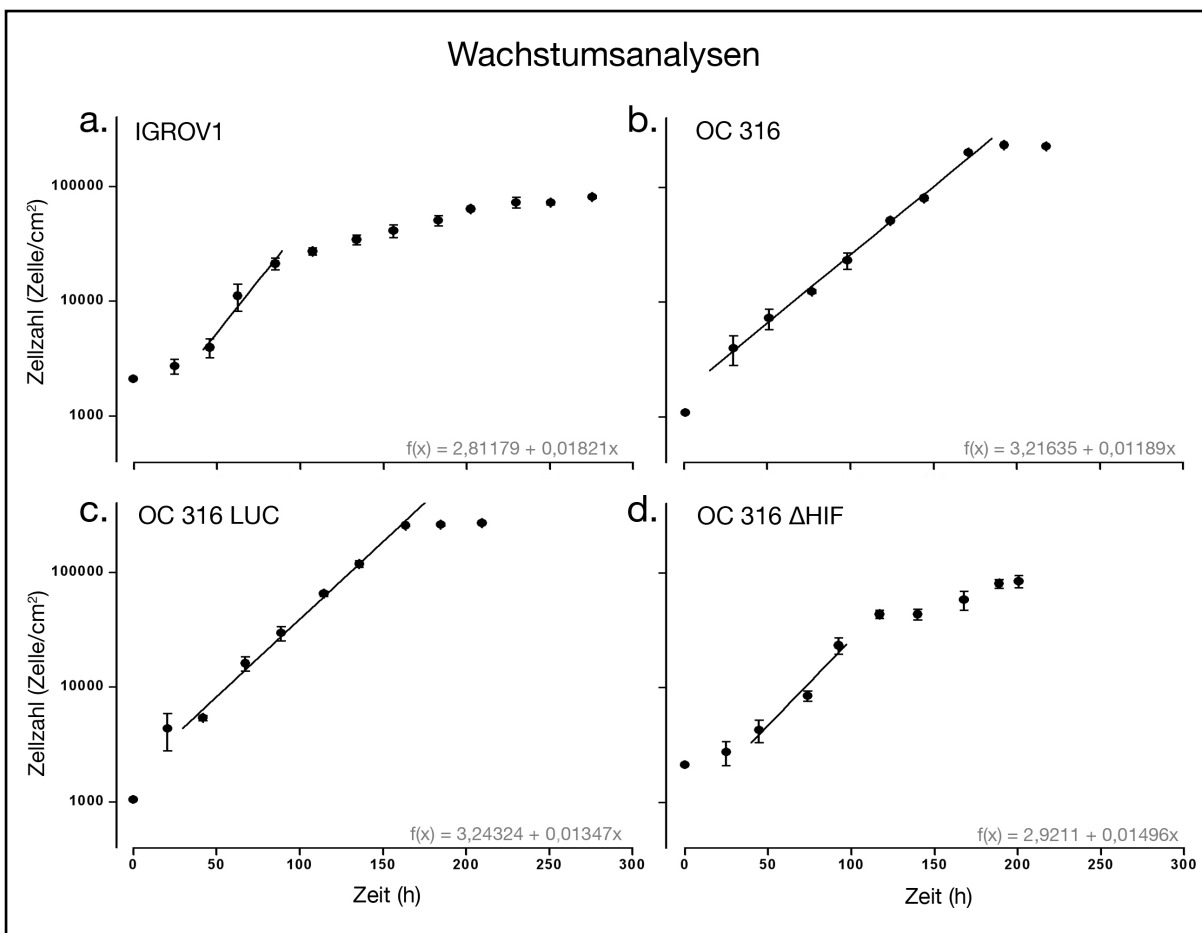
Um genauere Kenntnisse über die verwendeten Zelllinien zu erhalten und um diese charakterisieren zu können, wurde mit einer Wachstumsanalyse jeder Zelllinie begonnen. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse wurden benötigt, um die Versuchsansätze für die Metabolitmessungen und den In-Cell-Western Blot für jede Zelllinie individuell ihrem Zellwachstum und den jeweiligen Teilungsraten entsprechend gestalten zu können.

3.1 Quantifizierung des Zellwachstums

Um genaue Erkenntnisse über das Wachstumsverhalten der Zelllinien IGROV1, OC 316, OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α zu erlangen, wurden die Zellen wie unter Abschnitt 2.1.6 beschrieben definiert ausgesät und das Zellwachstum mittels automatisierter Zellzählung (siehe 2.1.3) bestimmt. Mithilfe der halblogarithmischen Darstellung der gewonnenen Daten wurden aus den Steigungen im Bereich des exponentiellen Wachstums die Verdopplungszeiten der Zellen bestimmt.

Tabelle 3.1 zeigt die Verdopplungszeiten der Zelllinien IGROV1, OC 316, OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α . Die Wachstumskurven, welche als Grundlage zur Ermittlung der Verdopplungszeiten herangezogen wurden, sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

Die Zelllinie IGROV1, die für ihre niedrige glykolytische Aktivität bekannt ist, zeigte in den Versuchen eine Verdopplungszeit von 16,5 h. Bei der Erstbeschreibung der Zelllinie wurden Verdopplungszeiten von 17 - 22 h, in Abhängigkeit der Passagenzahl, gemessen (Benard *et al.*, 1985). In derselben Publikation wurde beschrieben, dass das Wachstum der Zellen nach der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von etwas $1,5 \times 10^5$ Zellen/cm² in die Platteauphase übergehen. Diese Erkenntnis deckt sich mit den hier gewonnenen Daten.

**Abbildung 3.1: Wachstumskurven**

Die Abbildung zeigt repräsentative Wachstumskurven der Zelllinien IGROV1 (a.), OC 316 (b.), OC 316 LUC (c.) und OC 316 Δ HIF-1 α (d.) in halblogarithmischer Darstellung. Es wurde die Zellzahl/cm² gegen die Wachstumsdauer in Stunden (h) aufgetragen. In jeder Grafik ist die Steigungsgerade im exponentiellen Wachstum mit der dazugehörigen Geradengleichung dargestellt.

Tabelle 3.1: Verdopplungszeiten der verwendeten Zelllinien

IGROV1	OC 316	OC 316 LUC	OC 316 Δ HIF-1 α
16,5 h	25,3 h	22,4 h	20,1 h

Bei der Zelllinie OC 316 wurden 25,3 h Verdopplungszeit gemessen. Die Erstbeschreiber machten bei ihren Wachstumsanalysen hierzu keine genauen Angaben (Alama *et al.*, 1996). Die Verdopplungszeiten der beiden transfizierten Zelllinien OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α lagen bei 22,4 h bzw. bei 20,1 h.

3.2 Metabolitmessungen in Monolayer-Zellkultur

Alle Metabolitbestimmungen wurden photometrisch aus Überständen des Nährmediums gemessen (siehe 2.2ff). Aus einem Messansatz wurde sowohl der Laktat- als auch der Glukosegehalt bestimmt. Jede Versuchsreihe wurde mindestens dreimal durchgeführt.

3.2.1 Laktatproduktion in Monolayer-Zellkultur

Bei den verwendeten Zelllinien IGROV1, OC 316, OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α erfolgte eine kontinuierliche Laktatsekretion von den Zellen in das Nährmedium über den Beobachtungszeitraum von sechs Stunden. Somit war ein linear ansteigender Laktatgehalt über den angegebenen Zeitraum nachweisbar.

Die Zelllinie IGROV1 zeigte eine deutlich geringere Abgabe von Laktat auf als die Zelllinie OC 316. Der Laktatgehalt betrug nach sechs Stunden Inkubationszeit 3,62 pmol/Zelle bei IGROV1 und 7,975 pmol/Zelle bei OC 316. Bei den transfizierten Zelllinien war zu erkennen, dass bei einer herabgesetzten Aktivität von HIF-1 α , also bei der Zelllinie OC 316 Δ HIF-1 α , mit 6,848 pmol/Zelle, ein geringerer Laktatgehalt nachweisbar ist als bei der Wildtypzelllinie OC 316. Die Zelllinie OC 316 LUC, welche mit dem Kontrollvektor transfiziert wurde, zeigte nach sechs Stunden Inkubationszeit einen Laktatgehalt von 9,521 pmol/Zelle auf. Die entsprechenden Messwerte (MW \pm SD) über den Zeitraum von sechs Stunden sind in Tabelle 3.2 zu finden. Die grafischen Darstellungen der Laktatproduktion sind in Abbildung 3.2 zu sehen.

Bei der Berechnung der Laktatmenge/Zellvolumen (mol/l) zeigte sich ein analoges Bild. Nach sechs Stunden Inkubationszeit war bei IGROV1 mit 0,689 mol/l eine geringere Laktatkonzentration zu finden als bei OC 316 mit 1,549 mol/l. Auch bei dieser Berechnung zeigte OC 316 Δ HIF-1 α mit 1,369 mol/l eine geringere Laktatkonzentration auf als die Wildtypzelllinie. Bei OC 316 LUC betrug die Konzentration 1,687 mol/l. Die entsprechenden Messwerte (MW \pm SD) sind in Tabelle 3.3 zu finden. Die grafischen Darstellungen der Laktatproduktion sind in Abbildung 3.3 zu sehen.

In Abbildung 3.4 ist der Verlauf einer Laktatproduktion über einen Zeitraum von 24 Stunden gezeigt. Es handelt sich hierbei nicht um Daten aus drei unabhängigen Versuchen, sondern lediglich um die Darstellung einer einzelnen Messreihe. Es ist zu sehen, dass die Laktatproduktion auch über einen Zeitraum von 24 Stunden linear weiter verläuft, ohne dass ein Sättigungsverhalten auftritt. Die Versuche über 24 Stunden wurden einmalig bei allen vier Zelllinien durchgeführt. Exemplarisch sind hier nur die Daten von OC 316 LUC dargestellt.

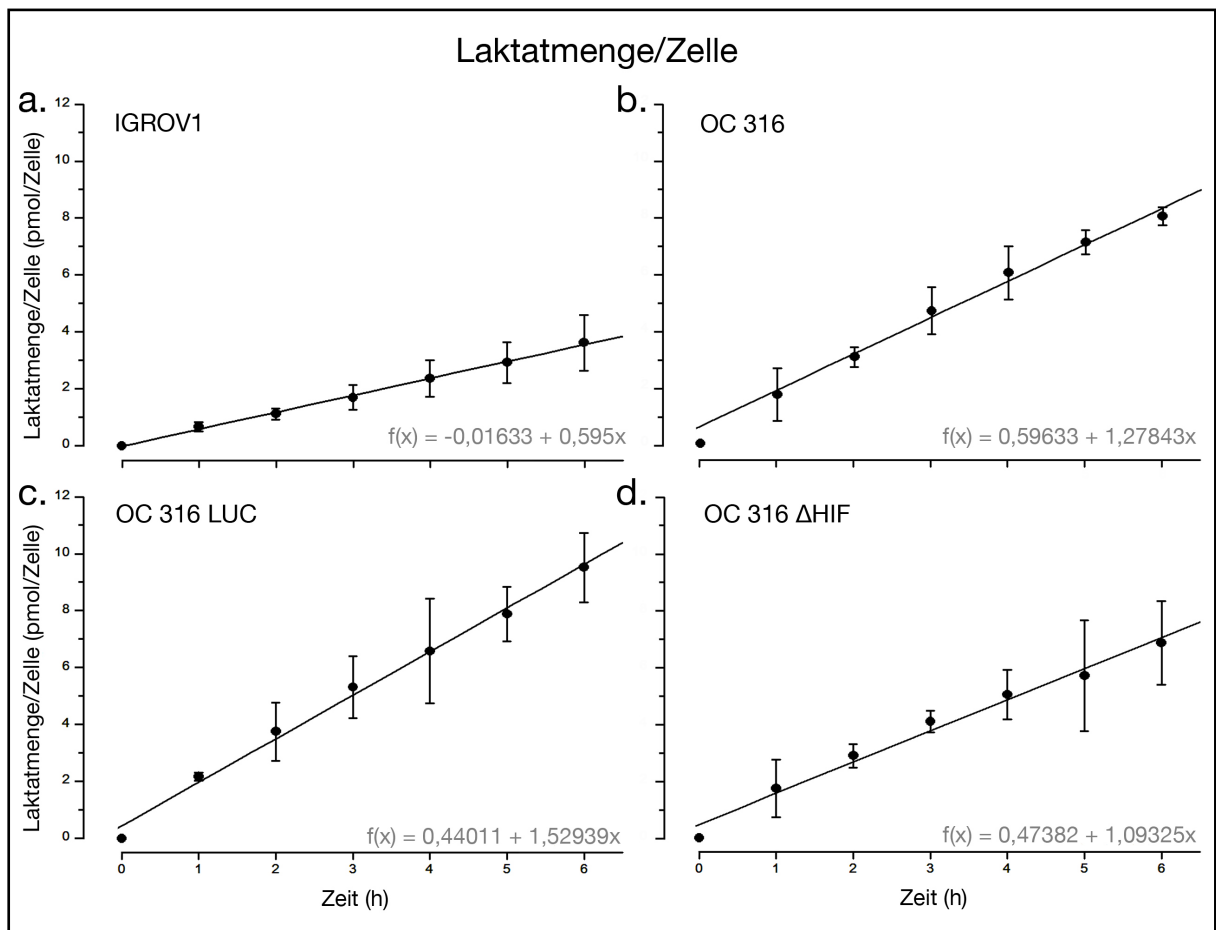
Tabelle 3.5 zeigt die Laktatkonzentrationen nach 6 Stunden Inkubationszeit und die Laktatproduktionsraten aller Zelllinien in einer Übersicht. Hier zeigen sich signifikante Unterschiede in der Laktatkonzentration nach 6 Stunden (T-Test*: $p = 0,002$) und der Laktatproduktionsrate (T-Test*: $p < 0,001$) zwischen IGROV1 und OC 316. Zwischen OC 316 und OC 316 LUC bzw. OC 316 Δ HIF-1 α sind keine signifikanten Unterschiede in der Laktatkonzentration und Laktatproduktionsrate festzustellen.

*Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Berechnungen in mol/l.

Tabelle 3.2: Laktatmenge in pmol/Zelle

Die Daten stellen jeweils die Mittelwerte bzw. Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen dar.

Zeit (h)	IGROV1			OC 316			OC 316 LUC			OC 316 Δ HIF-1 α		
	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD
1	0,67	\pm	0,16	1,72	\pm	0,92	2,16	\pm	0,14	1,73	\pm	1,01
2	1,12	\pm	0,20	3,03	\pm	0,36	3,75	\pm	1,02	2,88	\pm	0,41
3	1,70	\pm	0,44	4,65	\pm	0,83	5,31	\pm	1,10	4,09	\pm	0,38
4	2,36	\pm	0,64	5,99	\pm	0,93	6,58	\pm	1,83	5,03	\pm	0,86
5	2,92	\pm	0,72	7,06	\pm	0,42	7,88	\pm	0,97	5,69	\pm	1,94
6	3,62	\pm	0,99	7,98	\pm	0,32	9,52	\pm	1,22	6,85	\pm	1,48

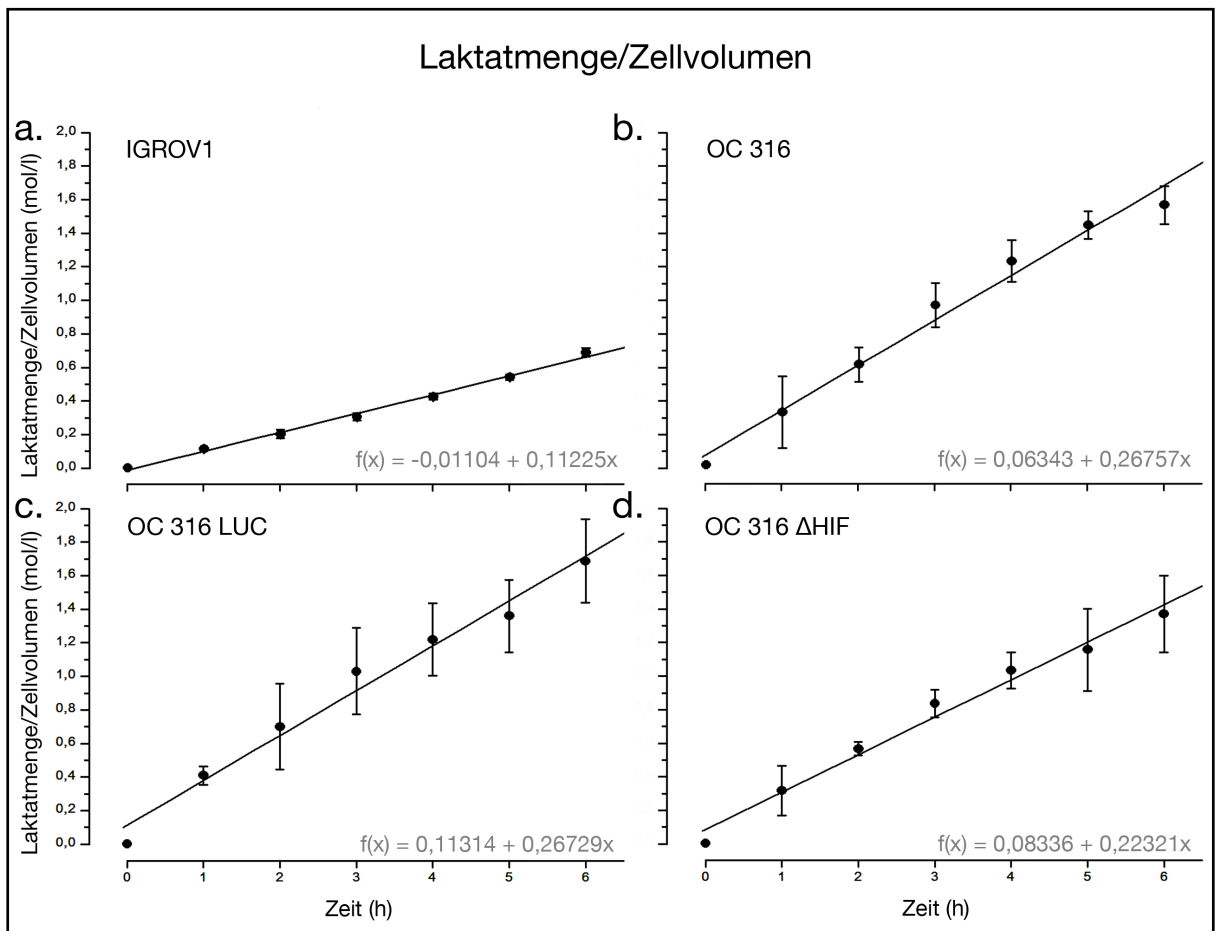
**Abbildung 3.2: Laktatproduktion in pmol/Zelle**

Die Abbildung zeigt die Laktatproduktion der Zelllinien IGROV1 (a.), OC 316 (b.), OC 316 LUC (c.) und OC 316 Δ HIF-1 α (d.) über einen Zeitraum von 6 h. Es wurde die Laktatmenge/Zelle (pmol/Zelle) gegen die Inkubationszeit in Stunden (h) aufgetragen. In jeder Grafik ist der lineare Fit der Messwerte mit der dazugehörigen Geradengleichung dargestellt.

Tabelle 3.3: Laktatmenge in mol/l bezogen auf das Zellvolumen

Die Daten stellen jeweils die Mittelwerte bzw. Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen dar.

Zeit (h)	IGROV1			OC 316			OC 316 LUC			OC 316 Δ HIF-1 α		
	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD
1	0,12	\pm	0,01	0,32	\pm	0,21	0,41	\pm	0,06	0,32	\pm	0,15
2	0,20	\pm	0,03	0,60	\pm	0,10	0,70	\pm	0,26	0,57	\pm	0,04
3	0,31	\pm	0,02	0,95	\pm	0,13	1,03	\pm	0,26	0,84	\pm	0,08
4	0,43	\pm	0,02	1,22	\pm	0,13	1,22	\pm	0,22	1,03	\pm	0,11
5	0,54	\pm	0,02	1,43	\pm	0,08	1,36	\pm	0,22	1,15	\pm	0,24
6	0,69	\pm	0,03	1,55	\pm	0,11	1,69	\pm	0,25	1,37	\pm	0,23

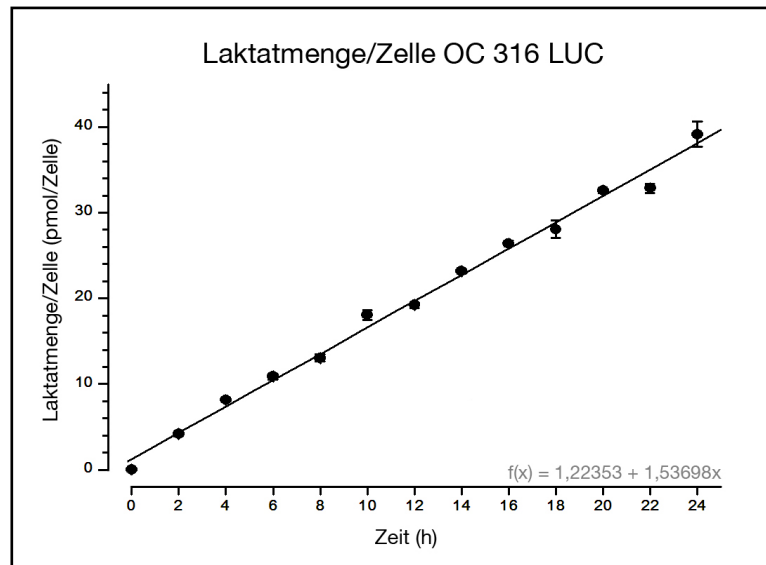
**Abbildung 3.3: Laktatproduktion in mol/l**

Die Abbildung zeigt die Laktatproduktion der Zelllinien IGROV1 (a.), OC 316 (b.), OC 316 LUC (c.) und OC 316 Δ HIF-1 α (d.) über einen Zeitraum von 6 h. Es wurde die Laktatmenge/Zellvolumen (mol/l) gegen die Inkubationszeit in Stunden (h) aufgetragen. In jeder Grafik ist der lineare Fit der Messwerte mit der dazugehörigen Geradengleichung dargestellt.

Tabelle 3.4: Laktatmenge in pmol/Zelle

Die Daten stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einer Messreihe dar.

Zeit (h)	OC 316 LUC		
	MW	±	SD
2	4,17	±	0,58
4	8,15	±	0,27
6	10,87	±	0,61
8	13,02	±	0,82
10	18,05	±	1,21
12	19,23	±	0,63
14	23,17	±	0,64
16	26,39	±	0,66
18	28,04	±	2,03
20	32,59	±	0,60
22	32,85	±	1,07
24	39,15	±	2,93

**Abbildung 3.4: Laktatproduktion in pmol/Zelle**

Die Abbildung zeigt die Laktatproduktion der Zelllinie OC 316 LUC über einen Zeitraum von 24 h. Es wurde die Laktatmenge/Zelle (pmol/Zelle) gegen die Inkubationszeit in Stunden (h) aufgetragen. In der Grafik ist der lineare Fit der Messwerte mit der dazugehörigen Geradengleichung dargestellt.

Tabelle 3.5: Laktatkonzentrationen nach 6h und Produktionsraten

Die Tabelle zeigt die Laktatkonzentrationen nach 6h Inkubationszeit (pmol/Zelle und mol/l) und Produktionsraten (pmol/Zelle/h und mol/l/h).

	Endwerte nach 6h		Produktionsraten	
	pmol/Zelle	mol/l	pmol/Zelle/h	mol/l/h
IGROV1	3,62 ± 0,99	0,69 ± 0,03	0,60	0,11
OC 316	7,98 ± 0,32	1,55 ± 0,12	1,28	0,27
OC 316 LUC	9,52 ± 1,22	1,69 ± 0,25	1,53	0,27
OC 316 ΔHIF-1α	6,85 ± 1,48	1,37 ± 0,23	1,09	0,22

3.2.2 Glukoseverbrauch in Monolayer-Zellkultur

Wie auch bei der Produktion von Laktat zu beobachten war, blieb die Zelllinie IGROV1 bei dem Glukoseverbrauch hinter der hochglykolytischen OC 316 Zelllinie zurück. Bei IGROV1 war zu Beginn der Inkubationszeit (0 h) ein Glukosegehalt von 16,7 pmol/Zelle und nach sechs Stunden Inkubationszeit ein Glukosegehalt von 14,3 pmol/Zelle im Medienüberstand nachweisbar. Bei OC 316 waren es hingegen 30,9 pmol/Zelle zu Beginn und 27,1 pmol/Zelle Glukose nach sechs Stunden Inkubationszeit. Somit hat der lineare Fit durch die Messpunkte bei IGROV1 ein Gefälle von $-0,35 \text{ pmol/Zelle} \times \text{h}$. Bei OC 316 verläuft die Gerade mit einem Gefälle von $-0,61 \text{ pmol/Zelle} \times \text{h}$ deutlich steiler.

Die beiden transfizierten Zelllinien OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α zeigten keine signifikanten Besonderheiten gegenüber der Wildtypzelllinie. Bei OC 316 LUC wurde ein Glukosegehalt von 31,3 pmol/Zelle bei Inkubationsbeginn und 26,7 pmol/Zelle nach sechs Stunden Inkubationszeit gemessen. Das Gefälle des linearen Fit beträgt -0,79 pmol/Zelle \times h. Bei OC 316 Δ HIF-1 α wurde ein Glukosegehalt von 30,9 pmol/Zelle bei Inkubationsbeginn und 25,5 pmol/Zelle nach sechs Stunden Inkubationszeit gemessen. Das Gefälle des linearen Fit beträgt -0,75 pmol/Zelle \times h. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Die dazugehörigen Graphen befinden sich in Abbildung 3.5.

Tabelle 3.6 zeigt die Glukosekonzentrationen nach 6 Stunden Inkubationszeit und die Glukoseverbrauchsrate aller Zelllinien in einer Übersicht. Zwischen den Zelllinien waren keine signifikanten Unterschiede im Glukoseverbrauch festzustellen.

Tabelle 3.6: Glukosekonzentrationen nach 6h und Verbrauchsrate

Die Tabelle zeigt die Glukosekonzentrationen nach 6h Inkubationszeit (pmol/Zelle) und Verbrauchsrate (pmol/Zelle/h).

	Endwerte nach 6h pmol/Zelle	Verbrauchsrate pmol/Zelle/h
IGROV1	14,3 \pm 5,28	-0,35
OC 316	27,1 \pm 3,92	-0,61
OC 316 LUC	26,7 \pm 4,88	-0,79
OC 316 ΔHIF-1α	25,5 \pm 3,66	-0,75

Tabelle 3.7: Glukosemenge in pmol/Zelle

Die Daten stellen jeweils die Mittelwerte bzw. Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen dar.

Zeit (h)	IGROV1			OC 316			OC 316 LUC			OC 316 Δ HIF-1 α		
	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD	MW	\pm	SD
0	16,72	\pm	5,42	30,94	\pm	3,44	31,29	\pm	5,05	30,89	\pm	2,95
1	16,47	\pm	5,66	30,81	\pm	3,90	30,14	\pm	4,27	29,36	\pm	2,27
2	15,82	\pm	5,14	29,82	\pm	4,28	29,04	\pm	4,84	29,36	\pm	3,62
3	15,74	\pm	5,44	29,34	\pm	3,71	28,03	\pm	4,26	28,68	\pm	3,54
4	15,68	\pm	5,76	29,02	\pm	4,09	27,78	\pm	4,45	27,66	\pm	3,82
5	15,31	\pm	5,72	28,45	\pm	3,65	27,14	\pm	4,27	27,24	\pm	4,14
6	14,28	\pm	5,28	27,09	\pm	3,92	26,71	\pm	4,88	25,47	\pm	3,66

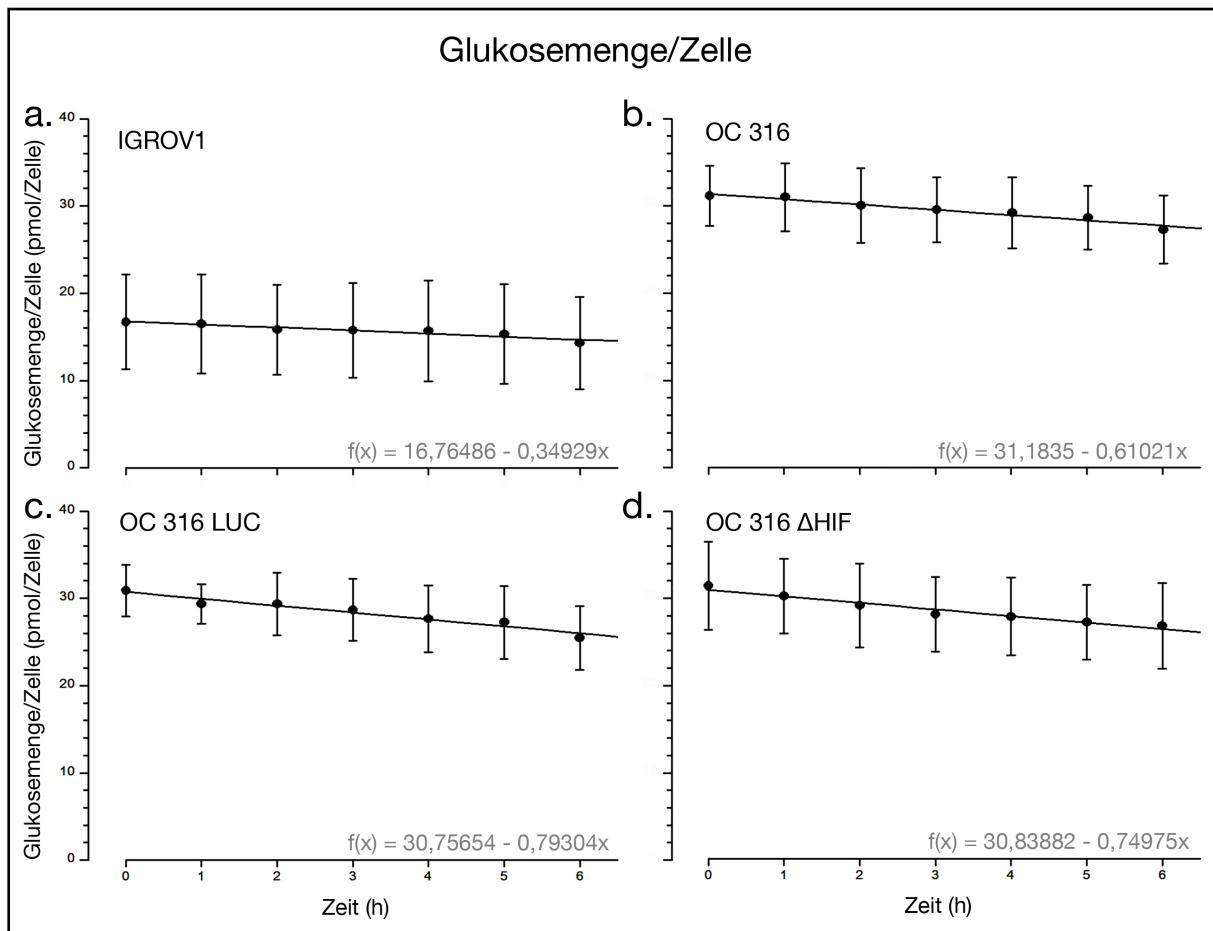


Abbildung 3.5: Glukoseverbrauch in pmol/Zelle

Die Abbildung zeigt den Glukoseverbrauch der Zelllinien IGROV1 (a.), OC 316 (b.), OC 316 LUC (c.) und OC 316 Δ HIF-1 α (d.) über einen Zeitraum von 6 h. Es wurde die Glukosemenge/Zelle (pmol/Zelle) gegen die Inkubationszeit in Stunden (h) aufgetragen. In jeder Grafik ist der lineare Fit der Messwerte mit der dazugehörigen Geradengleichung dargestellt.

3.3 HIF-1 α -Expression

Die Expression von HIF-1 α wurde mithilfe des In-Cell-Western Blot nachgewiesen. Die Zelllinien IGROV1, OC 316, OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α wurden wie unter Abschnitt 2.3 beschrieben in eine 96 Well-Platte mit für die Zellkultur geeigneter Beschichtung ausgesät. Nach zwei Tagen Inkubationszeit und bei einer Konfluenz von 90 - 100 % wurde die quantitative Bestimmung der Expression von HIF-1 α durchgeführt. 50 % der Zellen wurden zuvor für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit Cobalchlorid (CoCl₂) im Medium inkubiert, um die Zellen in einen hypoxischen Zustand zu versetzen. Die dargestellten Daten stammen aus einem einzelnen Versuch.

Bei der Messung der Proteinexpressionen wurde für jede Zelllinie, zusätzlich zur Expression von HIF-1 α , die Expression von Tubulin gemessen. Die gemessenen Expressionen wurden alle auf Tubulin normiert.

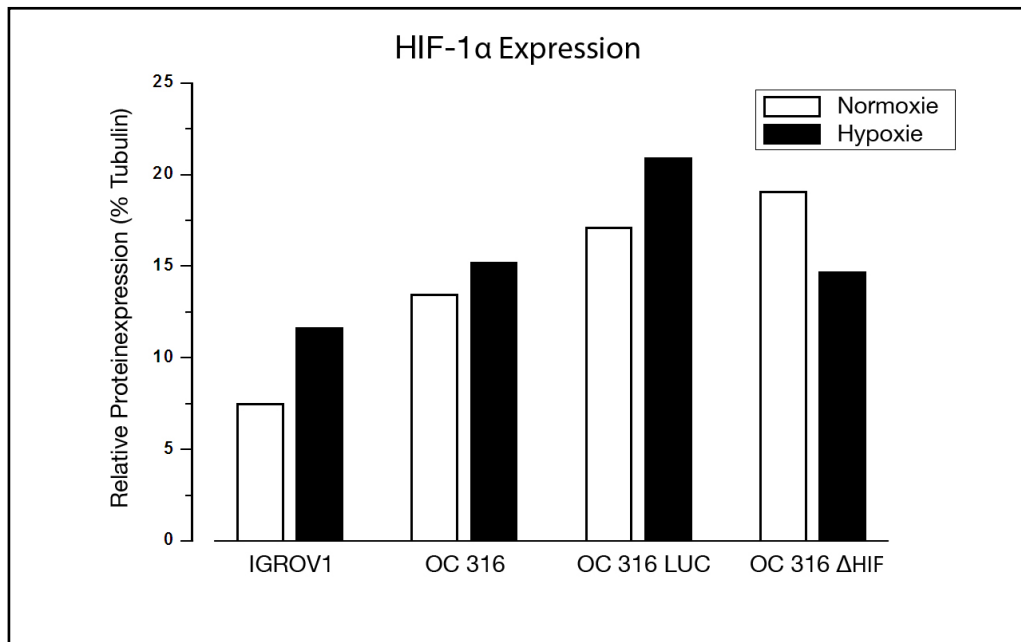


Abbildung 3.6: HIF-1 α -Expression

Relative Proteinexpression von HIF-1 α in Bezug auf Tubulin jeweils unter Normoxie und Hypoxie.

In Abbildung 3.6 ist deutlich zu erkennen, dass IGROV1 sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie geringere Expressionsraten von HIF-1 α aufzeigte, als die Zelllinien OC 316, OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α .

Die Zelllinien IGROV1, OC 316 und OC 316 LUC zeigten unter hypoxischen Bedingungen eine Steigerung der HIF-1 α -Expression auf. Dahingegen war bei der Zelllinie OC 316 Δ HIF-1 α eine Reduktion der HIF-1 α -Expression unter Hypoxie eingetreten. Insgesamt war bei den drei Zelllinien ohne Anti-HIF-1 α shRNA unter hypoxischen Bedingungen eine Steigerung der Expression von 1,75 - 4,13 % nachweisbar, wogegen bei OC 316 Δ HIF-1 α eine 4,38 % geringere Expression unter Hypoxie vorlag.

Die genauen Expressionswerte sind in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tabelle 3.8: HIF-1 α -Expression in % bezogen auf die Proteinexpression von Tubulin (n=1)

	IGROV1	OC 316	OC 316 LUC	OC 316 Δ HIF-1 α
Normoxie	7,51	13,46	17,12	19,06
Hypoxie	11,64	15,21	20,91	14,68

3.4 Metabolitmessungen im Xenograft

Das Verfahren der bildgebenden Biolumineszenz ermöglicht die arealsspezifische Messung von ATP, Laktat, Glukose (Mueller-Klieser & Walenta, 1993) und Pyruvat (Sattler, 2008) in Gewebeschnitten. Die Technik wurde in dieser Arbeit verwendet, um die oben genannten

Metabolite in Xenografts der Zelllinien IGROV1, OC 316, OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α zu messen.

Bei den Tumoren aus den beiden Wildtypzelllinien wurden pro Zelllinie fünf Tumore mit jeweils drei Tumorschnitten gemessen. Bei der Zelllinie OC 316 LUC wurden sieben Tumore mit jeweils zwei bis vier Tumorschnitten und bei der Zelllinie OC 316 Δ HIF-1 α wurden acht Tumoren mit ebenfalls zwei bis vier Tumorschnitten gemessen.

Die Messung von ATP wird benutzt, um vitales Tumorgewebe von nekrotischem Gewebe abzugrenzen. Sollte in einem Tumorschnitt, der in der HE-Färbung mikroskopisch keine sichtbaren Nekrosen aufweist, kein oder wenig ATP nachweisbar sein, so kann dieser Xenograft nicht mehr für eine Messung benutzt werden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte z. B. sein, dass die Kühlkette während des Transports unterbrochen wurde. Um dies auszuschließen und um in der späteren arealsspezifischen Auswertung der anderen Metabolite eine bessere Orientierung zu bekommen, wird von jeder Schnittserie (siehe 2.4.2) als erster Metabolit ATP gemessen.

Alle Daten sind in Boxplots grafisch dargestellt. Die genauen Eigenschaften der Boxplots sind in Abbildung 2.10 gezeigt.

3.4.1 ATP-Bestimmung in den Wildtyp-Xenografts

Bei den ATP Messungen in den Wildtyp-Xenografts zeigten sich bei IGROV1 geringere Werte als bei OC 316. Bei IGROV1 wurde ein Mittelwert von $1,46 \pm 0,39 \mu\text{mol/g}$ und bei OC 316 $2,01 \pm 0,53 \mu\text{mol/g}$ gemessen. Der Unterschied zwischen den beiden Zelllinien war mit einem p-Wert von $< 0,005$ signifikant.

Die Messergebnisse aller Tumorschnitte sind in Tabelle 3.9 aufgeführt. Alle ATP-Werte sind in $\mu\text{mol/g}$ angegeben. Die grafische Darstellung der Daten in Boxplots ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

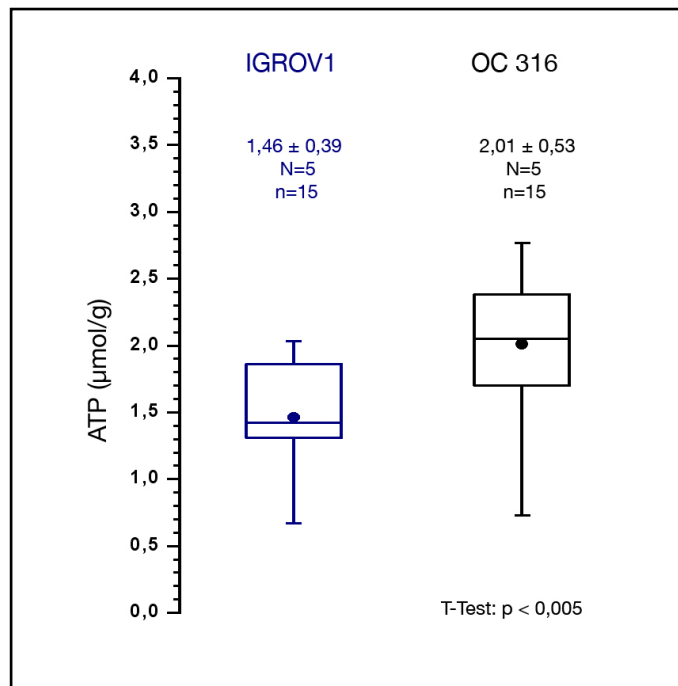


Abbildung 3.7: ATP-Gehalt von IGROV1 und OC 316 Xenograft-Tumoren

Tabelle 3.9: ATP Werte der IGROV1- und OC 316-Xenografts

Die gemessenen Mittelwerte beziehen sich für jeden Tumorschnitt auf die arealsspezifische Auswertung der ATP Werte in µmol/g.

Tumorschnitt	ATP (µmol/g)	Tumorschnitt	ATP (µmol/g)
IGROV1 #1 II	1,31	OC 316 #1 II	1,85
IGROV1 #1 III	1,42	OC 316 #1 III	2,05
IGROV1 #1 IV	1,26	OC 316 #1 IV	1,84
IGROV1 #2 II	1,96	OC 316 #2 II	2,17
IGROV1 #2 III	1,73	OC 316 #2 III	2,71
IGROV1 #2 IV	1,45	OC 316 #2 IV	2,38
IGROV1 #3 II	1,35	OC 316 #3 II	1,65
IGROV1 #3 III	1,90	OC 316 #3 III	1,70
IGROV1 #3 IV	2,03	OC 316 #3 IV	2,25
IGROV1 #4 II	0,82	OC 316 #4 II	2,27
IGROV1 #4 III	1,31	OC 316 #4 III	2,77
IGROV1 #4 IV	0,67	OC 316 #4 IV	2,46
IGROV1 #5 II	1,46	OC 316 #6 II	1,99
IGROV1 #5 III	1,40	OC 316 #6 III	1,31
IGROV1 #5 IV	1,86	OC 316 #6 IV	0,73

3.4.2 Laktat Bestimmung in den Wildtyp-Xenografts

Ebenso wie die ATP Werte waren auch bei den Laktatwerten höhere Ergebnisse bei OC 316, als bei IGROV1 zu beobachten. Bei IGROV1 lag der Mittelwert bei $10,01 \pm 1,69 \mu\text{mol/g}$ und bei OC 316 bei $13,23 \pm 3,36 \mu\text{mol/g}$. Die Differenz der Werte war mit einem p-Wert von $< 0,005$ signifikant.

Die grafische Darstellung der Daten ist in Abbildung 3.8 zu sehen. Eine Auflistung aller Messergebnisse der einzelnen Tumorschnitte befindet sich in Tabelle 3.10.

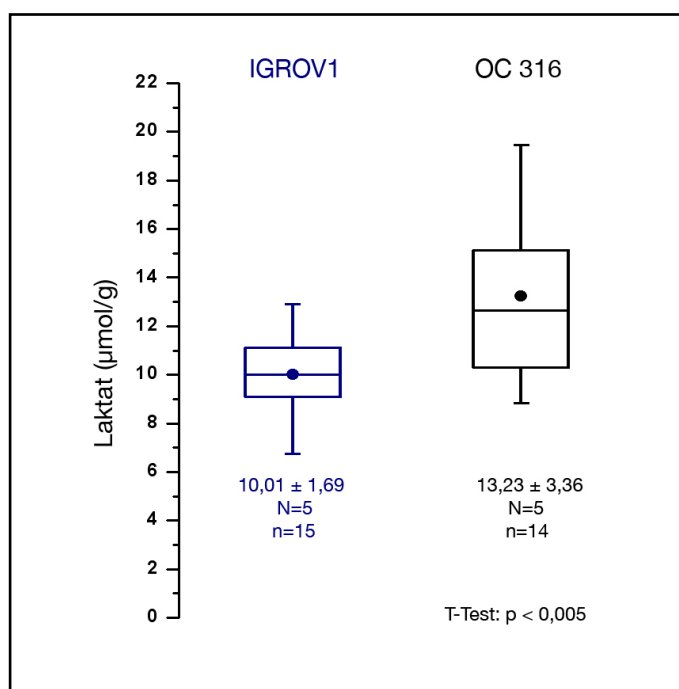


Abbildung 3.8: Laktatgehalt von IGROV1 und OC 316 Xenograft-Tumoren

Tabelle 3.10: Laktatwerte der IGROV1- und OC 316-Xenografts

Die gemessenen Mittelwerte beziehen sich für jeden Tumorschnitt auf die arealsspezifische Auswertung der Laktatwerte in $\mu\text{mol/g}$. *Der Tumorschnitt OC 316 #3 III wurde aufgrund eines Softwarefehlers in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Tumorschnitt	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)	Tumorschnitt	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)
IGROV1 #1 II	10,00	OC 316 #1 II	10,29
IGROV1 #1 III	11,13	OC 316 #1 III	8,90
IGROV1 #1 IV	11,66	OC 316 #1 IV	12,88
IGROV1 #2 II	12,49	OC 316 #2 II	9,77
IGROV1 #2 III	10,48	OC 316 #2 III	11,40
IGROV1 #2 IV	10,33	OC 316 #2 IV	8,85
IGROV1 #3 II	11,07	OC 316 #3 II	15,50
IGROV1 #3 III	9,17	OC 316 #3 III	---*
IGROV1 #3 IV	9,29	OC 316 #3 IV	18,88

Tumorschnitt	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)	Tumorschnitt	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)
IGROV1 #4 II	12,89	OC 316 #4 II	14,66
IGROV1 #4 III	9,20	OC 316 #4 III	19,47
IGROV1 #4 IV	9,08	OC 316 #4 IV	15,14
IGROV1 #5 II	9,04	OC 316 #6 II	14,51
IGROV1 #5 III	7,63	OC 316 #6 III	12,28
IGROV1 #5 IV	6,74	OC 316 #6 IV	12,66

3.4.3 Glukose Bestimmung in den Wildtyp-Xenografts

Wie unter Abschnitt 3.4.2 gezeigt, ergaben die Messungen in den IGROV1 Xenografts geringere Laktatwerte als bei den OC 316 Xenografts. Dies führt nun dazu, dass in den IGROV1 Tumoren signifikant höhere Glukosewerte gemessen wurden. Bei IGROV1 wurde ein Mittelwert von $6,37 \pm 1,62 \mu\text{mol/g}$ und bei OC 316 ein Mittelwert von $4,20 \pm 1,64 \mu\text{mol/g}$ gemessen. Die Differenz zwischen den beiden Zelllinien war mit einem p-Wert = 0,001 signifikant. Die grafische Darstellung der Daten ist in Abbildung 3.9 zu sehen. Eine Auflistung aller Messergebnisse der einzelnen Tumorschnitte befindet sich in Tabelle 3.11.

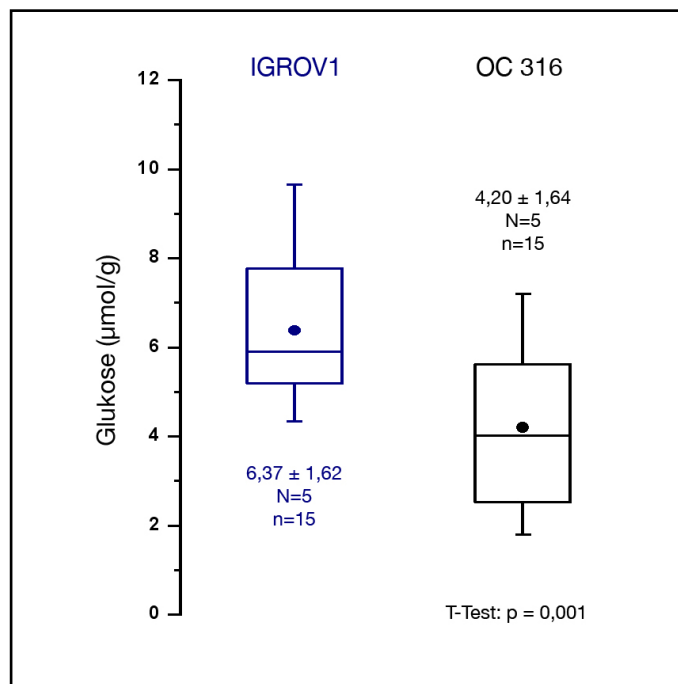


Abbildung 3.9: Glukosegehalt von IGROV1 und OC 316 Xenograft-Tumoren

Tabelle 3.11: Glukosewerte der IGROV1- und OC 316-Xenografts

Die gemessenen Mittelwerte beziehen sich für jeden Tumorschnitt auf die arealsspezifische Auswertung der Glukosewerte in $\mu\text{mol/g}$.

Tumorschnitt	Glukose ($\mu\text{mol/g}$)	Tumorschnitt	Glukose ($\mu\text{mol/g}$)
IGROV1 #1 II	4,54	OC 316 #1 II	4,02
IGROV1 #1 III	5,73	OC 316 #1 III	4,02
IGROV1 #1 IV	6,86	OC 316 #1 IV	5,20
IGROV1 #2 II	5,52	OC 316 #2 II	4,30
IGROV1 #2 III	5,19	OC 316 #2 III	6,08
IGROV1 #2 IV	4,67	OC 316 #2 IV	5,63
IGROV1 #3 II	4,34	OC 316 #3 II	2,32
IGROV1 #3 III	5,19	OC 316 #3 III	2,78
IGROV1 #3 IV	5,90	OC 316 #3 IV	2,44
IGROV1 #4 II	7,97	OC 316 #4 II	5,33
IGROV1 #4 III	9,66	OC 316 #4 III	7,21
IGROV1 #4 IV	7,77	OC 316 #4 IV	5,92
IGROV1 #5 II	8,71	OC 316 #6 II	3,37
IGROV1 #5 III	7,46	OC 316 #6 III	2,53
IGROV1 #5 IV	6,05	OC 316 #6 IV	1,80

3.4.4 Pyruvat Bestimmung in den Wildtyp-Xenografts

Im Gegensatz zu den anderen Metaboliten, zeigten sich bei den Pyruvatmessungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien IGROV1 und OC 316. Bei IGROV1 wurde ein Mittelwert von $0,58 \pm 0,07 \mu\text{mol/g}$ und bei OC 316 ein Mittelwert von $0,63 \pm 0,09 \mu\text{mol/g}$ gemessen.

Die grafische Darstellung der Daten ist in Abbildung 3.10 zu sehen. Eine Auflistung aller Messergebnisse der einzelnen Tumorschnitte befindet sich in Tabelle 3.12.

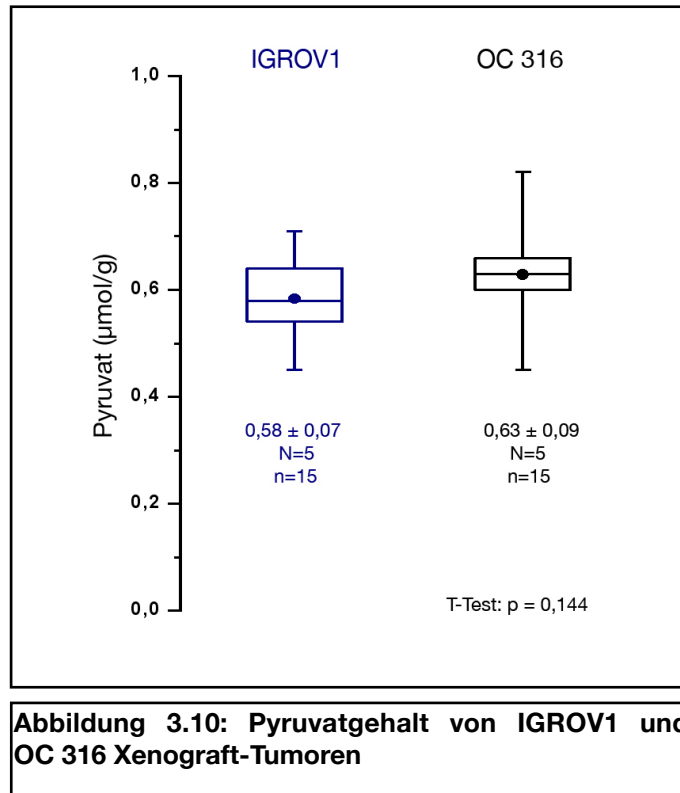


Tabelle 3.12: Pyruvatwerte der IGROV1- und OC 316-Xenografts

Die gemessenen Mittelwerte beziehen sich für jeden Tumorschnitt auf die arealsspezifische Auswertung der Pyruvatwerte in $\mu\text{mol/g}$.

Tumorschnitt	Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$)	Tumorschnitt	Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$)
IGROV1 #1 II	0,57	OC 316 #1 II	0,66
IGROV1 #1 III	0,59	OC 316 #1 III	0,62
IGROV1 #1 IV	0,64	OC 316 #1 IV	0,63
IGROV1 #2 II	0,65	OC 316 #2 II	0,66
IGROV1 #2 III	0,55	OC 316 #2 III	0,61
IGROV1 #2 IV	0,54	OC 316 #2 IV	0,53
IGROV1 #3 II	0,65	OC 316 #3 II	0,65
IGROV1 #3 III	0,71	OC 316 #3 III	0,60
IGROV1 #3 IV	0,58	OC 316 #3 IV	0,64
IGROV1 #4 II	0,61	OC 316 #4 II	0,82
IGROV1 #4 III	0,45	OC 316 #4 III	0,69
IGROV1 #4 IV	0,63	OC 316 #4 IV	0,75
IGROV1 #5 II	0,58	OC 316 #6 II	0,60
IGROV1 #5 III	0,48	OC 316 #6 III	0,51
IGROV1 #5 IV	0,52	OC 316 #6 IV	0,45

3.4.5 Laktat/Pyruvat-Verhältnis in den Wildtyp-Xenografts

Als Maß für den Redoxstatus einer Zelle kann das Verhältnis von Laktat zu Pyruvat herangezogen werden. Bei aerober Glykolyse liegt das Gleichgewicht auf der Seite von Pyruvat und bei anaerober Glykolyse auf der Seite von Laktat (siehe Abschnitt 1.2.1). Ein Laktat/Pyruvat-Verhältnis < 1 würde für vorwiegend aerobe und ein Verhältnis > 1 für vorwiegend anaerobe Glykolyse sprechen.

Wie in Abbildung 3.11 zu erkennen ist, lag bei beiden Zelllinien das Laktat/Pyruvat-Verhältnis deutlich über eins. Der Unterschied zwischen den Zelllinien IGROV1 und OC 316 war mit einem p-Wert = 0,0189 nicht signifikant.

Das Laktat/Pyruvat-Verhältnis jedes einzelnen Tumorschnittes ist in Tabelle 3.13 aufgelistet.

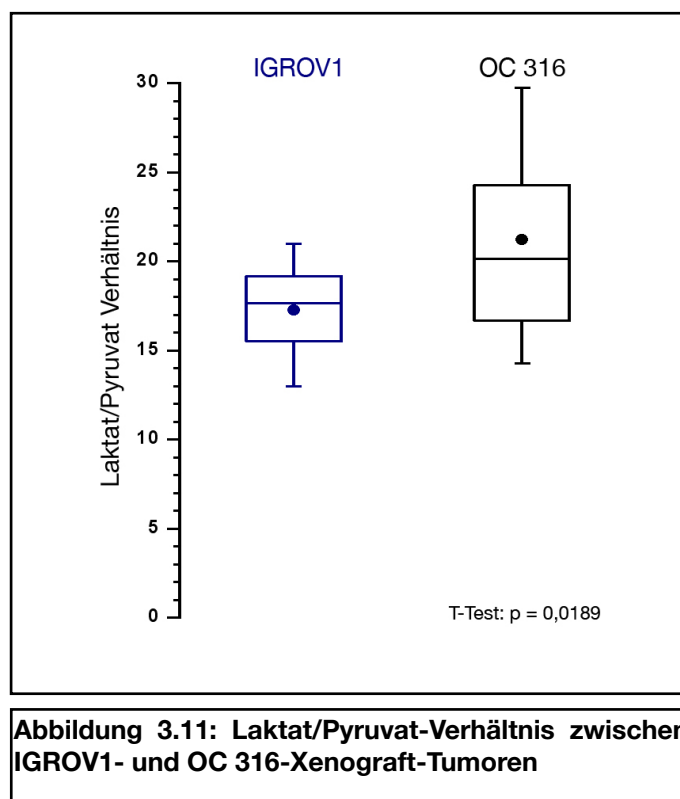


Tabelle 3.13: Laktat/Pyruvat-Verhältnis zwischen den IGROV1- und OC 316Xenografts

Die errechneten Verhältnisse zwischen Laktat und Pyruvat stellen die Quotienten aus zwei Parallelschnitten dar.

*Der Tumorschnitt OC 316 #3 III wurde aufgrund eines Softwarefehlers bei der Laktatmessung in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Tumorschnitt	Laktat/Pyruvat	Tumorschnitt	Laktat/Pyruvat
IGROV1 #1 II	17,65	OC 316 #1 II	15,69
IGROV1 #1 III	18,86	OC 316 #1 III	14,29
IGROV1 #1 IV	18,12	OC 316 #1 IV	20,38
IGROV1 #2 II	19,31	OC 316 #2 II	14,84
IGROV1 #2 III	18,95	OC 316 #2 III	18,58

Tumorschnitt	Laktat/Pyruvat	Tumorschnitt	Laktat/Pyruvat
IGROV1 #2 IV	19,17	OC 316 #2 IV	16,66
IGROV1 #3 II	17,00	OC 316 #3 II	24,01
IGROV1 #3 III	12,99	OC 316 #3 III	---*
IGROV1 #3 IV	16,00	OC 316 #3 IV	29,72
IGROV1 #4 II	21,00	OC 316 #4 II	17,88
IGROV1 #4 III	20,61	OC 316 #4 III	28,40
IGROV1 #4 IV	14,39	OC 316 #4 IV	20,13
IGROV1 #5 II	15,51	OC 316 #6 II	24,28
IGROV1 #5 III	16,03	OC 316 #6 III	23,98
IGROV1 #5 IV	13,07	OC 316 #6 IV	28,15

3.4.6 ATP Bestimmung in den transfizierten Xenografts

Bei den ATP Werten der transfizierten Zelllinien OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α ist zu erwähnen, dass diese Messungen zeitlich vor denen der Wildtypzelllinien stattgefunden haben und alle Messungen mit der Biolumineszenzkamera von Hamamatsu (C2400 Hamamatsu) durchgeführt wurden. Aus diesem Grund sind die Werte der transfizierten Zelllinien zwar untereinander vergleichbar, nur eingeschränkt jedoch mit den Ergebnissen der Wildtypzelllinien. (Genauerer hierzu unter Abschnitt 4.1 Diskussion der Methoden.)

Der ATP-Gehalt der Tumorschnitte von OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α war mit einem p-Wert = 0,095 nicht signifikant different. Bei OC 316 LUC wurde ein Mittelwert von $0,8 \pm 0,34 \mu\text{mol/g}$ und bei OC 316 Δ HIF-1 α von $0,61 \pm 0,32 \mu\text{mol/g}$ gemessen.

Die Darstellung der Daten als Boxplot ist in Abbildung 3.12 zu sehen. Die Werte aller gemessenen Tumorschnitte befinden sich in Tabelle 3.14.

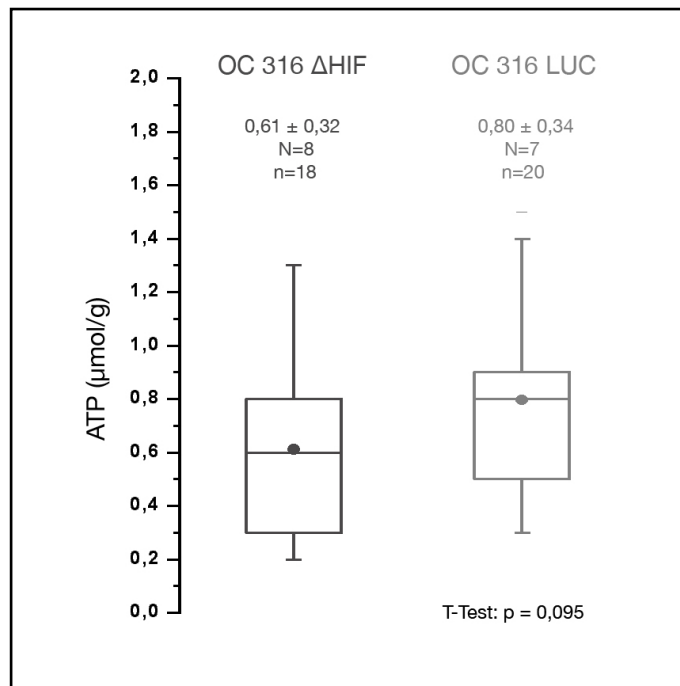


Abbildung 3.12: ATP Gehalt bei OC 316 LUC- und OC 316 ΔHIF-1α-Xenograft-Tumoren

Tabelle 3.14: ATP Werte der OC 316 LUC- und OC 316 ΔHIF-1α-Xenografts

Die gemessenen Mittelwerte beziehen sich für jeden Tumorschnitt auf die arealsspezifische Auswertung der ATP Werte in µmol/g.

Tumorschnitt	ATP (µmol/g)	Tumorschnitt	ATP (µmol/g)
OC 316 LUC #2 I	1,1	OC 316 ΔHIF-1α #1 I	0,6
OC 316 LUC #2 II	1,4	OC 316 ΔHIF-1α #1 II	0,5
OC 316 LUC #2 III	0,9	OC 316 ΔHIF-1α #1 III	0,6
OC 316 LUC #2 IV	1	OC 316 ΔHIF-1α #2 I	0,3
OC 316 LUC #3 II	1,1	OC 316 ΔHIF-1α #2 III	0,6
OC 316 LUC #3 III	1,5	OC 316 ΔHIF-1α #3 II	0,7
OC 316 LUC #5 II	0,3	OC 316 ΔHIF-1α #3 III	0,8
OC 316 LUC #5 III	0,9	OC 316 ΔHIF-1α #4 II	0,3
OC 316 LUC #5 IV	0,8	OC 316 ΔHIF-1α #4 III	0,5
OC 316 LUC #6 II	0,3	OC 316 ΔHIF-1α #5 II	0,2
OC 316 LUC #6 III	0,3	OC 316 ΔHIF-1α #5 III	0,4
OC 316 LUC #7 II	0,5	OC 316 ΔHIF-1α #7 II	1,3
OC 316 LUC #7 III	0,4	OC 316 ΔHIF-1α #7 III	1
OC 316 LUC #7 IV	0,5	OC 316 ΔHIF-1α #7 IV	1,1
OC 316 LUC #9 II	0,9	OC 316 ΔHIF-1α #9 II	0,7
OC 316 LUC #9 III	0,9	OC 316 ΔHIF-1α #9 III	0,9
OC 316 LUC #9 IV	0,9	OC 316 ΔHIF-1α #10 I	0,3
OC 316 LUC #10 I	0,6	OC 316 ΔHIF-1α #10 III	0,2

Tumorschnitt	ATP ($\mu\text{mol/g}$)	Tumorschnitt	ATP ($\mu\text{mol/g}$)
OC 316 LUC #10 III	0,8		
OC 316 LUC #10 IV	0,8		

3.4.7 Laktat Bestimmung in den transfizierten Xenografts

Auch die Laktatmessungen der beiden transfizierten Zelllinien wurden zeitlich vor den Messungen der Wildtypzelllinien und mit der Biolumineszenzkamera von Hamamatsu (C2400 Hamamatsu) durchgeführt.

Auch die Laktatwerte der transfizierten Zelllinien OC 316 LUC und OC 316 $\Delta\text{HIF-1}\alpha$ zeigten mit einem p-Wert = 0,0126 keine signifikanten Unterschiede untereinander auf. Bei OC 316 LUC wurde ein Mittelwert von $19,0 \pm 0322 \mu\text{mol/g}$ und bei OC 316 $\Delta\text{HIF-1}\alpha$ von $21,2 \pm 2,65 \mu\text{mol/g}$ gemessen.

Die grafische Darstellung der Daten ist in Abbildung 3.13 zu sehen. Die Messergebnisse der einzelnen Tumorschnitte befinden sich in Tabelle 3.15.

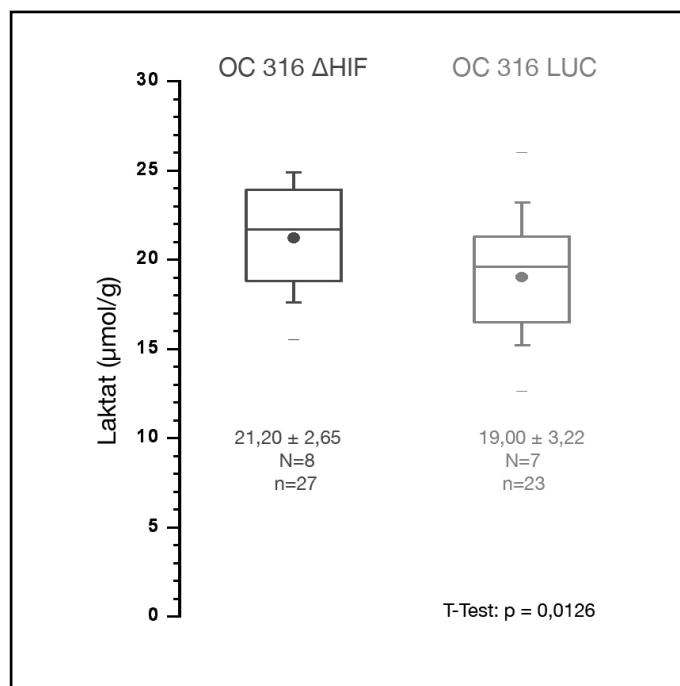


Abbildung 3.13: Laktatgehalt bei OC 316 LUC- und OC 316 $\Delta\text{HIF-1}\alpha$ -Xenograft-Tumoren

Tabelle 3.15: Laktatwerte der OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α Xenografts

Die gemessenen Mittelwerte beziehen sich für jeden Tumorschnitt auf die arealsspezifische Auswertung der Laktatwerte in $\mu\text{mol/g}$.

Tumorschnitt	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)	Tumorschnitt	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)
OC 316 LUC #2 II	26	OC 316 Δ HIF-1 α #1 I	24,4
OC 316 LUC #2 III	23,2	OC 316 Δ HIF-1 α #1 II	19,2
OC 316 LUC #2 IV	20,5	OC 316 Δ HIF-1 α #1 III	21,7
OC 316 LUC #3 II	17,3	OC 316 Δ HIF-1 α #2 I	15,5
OC 316 LUC #3 III	22,5	OC 316 Δ HIF-1 α #2 II	22
OC 316 LUC #3 IV	23,1	OC 316 Δ HIF-1 α #2 III	23,9
OC 316 LUC #5 II	12,6	OC 316 Δ HIF-1 α #2 IV	22,6
OC 316 LUC #5 III	19,6	OC 316 Δ HIF-1 α #3 II	20,9
OC 316 LUC #5 IV	16,9	OC 316 Δ HIF-1 α #3 III	17,9
OC 316 LUC #6 II	16,5	OC 316 Δ HIF-1 α #3 IV	18,8
OC 316 LUC #6 III	15,9	OC 316 Δ HIF-1 α #4 II	18,6
OC 316 LUC #6 IV	19,7	OC 316 Δ HIF-1 α #4 III	22,3
OC 316 LUC #7 I	17,7	OC 316 Δ HIF-1 α #4 IV	24,9
OC 316 LUC #7 II	21,3	OC 316 Δ HIF-1 α #5 I	20,3
OC 316 LUC #7 III	16,6	OC 316 Δ HIF-1 α #5 II	24,9
OC 316 LUC #7 IV	16,1	OC 316 Δ HIF-1 α #5 III	19,2
OC 316 LUC #9 II	15,2	OC 316 Δ HIF-1 α #5 IV	23,4
OC 316 LUC #9 III	15,6	OC 316 Δ HIF-1 α #7 II	17,9
OC 316 LUC #9 IV	17,2	OC 316 Δ HIF-1 α #7 III	21,8
OC 316 LUC #10 I	21,4	OC 316 Δ HIF-1 α #7 IV	18,7
OC 316 LUC #10 II	20,3	OC 316 Δ HIF-1 α #9 II	20
OC 316 LUC #10 III	21,3	OC 316 Δ HIF-1 α #9 III	23,2
OC 316 LUC #10 IV	20,6	OC 316 Δ HIF-1 α #9 IV	24,2
		OC 316 Δ HIF-1 α #10 I	20,2
		OC 316 Δ HIF-1 α #10 II	17,6
		OC 316 Δ HIF-1 α #10 III	23,9
		OC 316 Δ HIF-1 α #10 IV	24,4

3.4.8 Falschfarbenkalibrierung

Die Abbildungen 3.14 und 3.15 veranschaulichen die Falschfarbenkalibrierung und die strukturbezogene regionale Auswertung. Bei dem Tumorschnitt der Zelllinie IGROV1 in Abbildung 3.14 ist zu erkennen, wie der rundlich wirkende Tumor in das Bindegewebe der Maus eingebettet wurde. In der oberen Hemisphäre des Tumors, übergehend in die ausladenden bindegewebigen Strukturen, ist sichtbar, wie nahezu der gesamte Schnitt von der Haut der Maus umgeben zu sein scheint. Im Zentrum des Tumors befindet sich ein etwa $1 \times 1,5$ mm großes nekrotisches Areal. Solche Zentralnekrosen, wie sie ab einer bestimmten

Tumorgröße gelegentlich zu beobachten sind, werden von dem auszuwertenden Areal subtrahiert. Auch in dem Falschfarbenbild der ATP Messung ist zu erkennen, dass sich im Bereich der Zentralnekrose kein bzw. nur sehr wenig ATP befindet. Außerhalb des vitalen Tumorgewebes sind bei dem IGROV1 Tumorschnitt sehr geringe ATP Mengen nachweisbar. Bei OC 316 ist zu sehen, dass sich im Tumorzentrum mehr ATP nachweisen lässt als im Randbereich des Tumors. Am rechten Bildrand in direkter Nähe zum Tumorgewebe wurde ein Muskel der Maus angeschnitten. Wie an dem großen rot markierten Bereich zu erkennen ist, sind sehr große Mengen ATP in diesem Bereich nachweisbar, wie sie für Skelettmuskelzellen typisch sind.

Bei der Laktatverteilung fällt bei beiden Tumorschnitten auf, dass sich das Laktat eher homogen über den Tumor verteilt. Im Zentrum des Tumors sind allerdings höhere Werte nachweisbar, die in Randnähe geringer werden. Der nekrotische Bereich ist bei IGROV1 in der Laktatmessung nicht gut abzugrenzen.

Bei der Glukoseverteilung bietet sich ein sehr ähnliches Bild. Hohe Glukosewerte wurden im Zentrum des Tumors ermittelt mit abfallendem Glukosegehalt in Randnähe des Tumorgewebes. Bei der Glukosemessung ist allerdings der nekrotische Bereich im IGROV1 Tumorschnitt sehr gut abgrenzbar. Hier sind die Glukosewerte deutlich geringer.

Pyruvat zeigt bei beiden Zelllinien ein relativ homogenes Verteilungsmuster im ganzen Bereich des vitalen Tumorgewebes. Generell sind bei beiden Tumoren nur sehr geringe Mengen an Pyruvat nachweisbar (Abbildung 3.14).

Analog zu der Darstellung der Tumoren der Wildtypzelllinien befindet sich in Abbildung 3.15 die Darstellung der beiden transfizierten Zelllinien OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α .

Bei den beiden HE-Färbungen der Tumoren von OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α ist ebenfalls die Einbettung in die bindegewebigen Strukturen der Maus zu erkennen. Da diese Tumore bei der Entnahme noch sehr klein waren, sind keine Zentralnekrosen nachweisbar. In der HE-Färbung des OC 316 Δ HIF-1 α Tumorschnittes ist am Rand des vitalen Tumorgewebes ein kleines nekrotisches Areal zu finden.

Bei den beiden Bildern der ATP-Messung ist sehr schön zu erkennen, wie der ATP-Gehalt zum Zentrum des Tumors stetig zunimmt. Generell war der ATP Gehalt bei diesen Messungen, wie unter Abschnitt 3.4.6 beschrieben, eher gering.

Bei der Laktatverteilung in OC 316 LUC- und OC 316 Δ HIF-1 α -Tumoren (Abbildung 3.15) ist ein ähnliches Bild wie bei den Wildtypzelllinien zu erkennen. Es zeigt sich eine zentral gelegene Anreicherung von Laktat mit zum Rand des Tumors geringer werdendem Laktatgehalt.

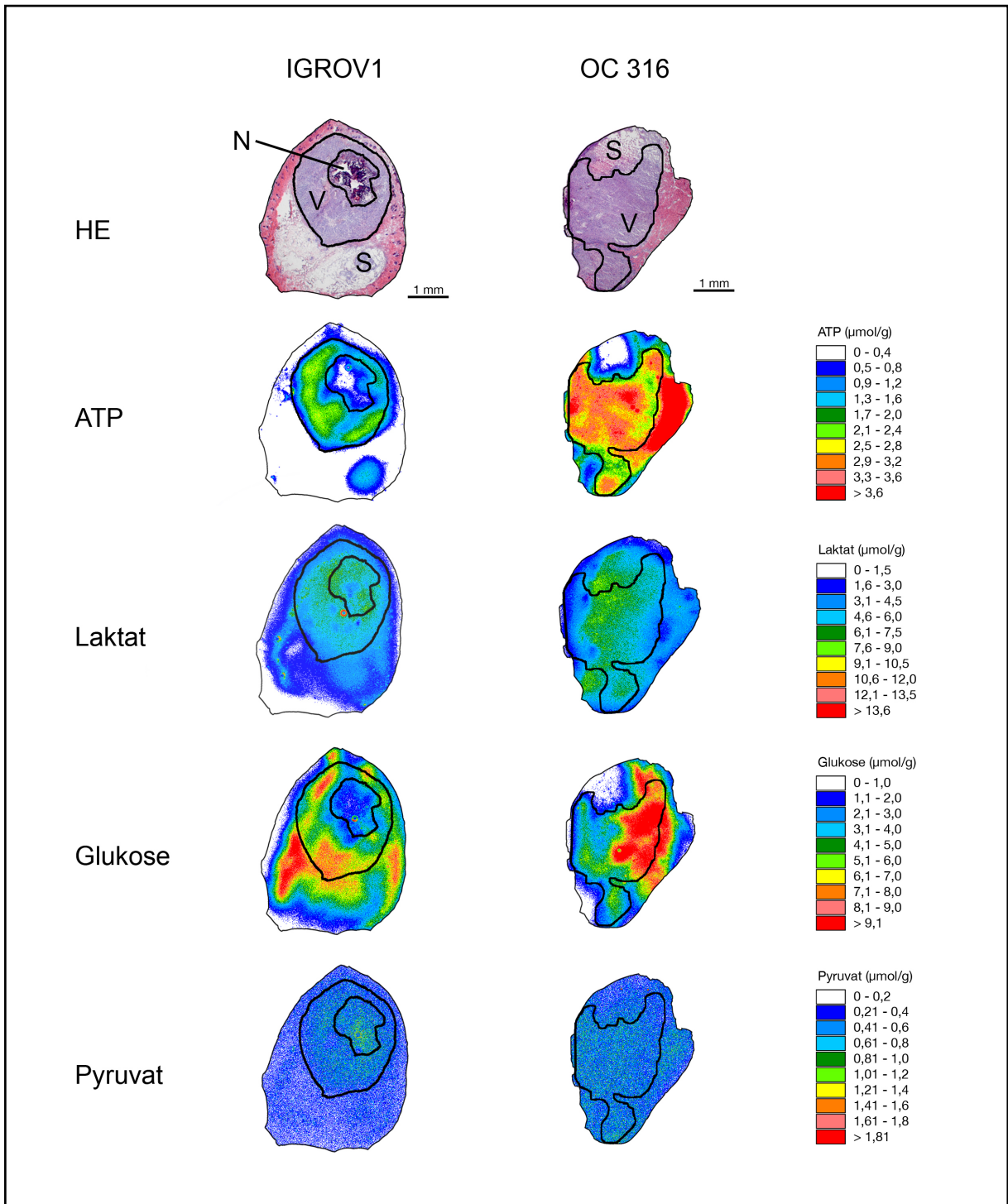


Abbildung 3.14: Falschfarbenkalibrierungen ausgewählter Tumore der Zelllinien IGROV1 und OC 316

In der Grafik befinden sich Falschfarbenkartierungen für beide Wildtypzelllinien für die Metabolite ATP, Laktat, Glukose und Pyruvat. Für beide Zelllinien ist ein Schnitt ein eine HE-Färbung dargestellt. Legende: S: Stroma (Gewebe der Maus), N: Nekrose und V: vitales Tumorgewebe. Die Mithilfe der HE-Färbung und des Biolumineszenzbilds der ATP Messung erstellte Maske wurde auf die Biolumineszenzbilder von Laktat, Glukose und Pyruvat übertragen und angepasst. Auf der rechten Seite befinden sich die Farbkodierungen für die jeweiligen Metabolite.

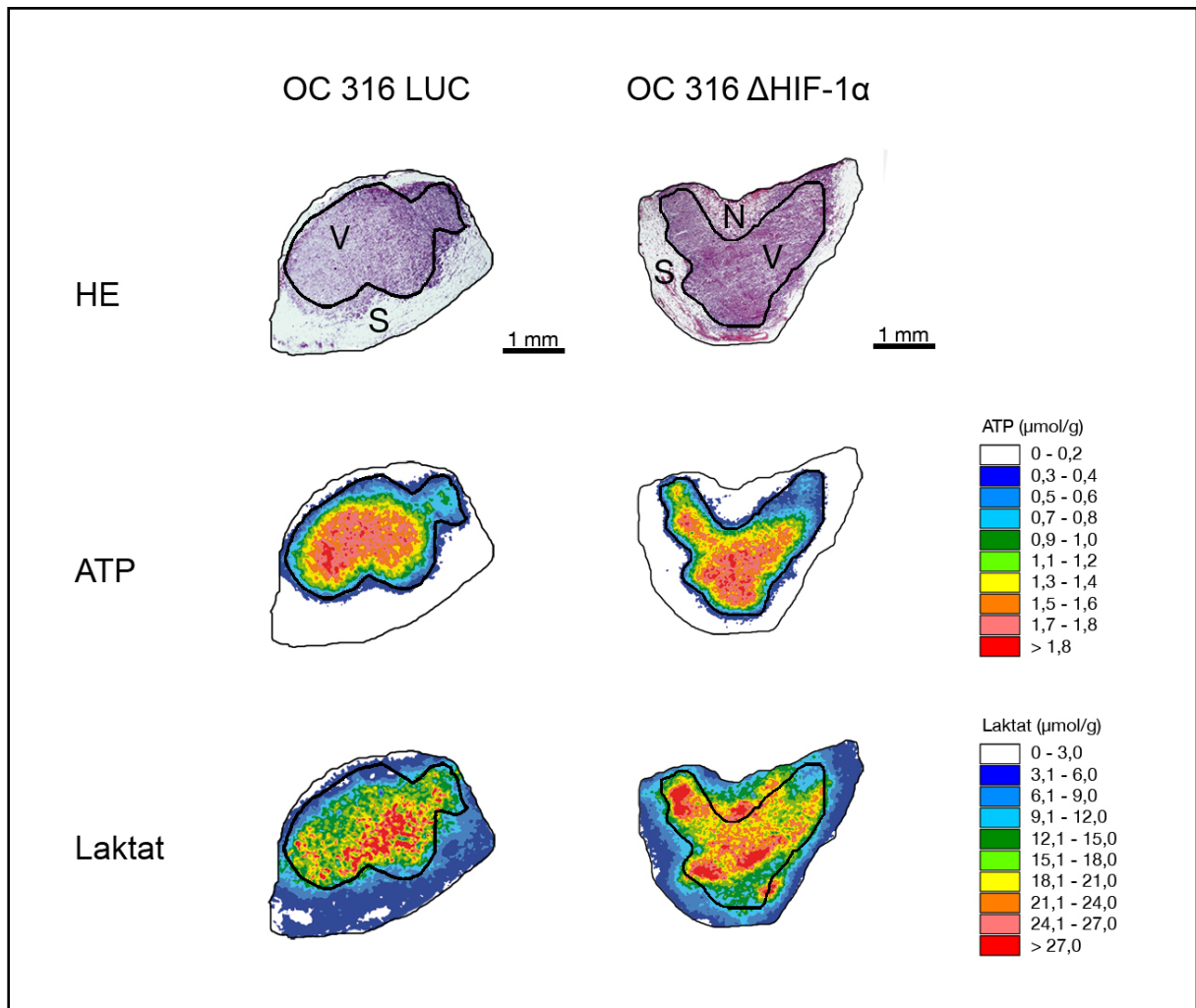


Abbildung 3.15: Falschfarbenkalibrierungen ausgewählter Tumore der Zelllinien OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α

In der Grafik befinden sich Falschfarbenkartierungen für beide transfizierten Zelllinien für die Metabolite ATP, und Laktat. Für beide Zelllinien ist ein Schnitt ein eine HE-Färbung dargestellt.

Legende: S: Stroma (Gewebe der Maus), N: Nekrose und V: vitales Tumorgewebe. Die mithilfe der HE-Färbung und des Biolumineszenzbilds der ATP Messung erstellte Maske wurde auf das Biolumineszenzbild von Laktat übertragen und angepasst. Auf der rechten Seite befinden sich die Farbkodierungen für die jeweiligen Metabolite (Favaro *et al.*, 2008).

4 Diskussion

Ovarialkarzinome verlaufen in den meisten Fällen über einen langen Zeitraum symptomlos. Im Gegensatz zu Brust- oder Darmkrebs gibt es für den Eierstockkrebs keine speziellen Früherkennungsuntersuchungen. Aus diesen Gründen werden Ovarialkarzinome in 70 % der Fälle erst im Stadium III oder IV diagnostiziert. Die Standardtherapie besteht dann in einer operativen Entfernung des Primärtumors mit anschließender Chemotherapie. Aufgrund der, in den meisten Fällen, weit fortgeschrittenen Erkrankung, besteht eine sehr schlechte Prognose für diese Tumorentität (Roett & Evans, 2009). Des Weiteren ist die Ansprechrate auf Hormon- und Radiotherapie sehr gering. Um für die erkrankten Patientinnen eine bessere Prognose zu erreichen, müssen neue Therapieansätze entwickelt werden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Erforschung des Glukosemetabolismus von Ovarialkarzinomen und der speziellen Bedeutung des HIF-1 α Proteinkomplexes unter Normoxie. In dem folgenden Kapitel sollen die Durchführung und Aussagekraft der Methoden und die gewonnenen Ergebnisse diskutiert und in Bezug zu Literaturdaten gesetzt werden. Abschließend soll ein Ausblick auf die Möglichkeit neuer Therapieansätze und die Rolle des Glukosemetabolismus gegeben werden.

4.1 Diskussion der Methoden

Für diese Arbeit wurden Daten aus Experimenten in Monolayer-Zellkultur und der bildgebenden Biolumineszenz erhoben. Aus dieser Tatsache ergibt sich ein breites Methodenspektrum.

Die Experimente mit Zellkulturen wurden zu einem großen Teil mithilfe von lange etablierten Methoden bzw. kommerziellen Messkits durchgeführt. Einer genaueren retrospektiven Betrachtung bedarf es bei dem In-Cell-Western für den HIF-1 α Proteinkomplex, dessen Etablierung Teil der Arbeit war.

Bei der bildgebenden Biolumineszenz handelt es sich um ein in unserem Labor entwickeltes, sehr gut etabliertes Messverfahren, das jedoch bisher noch keine große Verbreitung gefunden hat. Dies liegt zum einen an dem sehr hohen Aufwand zur Durchführung und zum anderen an den relativ hohen Kosten für die Experimente. In den vorliegenden Versuchen wurden zwei verschiedene Biolumineszenzkameras verwendet, welche mit einem unterschiedlichen Verfahren zur Erzeugung des Biolumineszenzbilds arbeiten. Des Weiteren ist die Biolumineszenzkamera von Hamamatsu (C2400 Hamamatsu), im Gegensatz zu der Kamera der Firma Andor (AndorTM iXon^{EM+}), mit Verschleißkomponenten ausgestattet, welche die Messsensitivität stark herabsetzen können. Weiter sind die für die Messungen benötigten chemischen Reaktionen enorm licht- und temperaturempfindlich.

4.1.1 Methoden der Zellkultur

Bei der Kultivierung der Zellen wurde auf Standardmethoden der Monolayer-Zellkultur zurückgegriffen. Hierbei sind jedoch einige Besonderheiten hervorzuheben. Die beiden transfizierten Zelllinien OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α wurden mit 0,5 μ g/ml Puromycin im Zellkulturmedium kultiviert, um eine Selektion aller Zellen ohne Vektor zu erreichen (siehe 2.1.2). Bei der Auswahl des Nährmediums wurde weitgehend den Empfehlungen der Erstbeschreiber der jeweiligen Zelllinien folgegeleistet, mit der Ausnahme, dass keinerlei Antibiotika und Antimykotika verwendet wurden (Alama *et al.*, 1996); (Benard *et al.*, 1985). Auf diese Zusätze wurde verzichtet, um Resistenzbildungen der Bakterien zu vermeiden. Während der Versuchsphase sind Kontaminierungen mit Bakterien nur äußerst selten aufgetreten. In einem solchen Fall wurden alle befallenen Kulturflaschen vernichtet. Kontaminierungen mit Pilzen wurden niemals festgestellt. Die Bekämpfung von Mykoplasmen wird in Abschnitt 4.2.5 behandelt. Des Weiteren hat es sich bei den verwendeten Zelllinien als essentiell erwiesen, eine Zentrifugation zur Entfernung von Trypsinresten durchzuführen, da alle Zelllinien sehr empfindlich auf solche Reste im Nährmedium reagierten.

4.1.2 Methoden zur Quantifizierung des Zellwachstums

Das grundlegende Problem bei einer Analyse des Zellwachstums in Monolayer-Zellkultur besteht darin, dass es nicht möglich ist, die Zellteilung und Vermehrung der Zellen unter den gleichen Bedingungen zu untersuchen, in denen die Zellen bei anderen Versuchen kultiviert werden. Da z. B. bei den Metabolitmessungen die Zellen in anderen, meist höheren, Zellzahlen passagiert werden, besteht die Möglichkeit, dass die Zellen initial ein anderes Wachstumsverhalten zeigen. Weiter werden die Zellen in anderen Zellkulturgefäßen mit anderen Medienkonzentrationen kultiviert, woraus die Möglichkeit resultiert, dass die Diffusionsstrecke zwischen Luftschicht und Zellebene unterschiedliche Ausmaße annimmt.

Außerdem sind sehr unterschiedliche Methoden für die Quantifizierung des Zellwachstums etabliert. Zum einen besteht die Möglichkeit eine Zellzählung mithilfe einer photometrischen Bestimmung in einer 96 Well-Zellkulturplatte durchzuführen (Wang *et al.*, 2007). Eine andere und weiter verbreitete Methode ist die direkte Zellzählung durch manuelle oder maschinelle Messung, nachdem die Zellen abgelöst und vereinzelt wurden. Dies kann in Zellkulturflaschen (Maubant *et al.*, 2002), oder auch unter Verwendung von zellkulturfähigen Well-Platten geschehen (Hu *et al.*, 2009). Bei dieser Arbeit wurden zellkulturgeeignete 24-Well-Platten verwendet. Die Versuchsbedingungen wurden den Bedingungen unter Standardkultivierung so gut wie möglich nachempfunden.

4.1.3 Methoden zur Metabolitbestimmung in Monolayer-Zellkultur

Die Zellen werden mit den beschriebenen Modifikationen in Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer 70-80 %igen Konfluenz kultiviert. Wie auch bei den Wachstumsanalysen besteht bei den Metabolitbestimmungen die Möglichkeit einer Beeinflussung der Ergebnisse durch die Wahl des Kulturgefäßes. Da bei Metabolitbestimmungen, im Gegensatz zu Wachstumsanalysen, eine wesentlich geringere Anzahl an Kulturgefäßen benötigt wird, besteht hier die Möglichkeit, Zellkulturflaschen anstelle von Well-Platten zu benutzen. Diese Methode bringt bei der Zellernte zwar einen etwas größeren Aufwand mit sich, besitzt allerdings den Vorteil, dass die Zellen während der Messphase den gleichen Bedingungen unterliegen wie bei ihrer täglichen Inkubation. Somit kann gewährleistet werden, dass die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung während einer Metabolitbestimmung und der täglichen Inkubation gleich sind.

Bei der Zellernte wird großer Wert auf einen standardisierten Arbeitsablauf gelegt. Da durch die Probengewinnung und das Ablösen vom Boden des Kulturgefäßes die Zellen zusätzlichem Stress ausgesetzt sind, was eine potentielle Verfälschung der Ergebnisse mit sich bringen könnte, werden alle Kulturflaschen genau nach denselben Regeln und nach einem festgelegten Algorithmus behandelt. Hiermit wird garantiert, dass alle Versuche in unterschiedlichen Passagen, aber auch die Zelllinien untereinander vergleichbar sind.

Da für die photometrischen Messungen der Medienüberstände kommerzielle Messkits verwendet werden, kann hierdurch eine weitere Fehlerquelle, die durch eventuelle Unregelmäßigkeiten beim Ansetzen der Reaktionsmedien entstehen könnte, ausgeschlossen werden. Des Weiteren wird durch Standard- bzw. Referenzmessungen eine Reihe systematischer Fehler ausgeschlossen.

Durch Mehrfachmessungen, suffiziente Eliminierung von Fehlerquellen und die Analyse von statistischen Mittelwerten werden die Daten der unterschiedlichen Zelllinien miteinander vergleichbar.

4.1.4 In-Cell-Western

Beim In-Cell-Western handelt es sich um ein Verfahren zur quantitativen Expressionsanalyse von Proteinen. In dieser Arbeit wurde das Verfahren ausschließlich zu quantitativen Analysen von HIF-1 α benutzt. Das Verfahren vereint Methoden aus der immunhistologischen Färbung und des Western Blots. Die Zellen werden in zellkulturfähigen 96 Well-Platten ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach Fixation und Permeabilisation der Zellen erfolgten die bereits beschriebenen Färbereaktionen mit Primär-, Sekundärantikörper und schließlich der Zugabe des Färbesubstrats TMB (Tetramethylbenzidin). Im Gegensatz zu DAB (Diaminobenzidin), welches bei immunhistologischen Färbungen als Färbesubstrat verwendet wird, besitzt TMB eine höhere Löslichkeit, womit ein photometrischer Nachweis ermöglicht wird. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wird, ähnlich wie bei

einer Western Blot Untersuchung, eine Normierung der Proteinexpression auf ein Haushaltsprotein vorgenommen. Die Proteinexpression von HIF-1 α wurde mit der Proteinexpression von α -Tubulin verglichen, um eine Aussage über die quantitative Expression treffen zu können (Kötz, 2009).

Die Vorteile des Verfahrens liegen in der Durchführbarkeit einer hohen Anzahl von Proben auf einer einzigen 96 Well-Platte. Somit besteht die Möglichkeit mehrere Zelllinien und die Expression verschiedener Proteine in einem einzigen Versuch zu bestimmen. Das Verfahren zeigte eine enorm hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse für etliche Proteine.

Da es sich bei HIF-1 α um ein unter Hypoxie exprimiertes Protein handelt, welches unter Normoxie sehr schwer nachzuweisen ist, stellt dies ein Problem im Nachweis dieses Moleküls dar. Um eine Überexpression von HIF-1 α zu erzielen, müssen die Zellen einer hypoxischen Umgebung ausgesetzt werden (Weidemann & Johnson, 2008). Hier existieren verschiedene Möglichkeiten diesen Zustand zu erreichen. Zum einen kann mithilfe einer Hypoxiekammer eine Inkubation der Zellen in einer sauerstoffarmen Umgebung realisiert werden. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Zusammensetzung der Inkubationsatmosphäre sehr genau gesteuert und verändert werden kann. Der Nachteil besteht in dem höheren Aufwand und den höheren Kosten der Methode. Eine andere Möglichkeit besteht in der Erzeugung einer chemischen Hypoxie. Diese Methode wurde bei der Durchführung der Experimente bevorzugt und mithilfe der Zugabe von Cobaldchlorid (CoCl_2) zum Nährmedium realisiert. Die einfache Durchführbarkeit und die niedrigen Kosten zählen zu den Vorteilen der Methode. Allerdings besteht die einzige Möglichkeit der Intervention bei der Inkubationszeit und der Konzentration des Cobaldchlorids. Jegliche andere Beeinflussung und genaue Steuerung, beziehungsweise Messung der Hypoxie entfällt.

4.1.5 Methode der Biolumineszenz

Die Methode der Biolumineszenz ist eine seit über zwanzig Jahren etablierte Methode der ortsbezogenen Metabolitbestimmung innerhalb von solidem Gewebe, wie z. B. Biopsien, Xenotransplantaten oder Sphäroiden. Die Etablierung der Methode stammt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Müller-Klieser (Mueller-Klieser & Walenta, 1993) und wurde innerhalb der Arbeitsgruppe ständig weiterentwickelt (Walenta *et al.*, 1994); (Sattler *et al.*, 2007).

Der große Vorteil dieser Methode besteht neben der quantitativen Methabolitbestimmung in der ortskorrelierten Auswertung der Metabolitkonzentrationen. Dadurch kann eine Aussage über Konzentrationen verschiedener Metabolite in Bezug zueinander und in Bezug auf Strukturen des zu untersuchenden Gewebes, wie z. B. Bindegewebe, Muskel oder Nekrose in Tumorgeweben, getroffen werden. Des Weiteren können Messungen der Metabolitkonzentration mit sehr hoher Nachweisempfindlichkeit durchgeführt werden.

Ein Nachteil der Methode besteht in dem erhöhten Aufwand zur Versuchsvorbereitung und einem enormen Aufwand bei der Auswertung der Daten.

Allerdings gibt es kein anderes Verfahren, welches in der Lage ist, in ähnlicher Genauigkeit und Präzision die Metabolitverteilung in oft nur wenigen Millimeter großen Gewebestücken zu visualisieren.

Wie aus der Beschreibung des Versuchsaufbaus aus dem Abschnitt 2.4 zu erkennen ist, handelt es sich um ein kompliziertes Messverfahren bei dem komplexe chemische Reaktionen benutzt werden. Eine hohe Komplexität erhöht die Fehleranfälligkeit eines Versuchsaufbaus. Aus diesem Grund ist es von größter Bedeutung, dass bei diesem Messverfahren keinerlei Abweichungen vom Versuchsprotokoll erfolgen. Als Beispiel ist hier die Thermoinstabilität der Reaktionsgleichungen (Abschnitt 2.4.5) zu nennen. Um einen reibungslosen Ablauf der Versuche zu gewährleisten, muss die Temperatur bei Lagerung der Proben, die Raumtemperatur und die Temperatur während der Messung konstant gehalten werden. Da es sich bei der Messung selbst um eine Photonendetektion handelt, versteht es sich von selbst, dass jeder Lichteinfall die Messung verfälschen würde. Aus diesem Grund befindet sich die komplette Messvorrichtung in einer absolut lichtdichten Dunkelkammer. (Abschnitt 2.4.7)

Bei den Messungen in transfizierten Xenotransplantaten und Wildtyp Xenotransplantaten wurden unterschiedliche Kamerasysteme verwendet. Da sich die verwendeten Kamerasysteme bei Messtechnik und Auflösung teilweise stark unterscheiden, sollten trotz Kalibrierung, vor allem, wegen der stark unterschiedlichen Sensitivität beider Systeme die Ergebnisse aus beiden Messreihen nicht miteinander verglichen werden. Die Aussagekraft der Ergebnisse, welche mit jeweils einem der beiden Systeme erhoben wurden, sind ohne Einschränkung vergleichbar und aussagekräftig.

Um eine spätere Zuordnung der gemessenen Metabolitkonzentrationen zu unterschiedlichen Geweben (z. B. vitales Tumorgewebe, Nekrosen, oder Gewebe des Wirtstieres) innerhalb Tumorschnittes zu ermöglichen, müssen Biolumineszenzbilder mit HE-Bildern von Parallelschnitten mithilfe von Bildbearbeitungssoftware überlagert werden. Bei besonderen Fragestellungen zur Abgrenzung zwischen Tumorgewebe und Gewebe des Wirtstieres werden immunhistologisch gefärbte Parallelschnitte, mithilfe einer CK-Färbung (Cytokeratin), verwendet (Quennet, 2007). Da eine computergestützte Auswertung und Zuordnung der verschiedenen Gewebearten derzeit nicht möglich ist, muss die Zuordnung des auszuwertenden Bereichs manuell durchgeführt werden. Da in diesem Abschnitt der Auswertung eine subjektive Entscheidung über die Ausmaße der Region Of Interest (ROI) zu treffen ist, unterliegt dieser Bereich einer geringfügigen Fehlerquelle.

4.1.6 Diskussion der Mykoplasmen-PCR

Mit Mykoplasmen kontaminierte Zellkulturen stellen ein seit langer Zeit bekanntes Problem dar (Robinson & Wichelhausen, 1956).

Aktuelle Studien gehen davon aus, dass in Europa 25 - 37 % aller Zelllinien, die sich im Umlauf befinden, eine Kontamination mit Mykoplasmen aufweisen. Außerhalb von Europa wurden bereits weit höhere Kontaminationsraten von bis zu 65 % in Argentinien und bis zu 80 % in Japan gemessen. Ein weiteres Problem besteht darin, dass in vielen Laboratorien gar nicht auf Mykoplasmenkontamination getestet wird (Ryan, 2008).

Das größte Problem bei einer Kontamination mit Mykoplasmen ist, dass genaue Vorhersagen, welchen Effekt diese Kontamination auf die Zelllinie hat, nicht vorhergesehen werden kann. Bekannt ist, dass Mykoplasmen den Zellzyklus, das Wachstum der Zellen und den Metabolismus beeinflussen können. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine andauernde Kontamination zu irreversiblen Schäden an den Zellen führt, wie z. B. eine Chromosomenaberration. Um einen genauen Überblick über das Ausmaß der Kontamination innerhalb eines Labors zu erhalten, sollten alle Zelllinien regelmäßigen Tests unterzogen werden. Ein Grund für das Fortschreiten von Kontaminationen wird unter anderem im routinemäßigen Gebrauch von Antibiotika in den Zellkulturen angesehen (Lincoln & Gabridge, 1998).

Alle vier verwendeten Zelllinien wurden vor Beginn der Versuche positiv auf Mykoplasmen getestet. Eine mehrfach durchgeführte Eradikationstherapie mit MycoKill AB (PAA) führte jeweils zu einer Unterdrückung der Mykoplasmen unter die Nachweisgrenze. Nach mehreren Passagen waren allerdings wieder Mykoplasmen mittels PCR-Analyse nachweisbar. Da es nicht möglich war die verwendeten Zelllinien, worunter vor allem die beiden transfizierten Zelllinien OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α fielen, als Mykoplasmen freie Variante zu erhalten und auch alle Xenotransplantate mit diesen Zellen in einem kooperierenden Laboratorium hergestellt wurden, wurden alle Versuche mit den residuale Zelllinien durchgeführt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die vorhandene Kontamination mit Mykoplasmen nicht mit 100 %iger Sicherheit ausgeschlossen werden kann (Rottem & Barile, 1993).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es einen Überblick über den Glukosestoffwechsel zweier Ovarialkarzinomzelllinien zu erhalten, das Bedeutungsausmaß des HIF-1 α Proteinkomplexes genauer beurteilen zu können und eine Aussage der Übertragbarkeit der Daten auf ein solides Tumormodell treffen zu können. Abbildung 4.1 zeigt eine Übersicht der Bedeutung von HIF-1 α für das biologische und klinische Verhalten maligner Tumore.

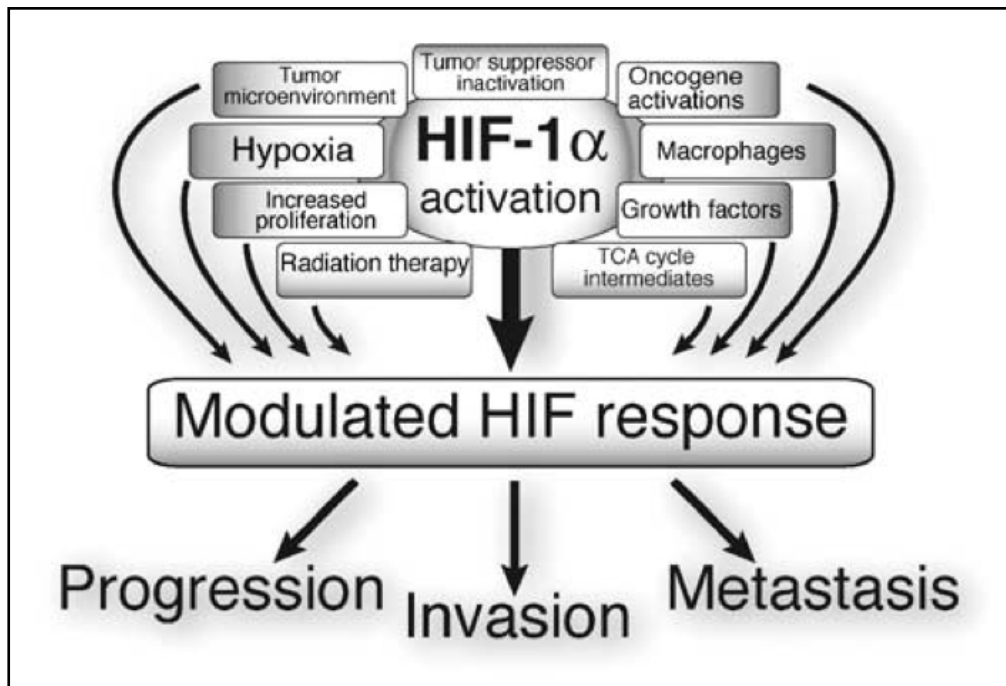


Abbildung 4.1: Bedeutung von HIF-1 α im Tumorgewebe

Im Tumorgewebe wird HIF-1 α durch verschiedene Stimuli aktiviert: Lokale Hypoxie steigert die Proliferationsbereitschaft, Tumorsuppressorgene können unterdrückt, Onkogene und Wachstumsfaktoren gefördert werden. Zusammen mit anderen Zellen, wie z. B. Makrophagen werden durch die genannten Faktoren wiederum die Reaktionen von HIF-1 α beeinflusst. Diese komplexen Interaktionen beeinflussen das Verhalten des Tumors in Hinsicht auf Wachstum, Invasion und Metastasierung. Aus: (Weidemann & Johnson, 2008)

4.2.1 Wachstumskurven

Die durchgeführten Analysen zeigen deutliche Unterschiede der verwendeten Zelllinien in ihrem Wachstumsverhalten. Hierbei sind die Kurvenverläufe der einzelnen Wachstumskurven wesentlich aufschlussreicher als die daraus ermittelten Verdopplungsraten der Zellen (Abbildung 4.1).

Im Vergleich zwischen der niedrig-glykolytischen Zelllinie IGROV1 und der hoch-glykolytischen Zelllinie OC 316 fällt neben der deutlichen geringeren Verdopplungszeit von IGROV1 (16,5 h) gegenüber OC 316 (25,3 h) eine signifikant kürzere exponentielle Wachstumsphase auf. IGROV1 zeigt im exponentiellen Wachstum zwar eine deutlich kürzere Verdopplungszeit als OC 316 auf, geht dann allerdings trotz unvollständiger Konfluenz des Zellrasens und ausreichendem Angebot an Nährstoffen sehr früh in ein reduziertes, jedoch persistierendes Wachstum über. OC 316 dagegen zeigt ein exponentielles Wachstum bis zu einer 100 % igen Konfluenz des Zellrasens mit anschließendem Wachstumsstopp. Die Analysen der beiden Zelllinien haben auch gezeigt, dass IGROV1 trotz 100 %iger Konfluenz des Zellrasens weiter kontinuierlich wächst, wogegen bei OC 316 ein Platz und Nährstoffmangel deutlichen Einfluss auf das weitere Wachstumsverhalten zeigt. Sobald OC 316 eine 100 %ige Konflu-

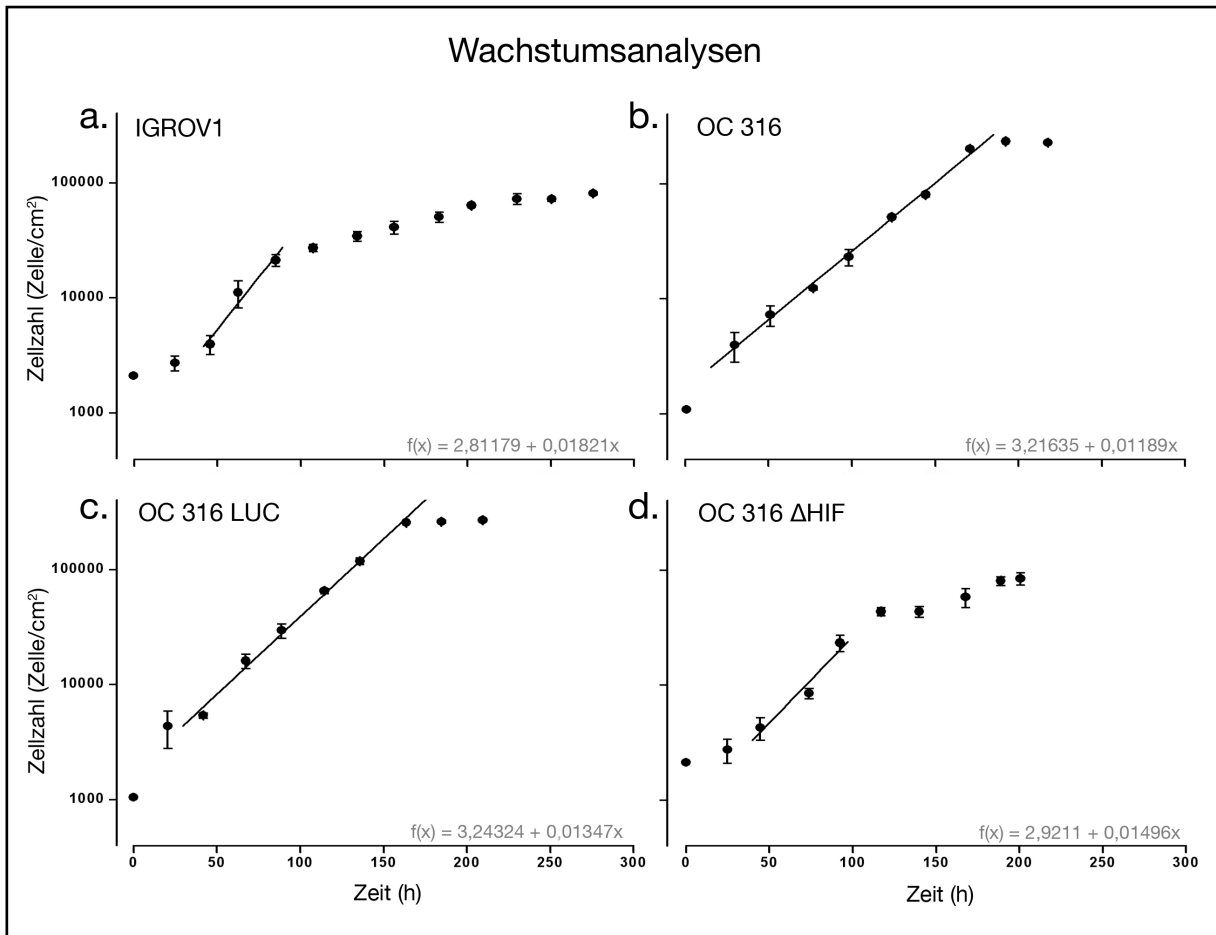


Abbildung 4.2: Wachstumskurven

Die Abbildung zeigt repräsentative Wachstumskurven der Zelllinien IGROV1 (a.), OC 316 (b.), OC 316 LUC (c.) und OC 316 Δ HIF-1 α (d.) in halblogarithmischer Darstellung. Es wurde die Zellzahl/cm² gegen die Wachstumsdauer in Stunden (h) aufgetragen. In jeder Grafik ist die Steigungsgerade im exponentiellen Wachstum mit der dazugehörigen Geradengleichung dargestellt.

enz erreicht hat, ist ein Rückgang der Zellzahlen zu beobachten. Dies zeigt die Unempfindlichkeit von niedrig-glykolytischen Zellen gegenüber ungünstigen Wachstumsbedingungen wie z. B. ein geringeres Angebot an Nährstoffen. Die Zellen von IGROV1 zeigen zwar ein über einen längeren Zeitraum beobachtetes langsames Wachstum, erweisen sich darüber hinaus aber als wesentlich robuster. Diese Eigenschaften der beiden Zelllinien könnten auf der einen Seite eine therapeutische Angriffsstelle in der Tumorthérapie hoch-glykolytischer Tumoren darstellen (Scatena *et al.*, 2008), auf der anderen Seite allerdings bei Tumoren mit niedriger glykolytischer Aktivität eine Verschlechterung der Prognose bedeuten (Vaupel *et al.*, 2004).

Nun stellt sich die Frage nach der Bedeutung von HIF-1 α in Bezug auf die hohe glykolytische Aktivität von OC 316. Wenn man sich den Verlauf der Wachstumskurven von OC 316 und OC 316 LUC im Vergleich ansieht, erkennt man, dass der Verlauf beider Kurven sehr ähnlich ist. Dies zeigt, dass die Transfektion der Zelllinie OC 316 mit dem Leervektor LUC eine nur sehr geringe Auswirkung auf das Wachstumsverhalten verursacht hat. Die etwas

veränderte Wachstumsgeschwindigkeit könnte auf die notwendige Behandlung der Zellen mit Puromycin zurückzuführen sein. Da alle transfizierten Zellen durch den Kontrollvektor eine Puromycinresistenz besitzen, werden solche Zellen, die einen Verlust des Vektors erleiden, eliminiert. Da durch die Elimination dieser Zellen ein erhöhtes Platz- und Nährstoffangebot für die verbleibenden Zellen herrscht, könnte hierdurch die etwas schnellere Verdopplungszeit begründet werden. Hiermit können alle Effekte bezüglich des Wachstumsverhaltens von OC 316 Δ HIF-1 α gegenüber OC 316 und OC 316 LUC auf die Herunterregulierung des HIF-1 α Proteinkomplexes zurückgeführt werden.

Wenn man den Verlauf der Wachstumskurve von OC 316 Δ HIF-1 α -Zellen in Relation zu den Verläufen bei OC 316- und OC 316 LUC-Zellen analysiert, fällt auf, dass es bei OC 316 Δ HIF-1 α kein so starkes exponentielles Wachstum gibt, wie dies bei den anderen beiden Zelllinien der Fall ist. Es stellt sich sogar als besonders schwer heraus, die exponentielle Wachstumsphase genau zu bestimmen, da das Wachstumsverhalten von OC 316 Δ HIF-1 α -Zellen sehr starken Diskontinuitäten unterliegt. Solche signifikanten Effekte einer Beeinflussung des HIF-1 α Proteinkomplexes sind nur bei der hoch-glykolytischen Zelllinie OC 316 und nicht bei IGROV1 aufgefallen (Favaro *et al.*, 2008). Erstaunlich hierbei ist, dass durch die Herunterregulierung von HIF-1 α bei OC 316-Zellen der Verlauf der Wachstumskurve dem der niedrig-glykolytischen Zelllinie IGROV1 sehr ähnelt.

Man kann also abschließend feststellen, dass in Bezug auf das Wachstumsverhalten von Tumorzellen einer hoch-glykolytischen Zelllinie die Herunterregulierung von HIF-1 α das Wachstum der Zellen deutlich verlangsamt. Somit wird in Bezug auf das Wachstumsverhalten von Tumoren die Berechtigung von HIF-1 α als therapeutisches Ziel einer pharmakologischen Tumortherapie untermauert (Semenza, 2002) (Semenza, 2009).

4.2.2.1 Laktatproduktion *in vitro*

Zur Beurteilung der Laktatproduktion aller Zelllinien *in vitro* wurden die Laktatkonzentrationen im Zellkulturmedium über den Zeitverlauf der Inkubation bestimmt. Damit kann eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Laktatabgabe von den Zellen an das Nährmedium getroffen werden. Des Weiteren kann mithilfe der gewonnenen Daten eine Produktionsrate, d. h. die Laktatproduktion pro Zeiteinheit, ermittelt werden. Da bei Gewinnung der Proben die Zellzahl und das durchschnittliche Zellvolumen in einzelnen Zellkulturflaschen bestimmt wird, kann eine Aussage über den Laktatgehalt pro Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt (pmol/Zelle) getroffen werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Umrechnung auf das Zellvolumen (mol/l). Aus diesen Daten werden dann die Laktatproduktionsraten errechnet (pmol/Zelle/h und mol/l/h). Diese Normierung ist u. a. für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen unterschiedlicher Untersucher wichtig. Leider wird dies nicht selten bei Publikationen auch in international begutachteten Zeitschriften missachtet.

Wenn man nun die Laktatproduktion von IGROV1 mit der von OC 316 vergleicht, erkennt man, dass IGROV1 nur 45 % der Laktatmenge (in pmol/Zelle) von OC 316 nach sechs Stunden an das Nährmedium abgibt. Vergleicht man die Werte bezogen auf das Zellvolumen in mol/l, so ist die Differenz zwischen den beiden Zelllinien noch etwas größer. Dieser Effekt ist auf das durchschnittlich höhere Zellvolumen der Zellen bei IGROV1 zurückzuführen. Einen genaueren Einblick in die Bedeutung der Zellgröße, erhält man, wenn man die Laktatproduktionsraten der beiden Zelllinien miteinander vergleicht. In Bezug auf die Laktatmenge pro Zelle pro Stunde produziert IGROV1 48 % der Laktatmenge von OC 316. Betrachtet man allerdings die Laktatproduktionsrate in Relation zum Zellvolumen, so produziert IGROV1 nur noch 41 % der Laktatmenge von OC 316. Man sieht also, dass eine Unterscheidung zwischen Laktatmenge pro Zelle und Laktatmenge pro Zellvolumen durchaus sehr wichtig ist, sobald Daten von Zellen unterschiedlichen Zellvolumens miteinander verglichen werden sollen. Eine weitere Indikation für die Angabe der Messwerte bezogen auf das Zellvolumen sieht man im direkten Vergleich der Laktatproduktionsraten von OC 316 und der transfizierten Zelllinie OC 316 LUC, die einen Leervektor trägt. Beide Zelllinie zeigen Unterschiede in der Laktatproduktionsrate bezogen auf die Anzahl der Zellen. Betrachtet man allerdings die Laktatproduktionsrate in Bezug auf das Zellvolumen, sind beide Werte exakt gleich. Auch diese Bedeutung der angemessenen Normierung zellbezogener Funktionsparameter wird in wissenschaftlichen Schriften leider häufig ignoriert.

Bei der Betrachtung der Laktatproduktion von OC 316 Δ HIF-1 α ist festzustellen, dass zwar sowohl in Bezug auf die Zellzahl, als auch auf das Zellvolumen niedrigere Werte gemessen wurden als bei OC 316 und OC 316 LUC, allerdings sind diese Unterschiede als nicht signifikant zu beurteilen. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass alle Messungen unter Normoxie durchgeführt wurden.

Abschließend ist noch zu erwähnen, dass in Einzelversuchen bei allen Zelllinien gezeigt werden konnte, dass der lineare Verlauf der Laktatproduktion auch über 24 Stunden weiter läuft. Somit ist die Aussagekraft der gemessenen Werte über sechs Stunden auch für längere Messperioden repräsentativ.

4.2.2.2 Glukoseverbrauch *in vitro*

Im Gegensatz zur Laktatproduktion handelt es sich beim Verbrauch von Glukose um einen zur Metabolisierung aufgenommenen Nährstoff. Das heißt, dass der Glukoseverbrauch als Nachweis der Glykolyseaktivität insgesamt herangezogen werden kann. Da die Laktatproduktion, vor allem im Tumorgewebe, sowohl unter aeroben, als auch anaeroben Bedingungen stattfindet, kann hieraus alleine keine Aussage über die Glykolyseaktivität geschlossen werden. Da es sich bei der Glukose also um einen exogen zugeführten Nährstoff handelt, der im Gegensatz zum Laktat nicht intrazellulär kumuliert und nur bei Bedarf in die Zelle

aufgenommen wird, ist es sinnvoll zum direkten Vergleich mehrere Zelllinien den Glukoseverbrauch auf die Zellzahl und nicht auf das Zellvolumen zu beziehen.

Beim Vergleich der Zelllinien IGROV1 und OC 316 fällt auf, dass der Glukoseverbrauch von IGROV1 nur 57 % des Glukoseverbrauchs von OC 316 ausmacht. Setzt man voraus, dass das produzierte Laktat zum größten Teil aus der abgelaufenen Glykolyse stammt und hierbei aus jedem mol Glukose zwei mol Laktat werden, ist auffällig, dass bei IGROV1 bis zu 85 % der Glukose zur Laktatproduktion genutzt wird. Bei den Zelllinien OC 316 und OC 316 LUC liegt dieser prozentuale Anteil bei 100 %. Auffällig ist, dass OC 316 Δ HIF-1 α -Zellen nur bis zu 70 % der Glukose zur Laktatproduktion genutzt wird. Das heißt, dass eine Herunterregulierung von HIF-1 α in Tumorgewebe bei hoch-glykolytischen Zelllinien dazu führt, dass im Verhältnis weniger aerobe Laktatproduktion betrieben wird. Dieser hier beschriebene Effekt ist schon seit längerem bekannt (Lu *et al.*, 2002).

Vergleicht man nur den Glukoseverbrauch von OC 316 Δ HIF-1 α -Zellen, mit OC 316- und OC 316 LUC-Zellen, sind die Werte nicht signifikant verschieden.

4.2.3 HIF-1 α -Expressionen *in vitro*

Die Anti-HIF-1 α -Transfizierung der Zelllinie IGROV1- und OC 316-Zellen wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Indraccolo aus Padua (Italien) durchgeführt. In dieser Arbeitsgruppe wurde die Expression von HIF-1 α *in vitro* mit verschiedenen Methoden bereits ausführlicher untersucht. Es wurde mittels quantitativer PCR Analyse die Menge von HIF-1 α mRNA bestimmt. Des Weiteren wurde die Expression von HIF-1 α auf Proteinebene mittels Western Blot detektiert und es wurde die Genexpression von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), welches durch HIF-1 α kontrolliert wird, unter Normoxie und Hypoxie gemessen (siehe Abbildung 4.3). Die Ergebnisse zeigten eine 80 - 90 %ige Herunterregulierung von HIF-1 α mRNA. Eine HIF-1 α Proteinexpression war bei den transfizierten Zelllinien im Gegensatz zu den Wildtyp-Zelllinien nicht nachweisbar. Die Genexpression von VEGF unter Hypoxie wurde durch die Transfizierung deutlich reduziert (siehe Abbildung 4.3) (Favaro *et al.*, 2008).

Ziel dieser Arbeit war es eine kostengünstige und schnell durchführbare Methode zum quantitativen Nachweis von HIF-1 α auf Proteinebene zu entwickeln. Es wurde versucht dies mithilfe des In-Cell-Westerns zu realisieren.

Die in Abschnitt 3.3 gezeigten Ergebnisse zeigen die relative Proteinexpression von HIF-1 α , in Bezug auf Tubulin als Kontrollprotein, der Zelllinien IGROV1, OC 316, OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α . Es ist zu erkennen, dass bei den Zelllinie IGROV1, OC 316 und OC 316 LUC unter Hypoxie die Expression von HIF-1 α ansteigt. Im Gegensatz zur Zelllinie OC 316 Δ HIF-1 α , bei der ein Rückgang der HIF-1 α -Expression unter Hypoxie zu erkennen ist. Diese Ergebnisse sind durchaus mit den zu erwartenden Ergebnissen vereinbar, aller-

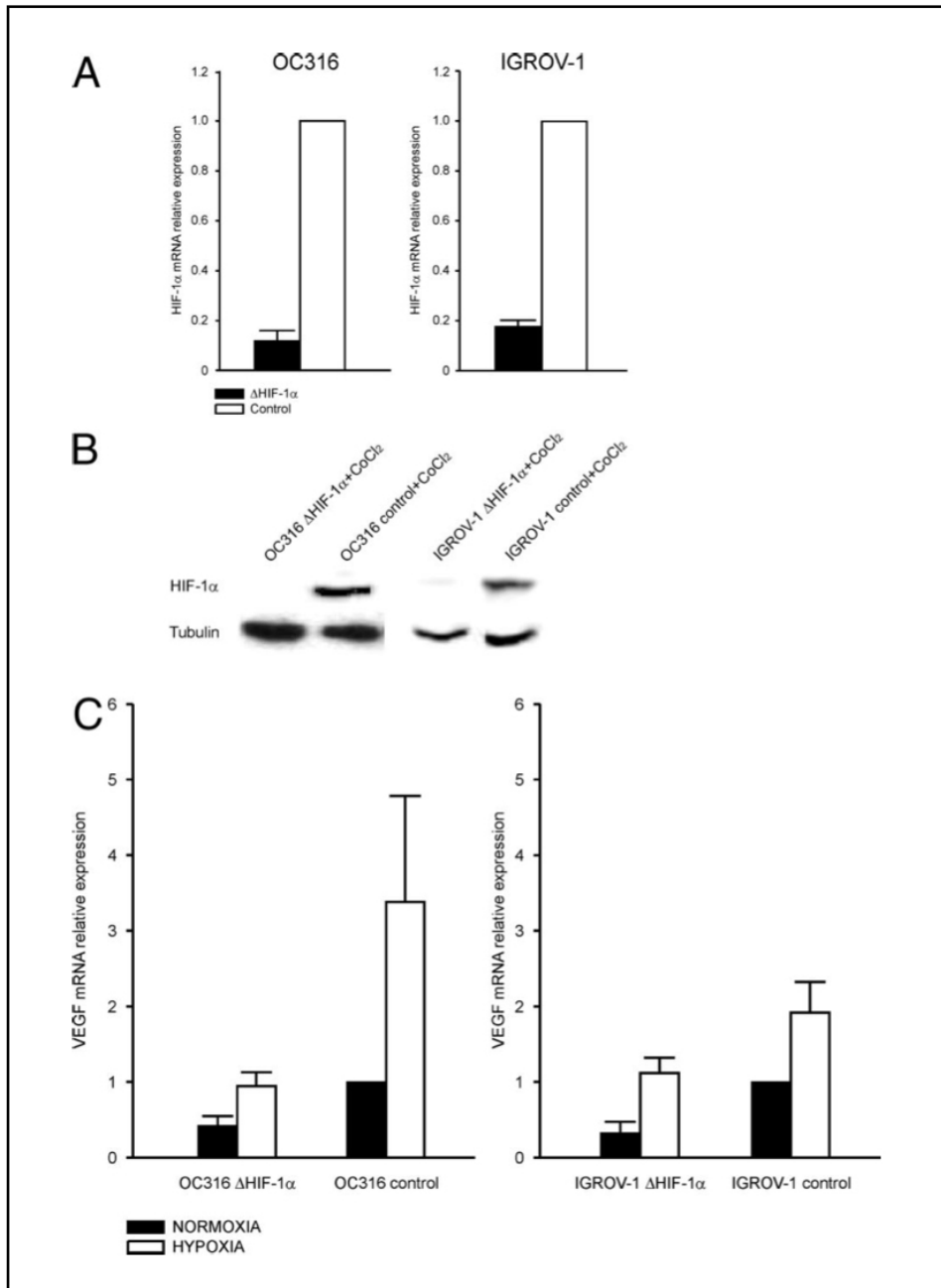


Abbildung 4.3: Expression von HIF-1α auf Gen und Proteinebene
A: Reduktion des HIF-1α mRNA Transkriptionslevels in den Zelllinien IGROV1 ΔHIF-1α und OC 316 ΔHIF-1α mittels quantitativer RT-PCR Analyse. Gezeigt sind Mittelwerte ± SD aus drei unterschiedlichen Untersuchungen.
B: Detektion des HIF-1α Proteinkomplexes in Lysaten aus Zellen von OC 316 und IGROV1 und den jeweiligen transfizierten Zelllinien. Hypoxie wurde durch die Zugabe von Cobaldchlorid (CoCl₂) erzeugt. Als Kontrollprotein wurde Tubulin verwendet.
C: Messung der Genexpression des von HIF-1 kontrollierten VEGF in IGROV1 und OC 316, sowie in den transfizierten Zelllinien unter Normoxie und Hypoxie. Gezeigt sind Mittelwerte ± SD aus drei unterschiedlichen Untersuchungen.
Aus: (Favaro *et al.*, 2008)

dings muss erwähnt werden, dass es sich bei dem gezeigten Versuch um einen einzigen Versuchsdurchlauf und nicht um drei unabhängige Untersuchungen handelt.

Bei der Entwicklung der Methode gestaltete es sich als äußerst schwierig einen immunologischen Proteinnachweis mittels Antikörperreaktion von HIF-1 α durchzuführen. Die Gründe hierfür sind an verschiedenen Stellen der Versuchsdurchführung zu vermuten. Zum einen handelt es sich bei HIF-1 α um ein sehr instabiles Protein, dessen Expression unter Normoxie nur sehr gering ausgeprägt sein kann (Weidemann & Johnson, 2008); (Metzen *et al.*, 2003); (Bardos & Ashcroft, 2004). Bei der Erzeugung von hypoxischen Bedingungen, gibt es wie im Abschnitt 4.1.4 beschrieben mehrere Methoden. In dieser Arbeit wurde die Erzeugung einer chemischen Hypoxie mithilfe von Cobalddchlorid verwendet. Unter anderem wurde diese Methode gewählt, da sie in der kooperierenden Arbeitsgruppe von Dr. Indraccolo ebenfalls verwendet wurde (siehe Abbildung 4.2). Da vor Versuchsbeginn und vor Fixation der Zellen beim Beenden des hypoxischen Zustandes die Möglichkeit eines sofortigen Zerfalls von HIF-1 α besteht, könnte der Nachweis dadurch erschwert werden.

Eine andere Möglichkeit, die den Nachweis erschwert, besteht in der Antikörperreaktion selbst. Kommerzielle Kits zum Antikörpernachweis des HIF-1 α Proteinkomplexes verwenden Verstärkersubstanzen, die die Antikörperreaktion verstärken (ThermoScientific, 2007) (Woo *et al.*, 2006). Bei den hier gezeigten Versuchen wurden keine Verstärker oder Stabilisatoren verwendet. Es stellte sich heraus, dass ohne Verstärker oder Stabilisatoren eine sehr hohe Konzentration des Primärantikörpers benötigt wird, was wiederum zu Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen führen kann.

Abschließend ist für einen quantitativen immunologischen Nachweis von HIF-1 α auf Proteinebene zu empfehlen, ein komplettes kommerzielles Kit (z. B. Cellomics® HCS Reagent Kits Transcription Factor Activation Kit, ThermoScientific) zu benutzen. Diese Variante stellt in Relation zu Aufwand und Kosten die effektivste Methode dar.

4.2.4.1 ATP-Konzentrationen im Xenograft

Die Vorteile bei der bildgebenden Biolumineszenz bestehen darin, dass es ermöglicht wird den Methabolitstatus eines soliden Gewebes zum Entnahmezeitpunkt räumlich und quantitativ darzustellen.

Die hier gemessenen ATP-Konzentrationen unterliegen keinen sehr großen Schwankungen und liegen bei allen vier Zelllinien im Rahmen dessen, was aus anderen Publikationen und aus anderen Tumorentitäten bekannt ist (Walenta *et al.*, 2000); (Schröder); (Walenta *et al.*, 2003); (Quennet *et al.*, 2006).

4.2.4.2 Laktatkonzentrationen im Xenograft

Im Gegensatz zu den ATP-Konzentrationen unterliegen die Laktatkonzentrationen stärkeren Schwankungen. Dies ist aus den Literaturangaben in dem Abschnitt 4.2.4.1 zu entnehmen. Im Vergleich zu Literaturangaben sind die Laktatkonzentrationen bei den hier verwendeten Xenotransplantaten aus allen vier Zelllinien im oberen Bereich des Konzentrationsspektrums anzusiedeln. Dies könnte z. B. durch den durchschnittlich höheren Blutzuckerspiegel bei immundefizienten Mäusen begründet liegen (Jourdan, 1993). Hierdurch könnten sich höhere Laktatkonzentrationen in Xenotransplantaten im Vergleich zu Humanbiopsien begründen. Des weiteren können höhere Laktatkonzentrationen in einer gesteigerten Glykolyse (Walenta *et al.*, 2004) (Gatenby & Gillies, 2004) und einer gesteigerten Expressionsrate einiger glykolytischer Enzyme begründet liegen (Firth *et al.*, 1994); (Semenza, 1999); (Dang & Semenza, 1999); (Unwin *et al.*, 2003); (Solorzano *et al.*, 2005).

Beim Vergleich der Laktatkonzentrationen zwischen IGROV1 und OC 316 zeigt sich eine signifikant höhere Laktatkonzentration in den Tumoren der Zelllinie OC 316. Diese Werte sind vor dem Hintergrund, dass es sich bei OC 316 um eine hoch-glykolytische Zelllinie handelt, zu erwarten. Die Werte korrelieren also sehr gut mit den *in vitro* gemessenen Daten. Bei den Tumoren der transfizierten Zelllinie OC 316 Δ HIF-1 α im Vergleich zu OC 316 LUC sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Auch diese Daten korrelieren sehr gut mit den *in vitro* gemessenen Werten.

4.2.4.3 Glukosekonzentration im Xenograft

Beim Glukosegehalt in Xenotransplantaten ist es sehr schwer zuverlässige Aussagen zu treffen, welche auf den Menschen übertragbar sind. Da die Glukosekonzentration im Tumorgewebe sehr stark von der Blutglukosekonzentration des Wirtstieres abhängig ist, sind die in dieser Arbeit gemessenen Werte nur eingeschränkt mit Werten aus Humanbiopsien zu vergleichen (Schwickert *et al.*, 1996). Da wie bereits erwähnt bestimmte Mausstämme einen höheren Blutglukosespiegel aufweisen als Menschen, sind die hier gemessenen Glukosekonzentrationen in Xenotransplantaten oftmals höher als in menschlichem Tumorgewebe. Trotz dieser Tatsache besteht die Möglichkeit die Glukosekonzentrationen zwischen verschiedenen Tumoren aus unterschiedlichen Zelllinien miteinander zu vergleichen und in Relation zu den gemessenen Laktat- und Pyruvatkonzentrationen zu setzen.

Da signifikante Unterschiede im Laktatgehalt nur zwischen den Tumoren aus IGROV1 und OC 316 zu finden sind, wurde die Glukosekonzentration von Tumoren dieser beiden Zelllinien bestimmt. Hier ist auffällig, dass in IGROV1-Tumoren signifikant höhere Glukosekonzentrationen zu finden sind als in OC 316-Tumoren. Das heißt, dass dies mit einem höheren Glukoseverbrauch der OC 316-Tumoren erklärt werden kann. Dies wiederum weist darauf

hin, dass die unterschiedliche glykolytische Aktivität von Einzelzellen *in vitro* nach Implantation der Zellen und Erzeugung solider Tumoren *in vivo* erhalten bleibt.

4.2.4.4 Pyruvatkonzentration im Xenograft

Nun bleibt die Frage, ob bei den niedrigen Laktat- und hohen Glukosewerten in Tumoren aus der Zelllinie IGROV1 Unterschiede im Laktat/Pyruvat-Verhältnis zu finden sind. Das Laktat/Pyruvat-Verhältnis hängt zum einen von der jeweiligen Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) und der Pyruvatdehydrogenase (PDH) ab, zum anderen spiegelt es die Sauerstoffversorgung des jeweiligen Gewebes wieder (Sattler, 2008). In Tumorgewebe kann dieses Verhältnis zur Beschreibung des mitochondrialen Schadens herangezogen werden.

Da bei Tumoren aus beiden Zelllinien nur sehr geringe Pyruvatkonzentrationen auftraten und auch die Unterschiede bei dem Pyruvatgehalt zwischen den Tumoren nicht signifikant sind, verschiebt sich das Laktat/Pyruvat-Verhältnis, trotz signifikanter Unterschiede im Laktatgehalt, soweit, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumoren von IGROV1 und OC 316 zu finden sind. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass in beiden Tumoren etwa gleich viel Pyruvatproduktion betrieben wird und in den Tumoren von OC 316 der Anteil an aerober Laktatproduktion deutlich höher liegt, als bei Tumoren aus Zellen von IGROV1.

4.2.5 Vergleich *in vitro* vs. *in vivo*

Das *in vitro* Modell der Monolayer-Zellkultur eignet sich sehr gut dazu, einzelne intrazelluläre Vorgänge, unter Ausschaltung möglichst vieler beeinflussender Faktoren zu beurteilen. Durch diese Methode gelingt es sehr gut den intrazellulären Glukosestoffwechsel von Tumorzellen zu untersuchen und zu begreifen. Da aber Gewebewachstum und Stoffwechsel in Tumoren von wesentlich mehr Faktoren abhängen, als nur intrazellulären Stoffwechsellvorgängen, muss um ein Gesamtbild zu erschaffen auch immer der Metabolismus im soliden Gewebe, wie z. B. in Xenotransplantaten beurteilt werden. Darüber hinaus sollte man auch immer eine Beeinflussung durch den Organismus selbst in Betracht ziehen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, bestehen große Unterschiede darin, ob sich ein Tumor in einer immunsuprimierten Maus, oder in einem Menschen befindet. Ein Organismus, sei es der einer Maus, oder eines Menschen, beeinflusst immer auch das Tumorstadium und dessen Metabolismus, z. B. durch die Einwirkung von Hormonen. Was auch immer bedacht werden muss, ist dass ein Tumor in einem immunsuprimierten Organismus immer ein anderes Wachstumsverhalten zeigt, als in einem ansonsten gesunden Organismus. Dass es für die Durchführung von Xenotransplantationen stets eine Immunsuppression, welcher Art auch immer, erforderlich ist sollte niemals außer Acht gelassen werden. So ist z. B. das Tumorstadium sehr stark davon abhängig wie stark die Immunsuppression des Wirtsorganismus ausgeprägt ist.

So lässt auch diese Arbeit den Schluss zu, dass man bei den Versuchen *in vitro* Tendenzen ablesen kann, die sich auch *in vivo* nachweisen lassen. So kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die in Zellkultur niedrig-glykolytische Zelllinie IGROV1 im Vergleich zu OC 316, mit einem gesteigerten Glukosestoffwechsel, dieses Verhalten in den Xenotransplantaten beibehalten. Allerdings ist auch zu sehen, dass die großen Unterschiede, die in der Monolayer-Zellkultur zu sehen sind, in den Xenotransplantaten relativiert werden. Also ist ein Rückschluss von einem Versuch in Zellkultur auf das Ergebnis in solidem Gewebe zwar in der Tendenz möglich, allerdings lassen sich genaue Vorhersagen nicht treffen. Dies macht die Beurteilung anhand von Tumormodellen unerlässlich.

5 Zusammenfassung

Ovarialkarzinome stellen eine schwer zu therapierende onkologische Erkrankung mit im Durchschnitt sehr schlechter Prognose dar. Die Notwendigkeit einer weiteren Verbesserung der Therapie dieser Erkrankung ist sehr offensichtlich. Studien an anderen Tumorentitäten haben die große Bedeutung des Glukosestoffwechsels, speziell des Laktats, in der Erkennung, Kategorisierung und Therapie von onkologischen Erkrankungen gezeigt. In der Kontrolle des Glukosestoffwechsels, aber auch vieler anderer Funktionen, wie z. B. des Tumorstwachstums und des Zellüberlebens, hat sich der Hypoxia Inducible Factor (HIF) als besonders wichtig herausgestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Glukosestoffwechsel in Ovarialkarzinomen und seine Beeinflussung durch eine Herunterregulierung von HIF-1 α untersucht. Hierzu wurden die Ovarialkarzinomzelllinien OC 316 und IGROV1 (Wildtyp) und die Zelllinie OC 316 mit einem lentiviralen Vektor zur Herunterregulierung von HIF-1 α verwendet. Das Wachstumsverhalten, die Laktatproduktion und der Glukoseverbrauch wurden bei diesen Zelllinien *in vitro* untersucht. Darüber hinaus wurden mithilfe der bildgebenden Biolumineszenz ATP, Laktat, Pyruvat und Glukose in Xenotransplantaten dieser Zelllinien gemessen. Diese in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode erlaubt die quantitative Erfassung von Metaboliten in selektiven Gewebsarealen, wie z. B. in vitalen Tumorregionen, in stomatösen Arealen oder im tumornahen Normalgewebe.

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die glykolytische Aktivität von Ovarialkarzinomzelllinien mit dem Wachstumsverhalten positiv korreliert ist. Eine Herunterregulierung von HIF-1 α führt zu einer deutlichen Verlangsamung des Zellwachstums, wobei allerdings alle HIF-Zielgene betroffen sein können. Des Weiteren wird mit den hier gezeigten Daten die prognostische Bedeutung des Laktats bestätigt. Hohe Laktatwerte *in vitro* waren mit schnellerem Wachstum korreliert. Zusätzlich zeigen die vorliegenden Daten, dass die gewonnenen Befunde *in vitro* nur näherungsweise auf die *in vivo* Situation übertragbar sind. Eine Herunterregulierung von HIF-1 α zeigt keine signifikant unterschiedlichen Laktatwerte in den Xenotransplantaten. Allerdings spiegeln sich zelllinienspezifische Unterschiede in der metabolischen Aktivität *in vitro* im metabolischen Verhalten der entsprechenden Xenografttumoren recht gut wider.

Die gewonnenen Ergebnisse weisen zum einen auf die prognostische Bedeutung einer Bestimmung von Laktatkonzentrationen aus Tumorbiopsien hin und bestätigen zum anderen die klinische Aussagekraft metabolischer Aktivitätsmessungen mittels PET. Solche Daten könnten dazu dienen Patienten einer individualisierten Therapie zuzuführen. Außerdem wurde die Effektivität, aber auch die Komplexität einer gegen HIF-1 α gerichteten Therapie auf Protein- und Genebene bestätigt. Somit zeigen die erzielten Resultate einerseits Möglichkeiten einer individualisierten Therapie auf, andererseits unterstreichen sie die große Notwendigkeit weiterer Grundlagenforschung auf diesem Gebiet.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abbildung 1.1	Glykolyse	3
Abbildung 1.2	Hauptverarbeitungswege von Pyruvat	4
Abbildung 1.3	Signalübertragungswege von HIF-1 α	5

Materialien und Methoden

Abbildung 2.1	Zeitmanagement bei der Probengewinnung	12
Abbildung 2.2	Prinzip der photometrischen Laktatbestimmung	13
Abbildung 2.3	Pipettierschema einer 96 Well-Platte	14
Abbildung 2.4	Standardgerade einer photometrischen Laktatbestimmung	14
Abbildung 2.5	Prinzip der photometrischen Glukosebestimmung	15
Abbildung 2.6	Pipettierschema beim In-Cell-Western	17
Abbildung 2.7	Schematische Darstellung zur Herstellung von Schnittserien	20
Abbildung 2.8	Lichtreaktionen für Metabolitmessungen	23
Abbildung 2.9	Apparatur für die bildgebende Biolumineszenz	25
Abbildung 2.10	Eigenschaften der Boxplots	29

Ergebnisse

Abbildung 3.1	Wachstumskurven	31
Abbildung 3.2	Laktatproduktion in pmol/Zelle	33
Abbildung 3.3	Laktatproduktion in mol/l	34
Abbildung 3.4	Laktatproduktion in pmol/Zelle	35
Abbildung 3.5	Glukoseverbrauch in pmol/Zelle	37
Abbildung 3.6	HIF-1 α -Expression	38
Abbildung 3.7	ATP-Gehalt bei IGROV1 und OC 316	40
Abbildung 3.8	Laktatgehalt bei IGROV1 und OC 316	41
Abbildung 3.9	Glukosegehalt bei IGROV1 und OC 316	42
Abbildung 3.10	Pyruvatgehalt bei IGROV1 und OC 316	44
Abbildung 3.11	Laktat/Pyruvat-Verhältnis zwischen IGROV1 und OC 316	45
Abbildung 3.12	ATP Gehalt bei OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α	47
Abbildung 3.13	Laktatgehalt bei OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α	48
Abbildung 3.14	Falschfarbenkalibrierungen ausgewählter Tumore der Zelllinien IGROV1 und OC 316	51
Abbildung 3.15	Falschfarbenkalibrierungen ausgewählter Tumore der Zelllinien OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α	52

Diskussion

Abbildung 4.1	Bedeutung von HIF-1 α im Tumorgewebe	59
Abbildung 4.2	Wachstumskurven	60
Abbildung 4.3	Expression von HIF-1 α auf Gen und Proteinebene	64

6.2 Tabellenverzeichnis**Materialien und Methoden**

Tabelle 2.1	Pipettierschema der Mykoplasmen-PCR	10
Tabelle 2.2	Ablauf der Mykoplasmen-PCR	10
Tabelle 2.3	Pipettierschema für die Kalibrierlösungen der Laktatmessungen	13
Tabelle 2.4	Zusammensetzung Laktat Messkit	15
Tabelle 2.5	Pipettierschema für die Glukose-Kalibrierungslösung	16
Tabelle 2.6	Konzentrationen für die Glukose-Kalibrierungslösung nach Verdünnung mit Perchlorsäure	16
Tabelle 2.7	Zusammensetzung Glukose Messkit	17
Tabelle 2.8	Beim In-Cell-Western Blot verwendete Antikörper	19
Tabelle 2.9	Messbedingungen bei den vier Metaboliten	26

Ergebnisse

Tabelle 3.1	Verdopplungszeiten der verwendeten Zelllinien	31
Tabelle 3.2	Laktatmenge in pmol/Zelle	33
Tabelle 3.3	Laktatmenge in mol/l bezogen auf das Zellvolumen	34
Tabelle 3.4	Laktatmenge in pmol/Zelle	35
Tabelle 3.5	Laktatkonzentrationen nach 6h und Produktionsraten	35
Tabelle 3.6	Glukosekonzentrationen nach 6h und Verbrauchsdaten	36
Tabelle 3.7	Glukosemenge in pmol/Zelle	36
Tabelle 3.8	HIF-1 α -Expression in % bezogen auf die Proteinexpression von Tubulin (n=1)	38
Tabelle 3.9	ATP Werte der IGROV1 und OC 316 Xenografts	40
Tabelle 3.10	Laktatwerte der IGROV1 und OC 316 Xenografts	41
Tabelle 3.11	Glukosewerte der IGROV1 und OC 316 Xenografts	43
Tabelle 3.12	Pyruvatwerte der IGROV1 und OC 316 Xenografts	44
Tabelle 3.13	Laktat/Pyruvat-Verhältnis zwischen den IGROV1 und OC 316 Xenografts	45
Tabelle 3.14	ATP Werte der OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α Xenografts	47
Tabelle 3.15	Laktatwerte der OC 316 LUC und OC 316 Δ HIF-1 α Xenografts	49

6.3 Abkürzungen

α	Alpha
Δ	Delta
%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celcius
^{18}F	Fluor
Σ	Summenzeichen
FDG	Fluordesoxyglukose
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARK	Animal Research Kit
ATP	Adenositriphosphat
Bit	binary digit
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ca^{2+}	Calciumchlorid
CCD	Charge-Coupled Device
CK	Cytokeratin
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzenimeter
CO_2	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
CoCl_2	Cobaldchlorid
COX	Cytochrom C Oxidase
DAB	Diaminobenzidine
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Dinukleosidtriphosphate
Dr.	Doktor
E	Extinktion
et al.	und Mitarbeiter
FCS	Fetal Calf Serum
FMN	Flavin-Mononukleotid
FMNH_2	Flavin-Mononukleotid-Wasserstoff
g	Gramm
G6P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase

h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HK	Hexokinase
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Molar (mol/l)
M.	Mycoplasma
MCP	Multichannel-Plate
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NAD ⁺	Nicotinamadenindinukleotid (oxidiert)
NADH + H ⁺	Nicotinamadenindinukleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH + H ⁺	Nicotinamadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Perchlorsäure
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDH	Pyruvatdehydrogenasekomplex
PDK-1	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-1
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	pondus Hydrogenii
pmol	Pikomol
Prof.	Professor
RGB	Rot, Grün und Blau
ROI	Region Of Interest

rpm	rotations per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SD	Standardabweichung
shRNA	short hairpin Ribonukleinsäure
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell Rezeptor
TIF	Tagged Image File
TIFF	Tagged Image File Format
TMB	Tetramethylbenzidin
U	Units
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
v	Version
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z. B.	zum Beispiel
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol

6.4 Puffer und Lösungen

PBS:

Kaliumchlorid	27 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	15 mM
di-Natriumhydrogenphosphat	65 mM
Natriumchlorid	730 mM
pH: 7,3 – 7,4	

RPMI 1640 Zellmedium (Fa. PAA, Cölbe):

- + 10 % FCS
- + 10 mM HEPES als Puffer
- + 1 mM Natriumpyruvat
- + 1 % L-Glutamat verwendet

HANK's Lösung:

Natriumchlorid	136,9 mM
Kaliumchlorid	5,36 mM
di-Natriumhydrogenphosphat	0,28 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	0,44 mM
HEPES	27,43 mM

pH: 7,2; autoklavieren; Lagerung 4 °C

Vor Gebrauch (à 500 ml):

Glukose	0,5 g
EDTA Tetranatriumsalz Dihydrat	4,75 g

Beides in etwas steriler Hank's Lösung lösen; anschließend sterilfiltriert in die Flasche überführen

Artikel	Hersteller	Ort
Aceton	Roth	Karlsruhe
Agarose	Roth	Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	AppliChem	Cölbe
CASYclean®	Schärfe System	Reutlingen
CASYton®	Schärfe System	Reutlingen
DEPC-Wasser	Sigma	Steinheim
DNA-Loading Dye 6x	Promega	Mannheim
EDTA	Sigma	Steinheim
Eosin	Merck	Darmstadt
Essigsäure	Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung	Roth	Karlsruhe
Formaldehyd	Roth	Karlsruhe
Formamid	Sigma	Steinheim
Glukose	Merck	Darmstadt
Glycerin	Roth	Karlsruhe
HEPES	Roth	Karlsruhe
Hämalaun	Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck	Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt
L-Glutamin	PAA	Cölbe
Methanol	Roth	Karlsruhe
MycoKill AB	PAA	Cölbe
Natriumacetat	Roth	Karlsruhe

Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe
Natriumpyruvat	AppliChem	Darmstadt
Puromycin	AppliChem	Darmstadt
Tissue-Tek®	Sakura	Torrance, USA
Tris	Roth	Karlsruhe
Trypsin EDTA (1x)	PAA	Cölbe
Wasserstoffperoxid	AppliChem	Darmstadt
Xylol	Roth	Karlsruhe

6.5 Kits

Artikel	Hersteller	Ort
Animal Research Kit	Dako	Hamburg
DAB ⁺	Dako	Hamburg
Glukose-Kit	r-biopharm AG	Darmstadt
Laktat-Kit	r-biopharm AG	Darmstadt
MycoTest Venor®GeM	Minerva biolabs	Berlin

6.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Ort
Cytokeratin AE1/AE3 (mouse)	Dako	Hamburg
goat anti-mouse EnVision	Dako	Hamburg
HIF-1 α (C-19) (goat)	Santa Cruz	California, USA
donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz	California, USA
α -Tubulin (rabbit)	abcam	Cambridge, GB
donkey anti-rabbit HRP	Dianova	Hamburg

6.7 Geräte

Gerät	Hersteller	Ort
Absaugpumpe	Neuberger	Freiburg
Agarosegelelektrophoresekammer	Pharmacia Biotech	Wien, AT
Biolumineszenzkameras - iXonEM+	Andor	Belfast, GB

- Hamamatsu C2400	Hamamatsu	Herrsching
Brutschrank	Heraeus	Hanau
CASY® TT	Schärfe System	Reutlingen
Einfrierbox	Merck	Darmstadt
Fettstift	Dako	Hamburg
Flow (Sterilbank)	Gelair	Meckenheim
Fluorometer Fluoroskan II	Thermo Scientific	Braunschweig
Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat	Eberhardzell
Kryotom	SLEE	Mainz
MacBook	Apple	Hollyhill, IE
Magnetrührplatte	Variomag	Oberschleissheim
Microplate-Reader 3550-UV	Biorad	München
Microplate-Reader DTX 880	Beckman Coulter	Krefeld
Mikroskope		
- DM IRB	Leica	Wetzlar
- Olympus BH-2	Zeiss	Göttingen
- Olympus IM	Olympus	Hamburg
Mikrowelle	Micromaxx	Essen
Dispenser/ Multipette	Eppendorg	Hamburg
pH-Meter	Schott Geräte	Mainz
Spiegelreflexkamera D100	Nikon	Düsseldorf
Photometer - LAMBDA Bio	PerkinElmer	Rodgau
Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Thermocycler TPersonal	Biometra	Göttingen
Vortexer	Bender & Hobein	Bruchsal
Wasserbad	GFL	Hannover
Zentrifugen		
- Biofuge 15; Rotor 3042	Heraeus	Hanau
- Megafuge 1.0R; Rotor 2252	Heraeus	Hanau
- Zentrifuge 3200	Eppendorf	Hamburg

6.8 Materialien

Artikel	Hersteller	Ort
Casyton	Schärfe System	Reutlingen
Deckgläschen	Menzel-Gläser	Braunschweig
Einmalpipetten	Greiner bio-one	Frickenhausen
Einwegskalpelle	Braun	Tuttlingen

Kryo-Röhrchen	Nalgene	Rochester, US
Objektträger-SuperFrost®/Plus	Menzel-Gläser	Braunschweig
Pastheurpipetten, gestopft	Roth	Karlsruhe
Petrischalen	Greiner bio-one	Frickenhausen
Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg
Pipettus	Eppendorf	Hamburg
Reaktionsgefäße (50 ml; 15 ml)	Greiner bio-one	Frickenhausen
Reaktionsgefäße (2 ml; 1,5 ml, 1 ml)	Eppendorf	Hamburg
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	VWR	Darmstadt
Roti-Histokitt	Roth	Nürnberg
Sterilfilter	PALL Life Science	Dreieich
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one	Frickenhausen
96 Well-Platten	Roth	Karlsruhe

6.9 Software

Software	Hersteller	Ort
AndorIQ	Andor	Belfast, GB
EndNote	Thomas Reuters	New York, USA
ImageJ	National Institute of Health	
MicroplateManager	BioRad	München
Microsoft Excel	Microsoft Corporation	München
OriginLab	OriginLab Corporation	Northampton
Pages	Apple	Hollyhill, IE
Photoshop	Adobe Systems	München
Wasabi	Hamamatsu	Herrsching

7 Bibliografie

Alama A, Barbieri F, Favre A, Cagnoli M, Noviello E, Pedulla F, Viale M, Foglia G, Ragni N (1996) Establishment and characterization of three new cell lines derived from the ascites of human ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* **62**: 82-8

Bardos JI, Ashcroft M (2004) Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays* **26**: 262-9

Benard J, Da Silva J, De Blois MC, Boyer P, Duvillard P, Chiric E, Riou G (1985) Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* **45**: 4970-9

Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**: 527-30

Cairns RA, Papandreou I, Sutphin PD, Denko NC (2007) Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9445-50

Dang CV, Semenza GL (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* **24**: 68-72

Denko NC (2008) Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* **8**: 705-13

Favaro E, Nardo G, Persano L, Masiero M, Moserle L, Zamarchi R, Rossi E, Esposito G, Plebani M, Sattler U, Mann T, Mueller-Klieser W, Ciminale V, Amadori A, Indraccolo S (2008) Hypoxia inducible factor-1alpha inactivation unveils a link between tumor cell metabolism and hypoxia-induced cell death. *Am J Pathol* **173**: 1186-201

Firth JD, Ebert BL, Pugh CW, Ratcliffe PJ (1994) Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6496-500

Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**: 891-9

Hahn H (2009) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie : mit 157 Tabellen*, 6., komplett überarb. Aufl., edn. Heidelberg: Springer-Medizin-Verl.

Hu H, Wang J, Bu D, Wei H, Zhou L, Li F, Looor JJ (2009) In vitro culture and characterization of a mammary epithelial cell line from Chinese Holstein dairy cow. *PLoS One* **4**: e7636

Jourdan T (1993) *Zum Einfluß menschlicher Tumore auf den Blutzucker xenotransplantiertes Nacktmäuse*. Gießen

Kötz L. Genom und Proteom von hoch- und niedrig-glykolytischen Tumorzellen. 2009

Lincoln CK, Gabridge MG (1998) Cell culture contamination: sources, consequences, prevention, and elimination. *Methods Cell Biol* **57**: 49-65

Lu H, Forbes RA, Verma A (2002) Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* **277**: 23111-5

Maubant S, Cruet-Hennequart S, Poulain L, Carreiras F, Sichel F, Luis J, Staedel C, Gauduchon P (2002) Altered adhesion properties and alpha v integrin expression in a cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell line. *Int J Cancer* **97**: 186-94

Metzen E, Zhou J, Jelkmann W, Fandrey J, Brune B (2003) Nitric oxide impairs normoxic degradation of HIF-1alpha by inhibition of prolyl hydroxylases. *Mol Biol Cell* **14**: 3470-81

Mueller-Klieser W, Walenta S (1993) Geographical mapping of metabolites in biological tissue with quantitative bioluminescence and single photon imaging. *Histochem J* **25**: 407-20

Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* **25**: 4633-46

Quennet V. Bedeutung des Glukosestoffwechsels für die Strahlenempfindlichkeit solider Tumoren. 2007

Quennet V, Yaromina A, Zips D, Rosner A, Walenta S, Baumann M, Mueller-Klieser W (2006) Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother Oncol* **81**: 130-5

Robert-Koch-Institut, Deutschland. Statistisches Bundesamt. (2010) Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin: Robert-Koch-Inst.

Robinson LB, Wichelhausen RH (1956) Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia-like organisms. *Science* **124**: 1147-8

Roett MA, Evans P (2009) Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician* **80**: 609-16

Rottem S, Barile MF (1993) Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol* **11**: 143-51

Ryan J (2008) Understanding and Managing Cell Culture Contamination. *Corning*: 24

Sattler U (2008) *Ein neues Lumineszenzverfahren zur quantitativen und räumlichen Darstellung von Produkten des Glukosestoffwechsels in Tumoren*

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

Scatena R, Bottoni P, Pontoglio A, Mastroianni L, Giardina B (2008) Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* **17**: 1533-45

Schröder T *Die prognostische Bedeutung des Laktatgehaltes in Plattenepithelkarzinomen des menschlichen Kopf-Hals-Bereichs*

Schulz TJ, Thierbach R, Voigt A, Drewes G, Mietzner B, Steinberg P, Pfeiffer AF, Ristow M (2006) Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem* **281**: 977-81

Schwickert G, Walenta S, Mueller-Klieser W (1996) Mapping and quantification of biomolecules in tumor biopsies using bioluminescence. *Experientia* **52**: 460-3

Semenza GL (1999) Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 551-78

Semenza GL (2002) HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* **8**: S62-7

Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**: 721-32

Semenza GL (2009) Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol* **19**: 12-6

Solorzano L, Rieber MS, Medina JD, Rieber M (2005) Decreased glycolytic metabolism accelerates apoptosis in response to 2-acetyl furanonaphthoquinone in K1735 melanoma irrespective of bcl-2 overexpression. *Cancer Biol Ther* **4**: 329-35

Stinson B (2008) *The Bro Code*. New York City: Fireside

ThermoScientific (2007) Cellomics® HCS Reagent Kits

Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Totty N, Knowles M, Eardley I, Selby PJ, Banks RE (2003) Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* **3**: 1620-32

Vaupel P (2004) The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* **9** **Suppl 5**: 10-7

Vaupel P, Mayer A, Hockel M (2004) Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* **381**: 335-54

Walenta S, Chau TV, Schroeder T, Lehr HA, Kunz-Schughart LA, Fuerst A, Mueller-Klieser W (2003) Metabolic classification of human rectal adenocarcinomas: a novel guideline for clinical oncologists? *J Cancer Res Clin Oncol* **129**: 321-6

Walenta S, Dellian M, Goetz AE, Mueller-Klieser W (1994) Correlation between regional ATP and blood flow in tumors and surrounding normal tissue. *Adv Exp Med Biol* **345**: 387-93

Walenta S, Mueller-Klieser WF (2004) Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin Radiat Oncol* **14**: 267-74

Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W (2004) Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem* **11**: 2195-204

Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfor K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W (2000) High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* **60**: 916-21

Wang J, Wang X, Jiang S, Lin P, Zhang J, Wu Y, Xiong Z, Ren JJ, Yang H (2007) Establishment of a new human glioblastoma multiforme cell line (WJ1) and its partial characterization. *Cell Mol Neurobiol* **27**: 831-43

Weidemann A, Johnson RS (2008) Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* **15**: 621-7

Woo KJ, Lee TJ, Park JW, Kwon TK (2006) Desferrioxamine, an iron chelator, enhances HIF-1alpha accumulation via cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **343**: 8-14

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Thomas Mann
Geburtsdatum	07.10.1983
Geburtsort	Grünstadt
Familienstand	verheiratet
Konfession	evangelisch

Schulbildung

2003	Abitur, Wirtschaftsgymnasium Eisenberg, Rheinland-Pfalz Scheffelpreis
------	--

Zivildienst

2003 - 2004	Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund Grünstadt als Rettungssanitäter und Erste-Hilfe-Trainer
-------------	---

Studium

2004 - 2011	Medizinstudium an der Johannes Gutenberg Universität Mainz
2006	erstes Staatsexamen (neue ÄAppO)
2011	zweites Staatsexamen (neue ÄAppO)

Promotion

2007 - 2011	Glykolytische Aktivität von Ovarialkarzinomzelllinien <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> und die Bedeutung von HIF-1 α Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universitätsmedizin Mainz bei Prof. Dr. Müller-Klieser
2011	Promotion zum Dr. med.

Publikationen

2008	Favaro et al. Hypoxia Inducible Factor-1 α Inactivation Unveils a Link between Tumor Cell Metabolism and Hypoxia-Induced Cell Death The American Journal of Pathology, Vol. 173, No. 4, October 2008
------	--