

Untersuchungen zur Wechselbeziehung zwischen  
Proteom, Energiestoffwechsel, Redoxstatus und  
Radiosensibilität von Tumorzellen  
*in vitro* und *in vivo*

**D i s s e r t a t i o n**  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Christian Fabian  
geb. am 07.07.1982 in Wiesbaden

Mainz, 2013

---

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2013

## DANKSAGUNG

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Tumorerkrankungen.....	1
1.2 Plattenepithelkarzinome der Kopf- und Halsregion.....	2
1.2.1 Epidemiologie und Klassifizierung .....	2
1.2.2 Risikofaktoren.....	4
1.2.3 Symptome, Diagnose, Therapie und Prognose .....	4
1.3 Ovarialkarzinome .....	5
1.3.1 Epidemiologie und Klassifizierung .....	5
1.3.2 Risikofaktoren.....	5
1.3.3 Symptome, Diagnose, Therapie und Prognose .....	6
1.4 Tumorstoffwechsel.....	6
1.4.1 Besonderheiten des Tumorstoffwechsels .....	7
1.4.1.1 Expression stoffwechselrelevanter Proteine .....	7
1.4.1.2 Zellulärer Energiestoffwechsel und Redoxstatus .....	10
1.4.2 Stoffwechselmanipulation von Tumorzellen.....	12
1.5 Strahlentherapie.....	14
1.5.1 Gammastrahlung.....	14
1.5.2 Strahlenbiologie.....	15
1.6 Aufgabenstellung .....	16
<b>2 MATERIALIEN und METHODEN</b> .....	<b>18</b>
2.1 Zellkultivierung.....	18
2.1.1 Tumorzelllinien .....	18
2.1.2 Medien und Zusätze .....	19
2.1.3 Kultivieren und Passagieren.....	19
2.1.4 Zellzahlbestimmung .....	20
2.1.5 Mykoplasmentest (MycoAlert®).....	20
2.1.6 Kryokonservierung von Zellen .....	21
2.2 Wachstumskurven und Zellzahlverdopplungszeiten .....	22
2.3 Analyse stoffwechselrelevanter Proteine .....	22
2.3.1 In-Cell Western.....	22
2.3.2 LDH-Enzymaktivitätstest .....	24
2.4 Metabolische Analysen .....	25
2.4.1 Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3.....	25
2.4.1.1 Simultane Messungen von H <sup>+</sup> und O <sub>2</sub> .....	27
2.4.1.2 Detektion von CO <sub>2</sub> .....	29

2.4.1.3	Normalisierung mit Janusgrün-B.....	30
2.4.2	SUPER GL2-Analysator (Glukose- und Laktatbestimmung) .....	30
2.4.3	Luminometrische ATP-Bestimmung .....	32
2.5	Beurteilung des Redoxstatus.....	33
2.5.1	DHE-Färbung zum Nachweis von O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Anionen.....	33
2.5.2	Photometrische Bestimmung der SOD-Aktivität.....	34
2.6	Klonogenes Überleben und Radiosensibilität .....	36
2.6.1	Gamma- und UV-Bestrahlung .....	36
2.6.2	Klonogenitätstest.....	37
2.6.3	γH2AX-Immunfluoreszenzfärbung.....	38
2.7	Dosisfindungstest.....	41
2.8	Erzeugung von Experimentaltumoren .....	42
2.9	Untersuchungen an Experimentaltumoren .....	42
2.9.1	Immunfluoreszenzfärbungen stoffwechselrelevanter Proteine .....	42
2.9.2	Quantifizierung von Metaboliten mittels imBI .....	44
2.9.2.1	ATP .....	46
2.9.2.2	Laktat .....	47
2.9.2.3	Glukose .....	47
2.9.2.4	Pyruvat.....	48
2.9.2.5	Standards und Kalibrierungskurven.....	48
2.9.2.6	Hämalaun- und Eosin-Färbung.....	49
2.9.2.7	Auswertung der imBI-Messungen.....	49
2.9.3	DHE-Färbung zum Nachweis von O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Anionen an Tumorschnitten.....	50
2.10	Statistik .....	50
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>51</b>
3.1	Charakterisierung der Tumorzelllinien .....	51
3.1.1	Wachstumskurven und Zellzahlverdopplungszeiten .....	51
3.1.2	Charakterisierung stoffwechselrelevanter Proteine.....	52
3.1.2.1	Expressionsanalysen stoffwechselrelevanter Proteine.....	52
3.1.2.2	Bestimmung der LDH-Enzymaktivität .....	53
3.1.3	Charakterisierung des zellulären Energiestoffwechsels.....	54
3.1.3.1	Sauerstoffverbrauchs-, Azidifizierungs- und Kohlenstoffdioxid- entwicklungsraten .....	54
3.1.3.2	Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsraten.....	55
3.1.3.3	Intrazellulärer ATP-Gehalt .....	57
3.1.4	Charakterisierung des Redoxstatus.....	57
3.1.4.1	Nachweis von O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Anionen .....	57

3.1.4.2 Bestimmung der SOD-Aktivität .....	59
3.2 Klonogenes Überleben und Radiosensibilität .....	60
3.2.1 Klonogenitätstests .....	60
3.2.2 Überlebenskurven nach Gammabestrahlung.....	60
3.2.3 $\gamma$ H2AX-Foci nach Gammabestrahlung .....	61
3.3 Stoffwechselmanipulation von Tumorzellen.....	65
3.3.1 Gentechnische Stoffwechselmanipulation .....	66
3.3.2 Dosisfindungstests biochemischer Stoffwechselmanipulatoren .....	68
3.3.3 Stoffwechselraten manipulierter Tumorzellen .....	69
3.3.4 Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsrate manipulierter Tumorzellen.....	72
3.3.5 ATP-Gehalt unter dem Einfluss von Stoffwechselmanipulatoren .....	74
3.3.6 Quantifizierung von $O_2^-$ -Anionen nach UV-A Bestrahlung bzw. Behandlung mit 2DG + ROT .....	75
3.3.7 Klonogenes Überleben nach Gammabestrahlung und Zugabe metabolischer Inhibitoren.....	79
3.3.8 Bildung von $\gamma$ H2AX-Foci unter Gammabestrahlung und dem Einfluss metabolischer Inhibitoren.....	81
3.4 Charakterisierung von Experimentaltumoren.....	84
3.4.1 Immunfluoreszenzfärbungen stoffwechselrelevanter Proteine .....	84
3.4.2 Metabolische Charakterisierung mittels imBl .....	90
3.4.3 Nachweis von $O_2^-$ -Anionen .....	93
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>95</b>
4.1 Energiestoffwechsel humaner Tumorzelllinien.....	95
4.1.1 Tumormikromilieu von Ovarialkarzinomzelllinien und Einfluss des Energiestoffwechsels auf die Wirksamkeit von Gammabestrahlung.....	96
4.1.2 Tumormikromilieu von HNSCC-Zelllinien und Einfluss des Energiestoffwechsels auf die Wirksamkeit von Gammabestrahlung.....	98
4.1.3 Laktat als prädiktiver Marker in der Tumorthherapie.....	99
4.2 Gentechnische und biochemische Stoffwechselmanipulation von Tumorzellen.....	101
4.2.1 Stoffwechselmanipulation und Energiestoffwechsel .....	101
4.2.2 Stoffwechselmanipulation und Redoxstatus .....	105
4.2.3 Stoffwechselmanipulation und Strahlenresistenz.....	105
4.2.4 Stoffwechselmanipulation - präklinische Forschung und klinische Anwendung .....	107
4.3 Übertragung von <i>in-vitro</i> Befunden ins Tiermodell.....	108
4.4 Ausblick .....	109
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>111</b>

<b>6 ANHANG</b> .....	112
6.1 Chemikalien und Reagenzien.....	112
6.1.1 Chemikalien .....	112
6.1.2 Medien und Zusätze.....	113
6.1.3 Kommerzielle Kits.....	113
6.1.4 Antikörper.....	113
6.2 Materialien und Geräte.....	114
6.3 Software und Plugins .....	115
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	116

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2DG	2-Deoxy-D-glukose
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AMP	Adenosinmonophosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Ba	Barium
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
CA	Carboanhydrase
CDER	Carbon Dioxide Evolution Rate
Co	Cobalt
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cytochrom-c-Oxidase
Cs	Caesium
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DSB	Doppelstrangbruch
E	Extinktion
ECAR	Extracellular Acidification Rate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid
FCS	fetal calf serum
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FMN und FMNH <sub>2</sub>	Flavinmononukleotid
G-6-PDH	Glukose-6-phosphat-dehydrogenase
Glukose-6-P	Glukose-6-phosphat
GLUT	Glukosetransporter
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

GSH und GSSG	Glutathion
GV	Gesamtverdünnung der Probe
Gy	Gray
H <sup>+</sup>	Proton
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Kohlensäure
H&E	Hämalaun&Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
imBI	induced metabolic Bioluminescence Imaging
IMRT	intensity-modulated radiation therapy
HK	Hexokinase
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
LDH	Laktatdehydrogenase
MCT	Monocarboxylattransporter
Mg	Magnesium
mtDNA	mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NAD <sup>+</sup> und NADH	Nicotinamidadeninukleotid
NADP <sup>+</sup> und NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NFO	NAD(P)H:FMN Oxidoreduktase
NHEJ	non-homologous end joining
NMRI	Naval Medical Research Institute
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
OCR	Oxygen Consumption Rate
OH	Hydroxyl
OXA	Oxamat
p	Signifikanzwert
P	Phosphat
PBS	phosphate buffered saline
PDC	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PE	Plating Efficiency
PEP	Phosphoenolpyruvat

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PFA	Paraformaldehyd
PK	Pyruvatkinase
R	Rotwert
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
ROT	Rotenon
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
S	Schwarzwert
SCID	severe combined immunodeficiency
SD	standard deviation
SF	Surviving Fraction
sh	small hairpin
SOD	Superoxiddismutase
T	time
TMB	Tetramethylbenzidin
TPx	Thioredoxinperoxidase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrxR	Thioredoxinreduktase
Trx(SH) <sub>2</sub> und Trx(S) <sub>2</sub>	Thioredoxin
U	units
UICC	Union internationale contre le cancer
UV	Ultraviolett
V <sub>max</sub>	maximale enzymatische Umsatzgeschwindigkeit
vs.	versus
XO	Xanthinoxidase
z. B.	zum Beispiel
Zü	Zellüberstand

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Glukose- und Energiestoffwechsels.....	8
Abbildung 2: Der zelluläre Energiestoffwechsel und Redoxstatus unter dem Einfluss von Stoffwechselmanipulatoren.....	13
Abbildung 3: Schematischer Zellstoffwechsel und Analyte des Seahorse Extracellular Flux Analyzers XF 24/3.....	26
Abbildung 4: Schematisiertes Messprinzip des Seahorse Extracellular Flux Analyzers XF 24/3.....	27
Abbildung 5: Berechnung von OCR und ECAR mittels Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3.....	28
Abbildung 6: CO <sub>2</sub> -Messprinzip des Seahorse Extracellular Flux Analyzers XF 24/3.....	29
Abbildung 7: Glukose- und Laktatstandards gemessen mit dem SUPER GL2-Analysator.....	31
Abbildung 8: Computergestützte Quantifizierung der DHE-Färbung.....	34
Abbildung 9: Schematische Darstellung der chemischen Zusammenhänge des SOD-Aktivitätstests.....	35
Abbildung 10: Zeitabfolge eines Klonogenitätstests.....	38
Abbildung 11: Computergestützte Quantifizierung von $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle.....	41
Abbildung 12: Computergestützte Quantifizierung von Immunfluoreszenzfärbungen an Tumorschnitten.....	44
Abbildung 13: Messung von Metaboliten mittels imBl.....	46
Abbildung 14: Wachstumskurven der Tumorzelllinien OC316 und IGROV-1.....	51
Abbildung 15: Wachstumskurven der Tumorzelllinien SAS und FaDu.....	52
Abbildung 16: Vergleichende Proteinexpressionsanalysen Energiestoffwechselassoziierter Enzyme und Transporter der verwendeten Karzinomzelllinien.....	53
Abbildung 17: LDH-Aktivitäten der vier verwendeten Zelllinien.....	54
Abbildung 18: Basale ECAR, OCR und CDER der verwendeten Karzinomzelllinien.....	55
Abbildung 19: Laktatproduktion und Glukoseverbrauch der Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu.....	56
Abbildung 20: Relativer intrazellulärer ATP-Gehalt der vier Karzinomzelllinien.....	57
Abbildung 21: DHE-Färbung der vier Tumorzelllinien.....	58
Abbildung 22: O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Anionen-Level von vier humanen Karzinomzelllinien.....	58
Abbildung 23: SOD-Aktivitäten der vier verwendeten Tumorzelllinien.....	59
Abbildung 24: PE der vier untersuchten Karzinomzelllinien.....	60
Abbildung 25: SF der untersuchten Karzinomzelllinien nach Gammabestrahlung.....	61
Abbildung 26: $\gamma$ H2AX-Färbungen 1 h und 24 h nach Gammabestrahlung in OC316- und IGROV-1-Zellen.....	62
Abbildung 27: Quantifizierung von DSBs anhand $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen in OC316- und IGROV-1-Zellen 1 h und 24 h nach Gammabestrahlung ...	63
Abbildung 28: $\gamma$ H2AX-Färbungen 1 h und 24 h nach Gammabestrahlung in SAS- und FaDu-Zellen.....	64

Abbildung 29: Quantifizierung von DSBs anhand $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen in SAS- und FaDu-Zellen 1 h und 24 h nach Gammabestrahlung .....	65
Abbildung 30: MCT-4-Immunfluoreszenzfärbungen an transfizierten OC316-Zellen .....	66
Abbildung 31: MCT-4-Proteinexpression und metabolische Charakterisierung transfizierter Ovarialkarzinomzelllinien .....	67
Abbildung 32: PE der vier untersuchten Tumorzelllinien nach Behandlung mit metabolischen Manipulatoren.....	68
Abbildung 33: ECAR und OCR von OC316- und IGROV-1-Zellen unter dem Einfluss metabolischer Stoffwechselmanipulatoren .....	70
Abbildung 34: ECAR und OCR von SAS- und FaDu-Zellen unter dem Einfluss metabolischer Stoffwechselmanipulatoren .....	71
Abbildung 35: Laktatproduktion und Glukoseverbrauch der Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu unter Einfluss der Manipulation mit 60 mM OXA.....	73
Abbildung 36: Laktatproduktion der Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu unter Einfluss der Manipulation mit 20 mM 2DG.....	74
Abbildung 37: Relative ATP-Konzentration der vier Tumorzelllinien unter dem Einfluss metabolischer Inhibitoren .....	75
Abbildung 38: DHE-Färbung der vier Tumorzelllinien nach 0-8 min UV-A Bestrahlung ....	76
Abbildung 39: Relative $O_2^-$ -Anionen-Level nach 0-8 min UV-A Bestrahlung .....	77
Abbildung 40: DHE-Färbung der vier Tumorzelllinien unter dem Einfluss von 2DG + ROT .....	78
Abbildung 41: Relative $O_2^-$ -Anionen-Level nach Behandlung mit 2DG + ROT .....	78
Abbildung 42: SF von OC316- und IGROV-1-Tumorzellen nach 2 Gy Gamma- bestrahlung in Kombination mit metabolischen Inhibitoren .....	79
Abbildung 43: SF von SAS- und FaDu-Tumorzellen nach 2 Gy Gammabestrahlung in Kombination mit metabolischen Inhibitoren .....	80
Abbildung 44: Quantifizierung von DSBs mittels $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen unter dem Einfluss von Stoffwechselmanipulatoren ohne Bestrahlung.....	81
Abbildung 45: Quantifizierung von DSBs mittels $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen in OC316-Zellen unter dem Einfluss von metabolischen Inhibitoren nach Gammabestrahlung.....	82
Abbildung 46: Quantifizierung von DSBs mittels $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen in IGROV-1-Zellen unter dem Einfluss von metabolischen Inhibitoren nach Gammabestrahlung.....	83
Abbildung 47: Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine GLUT-1, MCT-1, MCT-4 und CA-IX an Schnitten von OC316- und IGROV-1-Experimentaltumoren.....	85
Abbildung 48: Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine PDH-E1 $\beta$ , COX-IV, PK-M2 und LDH-A an Schnitten von OC316- und IGROV-1-Experimentaltumoren .....	86
Abbildung 49: Relative Expression stoffwechselrelevanter Proteine von Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten aus OC316- und IGROV-1-Xenografts...	87
Abbildung 50: Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine GLUT-1, MCT-1, MCT-4 und CA-IX an Schnitten von SAS- und FaDu-Experimentaltumore.....	88
Abbildung 51: Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine PDH-E1 $\beta$ , COX-IV, PK-M2 und LDH-A an Schnitten von SAS- und FaDu-Experimentaltumoren.....	89

Abbildung 52: Relative Expression stoffwechselrelevanter Proteine von Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten aus SAS- und FaDu-Xenografts.....90

Abbildung 53: H&E-Färbungen und falschfarbenkalibrierte Biolumineszenzaufnahmen von OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Xenografts .....91

Abbildung 54: Metabolitmessungen von OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Xenografts mittels imBI .....92

Abbildung 55: O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Anionen-Level von OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Xenografts...93

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: AJCC-Stadien der Kopf-Hals-Tumoren .....3

Tabelle 2: FIGO-Stadien der Ovarialkarzinome .....5

Tabelle 3: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien hinsichtlich Herkunft und histologischer Klassifizierung .....19

Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper für In-Cell Western.....24

Tabelle 5: Ausgesäte Zellzahlen und Inkubationszeiten für Klonogenitätstests .....37

Tabelle 6: Primär- und Sekundärantikörper und verwendete Verdünnungen für Immunfluoreszenzfärbungen an Tumorschnitten .....43

Tabelle 7: Inkubations- und Messzeiten unterschiedlicher Metabolite für die imBI-Technik.....45

Tabelle 8: Eingesetzte Konzentrationen von Stoffwechselmanipulatoren .....69

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Tumorerkrankungen

Der Begriff Tumorerkrankung beschreibt eine bösartige Gewebeneubildung (Neoplasie) und umfasst eine heterogene Gruppe an Krankheitsbildern mit einer vielfältigen Variation an Symptomen, Befunden, Diagnosen und Therapien, wesentlich geprägt durch die Lokalisation und das Erkrankungsstadium bei der Erstdiagnose. Eine Neoplasie kann sich grundsätzlich aus jeder Körperzelle entwickeln und in verschiedensten Organen auftreten. Die Entstehung eines Tumors, die Karzinogenese, ist nach heutigem Stand der Forschung ein mehrstufiger Prozess, bei dem sich die maligne Tumorzelle durch eine Reihe von Defekten in verschiedenen Genen aus prämaligen Vorstufen entwickelt. Hierbei sind insbesondere Mutationen innerhalb der Onkogene und Tumorsuppressorgene für die Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle verantwortlich (Pfeifer et al., 2006).

Der Prozess der Karzinogenese ist komplex, und die Ursachen für die Tumorentstehung sind mannigfaltig. Für einige Tumorerkrankungen sind Risikofaktoren bekannt. So induziert beispielsweise Tabakrauch und Alkoholabusus Kopf-Hals-Tumoren; eine direkte Kausalkette konnte durch wissenschaftliche Studien belegt werden (Smith et al., 2012). Dem gegenüber stehen zahlreiche Tumorentitäten, von denen die Ätiologie nicht bekannt ist und eine gezielte Präventionsstrategie nicht zur Verfügung steht. Faktoren wie Übergewicht, Bewegungsmangel, Alkoholkonsum, chemische Noxen, ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung) und Onkoviren scheinen jedoch das Risiko, an einer bösartigen Gewebeneubildung zu erkranken, grundsätzlich zu erhöhen (Gallagher et al., 2010; Hunn und Rodriguez, 2012; Reeves et al., 2007).

Nach Hanahan und Weinberg (2000; 2011) erwirbt die Tumorzelle im Rahmen ihrer Karzinogenese elf typische und universelle Merkmale, die sogenannten „hallmarks of cancer“, die sie vom Normalgewebe unterscheiden. Neben lang bekannten Eigenschaften von Tumorzellen, wie die unbegrenzte Proliferation, die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung sowie die Resistenz gegen Apoptose, rückt auch der deregulierte Tumorstoffwechsel immer stärker in den Fokus der Tumorforschung (Hirschhaeuser et al., 2011; Moreno-Sanchez et al., 2007; Sattler et al., 2010a).

Von den örtlich begrenzten Tumoren werden heute etwa zwei Drittel durch Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie geheilt (Sauer, 2010). Das verbleibende Drittel beschäftigt mit großem Nachdruck die experimentelle und klinische Forschung. So werden unter anderem neue Kombinationsverfahren sowie strahlen- und chemosensibilisierende Substanzen entwickelt, um die Effektivität der Tumorthherapie zu optimieren und die Patientenprognose zu verbessern.

Trotz intensiver Forschung und bekannter Risikofaktoren steigt seit der Jahrtausendwende die Zahl aufgetretener Tumorerkrankungen stetig an. Laut Prognosen des Robert Koch-Institutes (RKI) war im Jahr 2012 in Deutschland mit knapp einer halben Million Neuerkrankungen von bösartigen Gewebeneubildungen und einem mittleren Erkrankungsalter von 69 Jahren zu rechnen. Ausgehend von den im Jahr 2007 und 2008 erkrankten Personen, kalkuliert das RKI mit einer geschätzten 5 Jahresüberlebensrate der Patienten von 62 %. Abhängig von der Tumorlokalisation variiert diese zwischen < 10 % bei Bauchspeicheldrüsenkrebs bis > 90 % für das maligne Melanom der Haut (Robert Koch-Institut, 2012). Bösartige Neubildungen sind mit 29 %, hinter Krankheiten des Kreislaufsystems mit 38 %, die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Robert Koch-Institut, 2011).

Im Folgenden wird explizit auf bösartige Gewebeneubildungen der Kopf- und Halsregion sowie des Ovars eingegangen, da Zellen und Tumoren dieser Tumorentitäten die experimentelle Grundlage der vorliegenden Arbeit bildeten.

### **1.2 Plattenepithelkarzinome der Kopf- und Halsregion**

Zu Tumorerkrankungen der Kopf- und Halsregion zählen bösartige Neubildungen der Mundhöhle inklusive Zunge und Speicheldrüsen, Geschwulste des Larynx und Pharynx, der Lippe, der Kiefer- und Nasenhöhle, der Schilddrüse sowie der Schleimhäute von Mund und Nasenhöhlen. Bei Tumoren dieser Lokalisationsgruppe handelt es sich mit einer Wahrscheinlichkeit > 90 % um maligne Entartungen epithelialen Ursprungs (Robert Koch-Institut, 2012).

Im Rahmen der durchgeführten experimentellen Untersuchungen wurde mit zwei humanen Tumorzelllinien gearbeitet, die aus Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) etabliert wurden.

#### **1.2.1 Epidemiologie und Klassifizierung**

Im Jahr 2008 erkrankten nach Angaben des RKI in Deutschland 9.520 Männer und 3.490 Frauen an bösartigen Neubildungen des Kopf-Hals-Bereichs. Dies entsprach 3 % aller Krebsneuerkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter betrug 61 Jahre für Männer und 66 Jahre für Frauen. Des Weiteren zeigten sich bei Frauen mit 59 % im Vergleich zu Männern mit 44 % die günstigeren Fünfjahresüberlebensraten (Robert Koch-Institut, 2012). Dass Männer häufiger und früher erkranken und ungünstigere Prognosen haben, hängt mit dem bei Männern größeren Anteil der durch Tabak- und Alkoholkonsum geförderten Krebserkrankungen von Zunge, Mundboden und Hypopharynx zusammen

(Blot et al., 1988; Blot, 1992; Robert Koch-Institut, 2003; Robert Koch-Institut, 2006). Für das Jahr 2012 prognostizierte das RKI über 10.000 Neuerkrankungen bei Männern und eine Zunahme bei Frauen gegenüber 2008 um 9 % auf insgesamt 3.800 Inzidenzen. Die Sterberate ist altersstandardisiert bei den Frauen gleichbleibend und bei den Männern leicht rückläufig, was auf Fortschritte in der Tumorbehandlung zurückzuführen ist (Robert Koch-Institut, 2012).

Die Kopf-Hals-Tumoren werden auf Grundlage des TNM-System (tumor, node, metastasis) eingeteilt und klassifiziert (Weber et al., 2010; Wittekind und Meyer, 2010). Hierbei wird durch ein Codesystem aus Buchstaben und Zahlen eine Charakterisierung des Tumors vorgenommen, anhand derer eine Stadien-Einteilung der Erkrankung möglich ist. Die Kategorie T der TNM-Klassifikation steht hierbei für die Größe, die Ausdehnung und den Grad der Tiefeninfiltration des Primärtumors. Die Kategorie N kodiert den Befall regionaler Lymphknoten nach Größe, Anzahl und Lokalisation zum Primärtumor. M beschreibt das Fehlen (M0) oder Vorhandensein (M1) von Fernmetastasen.

Die auf Basis der TNM-Klassifikation definierten Tumorstadien des American Joint Committee on Cancer (AJCC) sind in die Stufen I bis IV und mehrere Untergruppen A bis C untergliedert (Tabelle 1).

**Tabelle 1: AJCC-Stadien der Kopf-Hals-Tumoren**  
Einteilung der Tumorstadien anhand TNM-Klassifikation.

<b>TNM-Stadien</b>	<b>Tumor (T)</b>	<b>Node (N)</b>	<b>Metastasis (M)</b>
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>III</b>	T1	N1	M0
<b>III</b>	T2	N1	M0
<b>III</b>	T3	N0,N1	M0
<b>IVA</b>	T1 - 3	N2	M0
<b>IVA</b>	T4a	N0 - N2	M0
<b>IVB</b>	Jedes T	N3	M0
<b>IVB</b>	T4b	Jedes N	M0
<b>IVC</b>	Jedes T	Jedes N	M1

Die Klassifikation des Tumorstadiums nach TNM-System definiert den Behandlungsplan, erleichtert den Informationsaustausch und gibt außerdem einen Hinweis auf die Patientenprognose.



### **1.2.2 Risikofaktoren**

Die größten Risikofaktoren für Tumorerkrankungen des Kopf- und Halbereichs sind Tabak- und Alkoholkonsum, die zusammen das Erkrankungsrisiko potenzieren (Blot et al., 1988). Raucher erkranken bis zu sechsmal häufiger an Tumoren dieser Lokalisationsgruppe als Nichtraucher. Das Larynxkarzinom ist bei Nichtrauchern fast unbekannt; bei 30-40 Zigaretten täglich erhöht sich das Risiko einer Erkrankung um den Faktor 33 (Pfeifer et al., 2006). Auch der orale Genuss von Tabak, in Form von Kautabak, stellt ein Risiko dar (Hirsch et al., 2012; Madani et al., 2012). Weitere Risikofaktoren sind unzureichende Mundhygiene und ein zu geringer Verzehr von Obst (Helen-Ng et al., 2012; Zheng et al., 1990). Für einige Krebserkrankungen im Nasen- und Rachenraum wird auch eine Beteiligung von Viren (human papillomavirus) an ihrer Entstehung diskutiert (Kreimer et al., 2005). Bei Karzinomen der Lippe trägt Sonnenexposition zur Krebsentstehung bei (Maruccia et al., 2012).

### **1.2.3 Symptome, Diagnose, Therapie und Prognose**

In den meisten Fällen werden die Kopf-Hals-Tumoren vom Patienten im fortgeschrittenen Stadium anhand ihrer Symptome selbst entdeckt. Symptome, die auf einen Tumor im Kopf-Hals-Bereich hinweisen, sind dauerhafte Lymphknotenschwellungen am Hals, Schluckbeschwerden, Heiserkeit, Mundgeruch, Einschränkungen der Zungenbeweglichkeit sowie Schwellungen oder nicht abheilende Wunden im Mundbereich. Die endgültige Diagnose erfolgt mittels einer histologischen Klassifizierung sowie sonografischer, endoskopischer und computergestützter Diagnoseverfahren. Therapeutisch wird in Abhängigkeit von der Ausbreitung des Tumors in angrenzende Gewebe eine möglichst vollständige Entfernung angestrebt. Zusätzlich ist eine zervikale Lymphknotenausräumung, abhängig von Art und Umfang der Lymphknotenmetastasen, häufig unumgänglich. Im Rahmen der Radiotherapie werden üblicherweise tumorizide Gesamtdosen von 66-72 Gy mit Einzelfraktion à 2 Gy täglich (5 Tage/Woche) verabreicht. Die alleinige Chemotherapie hat keine kurative Wirkung, erfolgt deshalb im Rahmen einer kombinierten Radiochemotherapie, was als Goldstandard bei fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren gilt. Letztlich führt die oftmals verspätete Diagnose zu einer erheblichen Verschlechterung der Prognose, jedoch sind auch bei sehr weit fortgeschrittenen Tumoren mit kombinierten Therapieformen gute Ergebnisse und in Einzelfällen auch Heilung erreichbar (Pfeifer et al., 2006).

### 1.3 Ovarialkarzinome

Histologisch handelt es sich bei bösartigen Neubildungen der Eierstöcke überwiegend (> 90 %) um Karzinome, die sich vom Oberflächenepithel ableiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen humanen Ovarialkarzinomzelllinien gearbeitet, die aus dem Primärtumor bzw. Aszites etabliert wurden.

#### 1.3.1 Epidemiologie und Klassifizierung

Auf bösartige Neoplasien des Ovars entfallen 4 % aller Tumorerkrankungen und 6 % aller Krebssterbefälle der Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren. Die Erkrankungsfälle nehmen in Deutschland seit den 1990er Jahren deutlich ab, die Sterbefälle hingegen weniger deutlich. Das relative Fünfjahresüberleben liegt derzeit bei etwa 40 % und ist im Vergleich zu anderen Krebskrankheiten der Geschlechtsorgane eher niedrig (Robert Koch-Institut, 2012).

Die Stadien-Einteilung für Tumorerkrankungen der weiblichen Geschlechtsorgane erfolgt anhand der FIGO-Klassifikation (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique). Bei dieser Einteilung werden entsprechend der Krankheitsausbildung vier Stadien definiert (Benedet et al., 2000; Wittekind und Meyer, 2010).

**Tabelle 2: FIGO-Stadien der Ovarialkarzinome**  
Einteilung der Tumorstadien anhand der FIGO-Klassifikation.

FIGO-Stadien	Unterscheidungskriterium
I	Tumor ist auf das Ovar begrenzt
II	Ausbreitung auf das kleine Becken
III	Mikroskopische peritoneale Metastasen außerhalb des kleinen Beckens nachgewiesen oder Lymphknotenmetastasierung
IV	Fernmetastasen außerhalb der Peritonealhöhle

#### 1.3.2 Risikofaktoren

Verletzungen des Oberflächenepithels während der Ovulation spielen eine wesentliche Rolle in der Entstehung des Ovarialkarzinoms. Das Risiko steigt demzufolge mit der zunehmenden Zahl an Ovulationen während des Lebens einer Frau. Etwa 10 % der Erkrankungen sind genetisch bedingt. Ein erhöhtes Risiko für Eierstockkrebs tragen Frauen, deren Verwandte ersten Grades Brust- oder Eierstockkrebs hatten. Protektiv wirken Schwangerschaften, langjährige Einnahme von Ovulationshemmern sowie lange Stillperioden (Hunn und Rodriguez, 2012).

### **1.3.3 Symptome, Diagnose, Therapie und Prognose**

Typische Frühsymptome fehlen genauso wie eine effektive Screening-Untersuchung zur Früherkennung von Ovarialkarzinomen. Die Diagnosestellung erfolgt durch sonographische, bildgebende Verfahren.

Wichtigstes Therapieprinzip ist die operative Entfernung des tumorösen Gewebes. Ab einem fortgeschrittenen Stadium ist zusätzlich eine Chemotherapie, üblicherweise Carboplatin, in Kombination mit dem Taxan Paclitaxel obligat (Hunn und Rodriguez, 2012; Partridge und Barnes, 1999). Die Strahlentherapie spielt bei der Primärtherapie von Ovarialkarzinomen, auf Grund ihrer Lokalisation im Abdomen, derzeit eine untergeordnete Rolle. Das Abdomen und dessen Organe haben eine eingeschränkte Strahlenverträglichkeit. Die Ganzabdomenbestrahlung wird auf Grund dessen nur bei speziellen Indikationen durchgeführt, z. B. zur Behandlung postoperativer Tumorreste < 0,5 cm. Moderne Bestrahlungstechniken wie die intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT), die eine exakte Anpassung der Dosisverteilung an das Zielvolumen mit bestmöglicher Schonung umgebender Risikoorgane ermöglicht, könnten die Radiotherapie wieder als erfolgreiche Behandlungsmethode bei Ovarialkarzinomen konsolidieren (Dohr et al., 2008).

Die Patientenprognose ist stark abhängig vom Tumorstadium bei Diagnosestellung. Infolge des weitestgehend symptomlosen Krankheitsverlaufs werden 75 % der Erkrankungsfälle erst im Stadium III und IV erkannt, einhergehend mit einer dementsprechend schlechten Fünfjahresüberlebensrate von 40 % bzw. 11 %. Die vergleichsweise gut behandelbaren Frühstadien I und II werden mit 25 % eher selten diagnostiziert, die Überlebensraten sind mit 90 % bzw. 60 % jedoch um ein Vielfaches höher (Benedet et al., 2000; Pfeifer et al., 2006). Ein weiterer Prognosefaktor bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen ist der postoperative Tumorrest. Die beste Prognose haben Patientinnen, die tumorfrei operiert werden konnten (Kommos et al., 2010).

## **1.4 Tumorstoffwechsel**

Die maligne Transformation führt innerhalb des Zellstoffwechsels zu einer Umgestaltung zahlreicher Prozesse: Modifikationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, Hochregulation glykolytisch relevanter Enzyme und Transporter sowie Erhöhung der Fehlerhaftigkeit in Prozessen der oxidativen Phosphorylierung. Letztendlich haben Tumorzellen einen im Vergleich zu ihrem Ursprungsgewebe auffallend abgewandelten Stoffwechsel (Hanahan und Weinberg, 2011; Tennant et al., 2010).

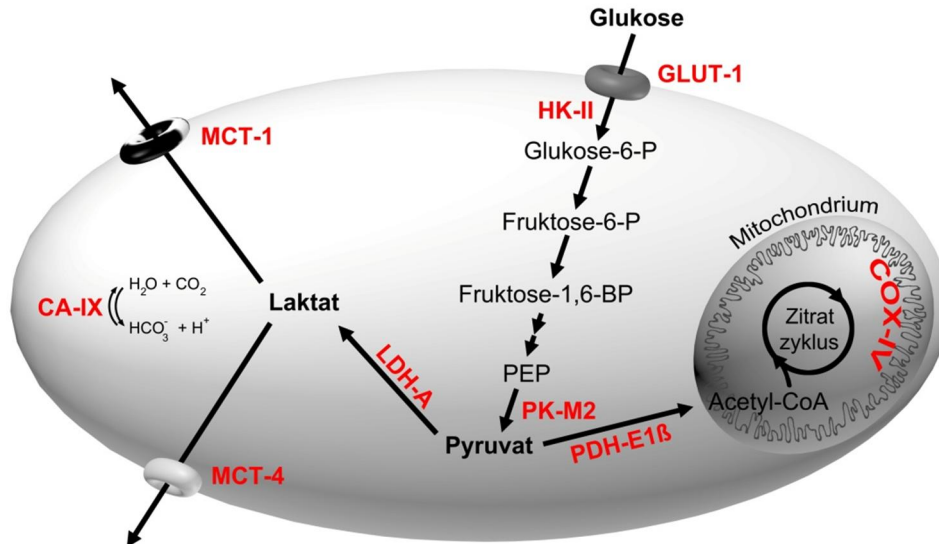
### **1.4.1 Besonderheiten des Tumorstoffwechsels**

Ein grundlegendes Charakteristikum tumoröser im Vergleich zu nicht malignen Zellen ist die hochregulierte Aufnahme und Umsetzung von Glukose, selbst unter Anwesenheit von Sauerstoff (Hanahan und Weinberg, 2011). Dieses Phänomen, das mit einem erhöhten Glukoseverbrauch und einer gesteigerten Bildung und Akkumulation von Laktat einhergeht, wurde im letzten Jahrhundert von Otto Warburg erforscht und als „Warburg Effekt“ oder „aerobe Glykolyse“ deklariert. Die Beobachtungen führten ihn zu der Hypothese, dass Tumorzellen infolge einer dysfunktionalen mitochondrialen Atmung ihren Energiebedarf durch eine Erhöhung der Glykolyserate kompensieren müssen (Warburg, 1956). In späteren Studien konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Tumorzelllinien keinen Defekt im oxidativen Abbau von Glukose besitzen, die onkogene Transformation dessen ungeachtet jedoch die Überexpression glykolytischer Enzyme und Glukose-assoziiierter Transporter und eine gesteigerte Glykolyse bedingt (Moreno-Sanchez et al., 2007). Die Frage, warum Tumorzellen diesen Stoffwechselweg bestreiten, ist noch nicht vollends geklärt. Nachweislich bietet die aerobe Glykolyse einige Vorteile für schnell proliferierende Zellen. Erstens kann die offensichtlich geminderte Energieausbeute von Tumorzellen gegenüber nicht entarteten Zellen, begründet auf der unvollständigen Oxidation von Glukose, durch den erhöhten glykolytischen Flux kompensiert werden. Zweitens liefert die gesteigerte Glykolyserate Intermediate für die Biosynthese: Ribose-Zucker für Nukleotide, Glycerol und Zitrat für Lipide und durch den Pentosephosphatweg Nicotinamidadeninindinukleotidphosphat (NADPH). Offen bleibt die Frage, warum so viel Laktat gebildet wird, obwohl eine gesteigerte Oxidation von Pyruvat möglich wäre. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die gesteigerte Glykolyse die zelluläre Kapazität der Pyruvatoxidation übersteigt und gleichzeitig das zytosolische  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ -Verhältnis derart verschiebt, dass die Tumorzelle zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels alternative und schnellere Wege nutzen muss (DeBerardinis et al., 2008; Tennant et al., 2010).

#### **1.4.1.1 Expression stoffwechselrelevanter Proteine**

Die Expression stoffwechselrelevanter Proteine ist in Tumorzellen oftmals gegenüber nicht entarteten Zellen des Ursprungsgewebes verändert. Glykolytische Enzyme und Glykolyse-assoziierte Transporter sind häufig hochreguliert, um den gesteigerten glykolytischen Flux zu bewerkstelligen. Simultan liegen bei Proteinen der mitochondrialen Atmung oftmals Mutationen vor, die ihre Funktion einschränken.

Die in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Expression untersuchten Proteine sind in Abbildung 1 rot markiert. Ihre Lokalisation und Funktion innerhalb des Zellstoffwechsels wird im Folgenden verdeutlicht.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Glukose- und Energiestoffwechsels**

Gezeigt ist eine vereinfachte und schematische Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Proteine (rot) des Glukose- und Energiestoffwechsels. Durch membranständige Glukosetransporter, wie z. B. GLUT-1, gelangt die Glukose in die Zelle und wird durch die HK-II zu Glukose-6-P phosphoryliert und im Rahmen der Glykolyse weiter metabolisiert. Das letzte Enzym der Glykolyse, PK-M2, katalysiert die Dephosphorylierung von PEP zu Pyruvat. Dieses kann mittels der LDH-A zu Laktat reduziert oder durch den PDH-Komplex zu Acetyl-CoA decarboxyliert und im Zitrat-Zyklus vollständig zu CO<sub>2</sub> oxidiert werden. Hierbei gebildete energiereiche Moleküle (NADH, FADH<sub>2</sub>) übertragen ihre Elektronenpaare auf Proteinkomplexe der Atmungskette (COX I bis IV). In der oxidativen Phosphorylierung wird die elektromotorische in eine protonenmotorische Kraft und schließlich in ein Phosphorylgruppenübertragungspotenzial umgewandelt. Mittels MCT-1 und MCT-4 werden Monocarboxylate, wie z. B. Laktat, konzentrationsabhängig aus der Zelle hinaus transportiert. Sie und die CA-IX sind an der intrazellulären pH-Regulation beteiligt. GLUT-1 = Glukosetransporter-1; HK-II = Hexokinase-II; PK-M2 = Pyruvatkinase-M2; PDH-E1β = Pyruvatdehydrogenase-E1β; COX-IV = Cytochrom-c-Oxidase-IV; MCT-1 = Monocarboxylattransporter-1; MCT-4 = Monocarboxylattransporter-4; LDH-A = Laktatdehydrogenase-A; CA-IX = Carboanhydrase-IX.

Der gesteigerte Bedarf an Glukose wird in Tumorzellen durch eine Überexpression der Glukosetransporter gedeckt. Neben mehreren Isoformen ist das Protein GLUT-1 in zahlreichen Tumorentitäten am häufigsten und ist mit einer um den Faktor 10 gesteigerten Aktivität mitverantwortlich für die erhöhte Glukoseaufnahme im Vergleich zu nicht entarteten Zellen (Moreno-Sanchez et al., 2007). Die gesteigerte Glukoseaufnahme ist innerhalb verschiedenster Tumorentitäten ausreichend verbreitet, um sie beispielsweise in Form der <sup>18</sup>Fluor-2-deoxy-D-glukose Positronen-Emissions-Tomographie diagnostisch zu nutzen.

Das erste Enzym der Glykolyse, die Hexokinase und insbesondere die Isoform II (HK-II), spielt eine kritische Rolle in der Initiierung und Aufrechterhaltung der gesteigerten

Glykolyserate schnell wachsender Tumorzellen. Die gesteigerte Expression von HK-II katalysiert die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-phosphat (Glukose-6-P) und bindet diese somit im Zytoplasma (Pelicano et al., 2006). Das letzte Enzym der Glykolyse, die Pyruvatkinase (PK), dephosphoryliert das Protein Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat und phosphoryliert den Energieträger Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintri-phosphat (ATP). Tumorzellen überexprimieren hauptsächlich die Isoform M2 (PK-M2), die zusätzlich zu ihrer katalysierenden auch regulatorische Funktionen besitzt und ein Schlüsselenzym der aeroben Glykolyse darstellt (Tamada et al., 2012).

Die weitere Oxidation von Pyruvat bedingt dessen Transport in die mitochondriale Matrix und die Umsetzung durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDC). Er besteht aus multiplen Kopien dreier Enzym-Untereinheiten, die jede eine Teilreaktion katalysieren. Die PDC-Aktivität ist durch freie Acetyl-CoA-Level und die  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  Ratio, die beide auf Grund der gesteigerten Glykolyse gemindert sind, in Tumorzellen gehemmt. Zudem phosphoryliert und inaktiviert die in Tumoren oftmals überexprimierte Pyruvatdehydrogenase-Kinase-1 (PDK-1) den PDC und somit die mitochondriale Aktivität (Papandreou et al., 2011). Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass die maximale enzymatische Umsatzgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  des Enzyms Pyruvatdehydrogenase (PDH-E1) in Tumorzellen nicht ausreicht, um einer zytotoxischen Anreicherung von Pyruvat entgegenzuwirken (Feron, 2009).

Glykolytisch hochaktive Zellen benötigen somit ein effektives System, um eine schnelle Verstoffwechselung von Pyruvat, auch unter aeroben Bedingungen, zu gewährleisten. Die Expression der Laktatdehydrogenase-A (LDH-A) wird von zahlreichen Onkogenen induziert und liegt dementsprechend in Tumorzellen stark überexprimiert vor. Es katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Laktat bei gleichzeitiger Oxidation des Kosubstrats NADH zu  $\text{NAD}^+$ , das somit den glykolytischen Enzymen wieder zur Verfügung steht (Feron, 2009).

Das hierbei gebildete Laktat liegt in der Zelle in seiner dissoziierten Form vor und kann nur mit Hilfe spezieller protonengekoppelter Transportproteine, den sogenannten Monocarboxylat-Transportern (MCTs), die Zellmembran passieren. MCTs sind Mitglieder der so genannten solute-linked carrier 16, einer humanen Genfamilie mit bisher 14 Mitgliedern. MCT-1 bis MCT-4 transportieren Pyruvat, Laktat und Ketonkörper im Symport mit Protonen ( $\text{H}^+$ ), entsprechend dem intra- zu extrazellulären Konzentrationsverhältnis, sowohl aus der Zelle heraus als auch in umgekehrter Richtung. MCTs spielen somit eine Doppelrolle in der Aufrechterhaltung des Tumorstoffwechsels: Sie gewährleisten den hohen glykolytischen Umsatz durch die Ausschleusung von Laktat und wirken durch den Kotransport eines  $\text{H}^+$  der Ansäuerung des Zytoplasmas entgegen. Die Überexpression von MCTs in Tumorzellen konnte für unterschiedliche Tumorentitäten in unabhängigen

Studien wiederholt gezeigt werden (Pinheiro et al., 2012). Innerhalb epithelialer Ovarialkarzinome korrelierte zu dem die Überexpression von MCT-1 und MCT-4 signifikant mit der Tumorstadien-Einteilung, dem postoperativen Tumorrest sowie dem Vorhandensein von Aszites (Chen et al., 2010).

Neben MCTs sind noch andere pH regulierende Mechanismen in der Zellmembran lokalisiert und wirken dem aziden Mikromilieu von Tumoren entgegen. Die Carboanhydrase-IX (CA-IX) hydratisiert Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) zu Kohlensäure ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) und umgekehrt, die in wässriger Lösung zu Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) und einem  $\text{H}^+$  dissoziiert. Die Überexpression von CA-IX korreliert für Ovarial- und Kopf-Hals-Tumoren mit einer reduzierten Fünfjahresüberlebensrate der Patienten sowie mit einem geminderten Ansprechen auf Chemotherapeutika (Eckert et al., 2012; Williams et al., 2012).

Eine weitere Variation im Vergleich zu nicht entarteten Zellen betrifft die mitochondriale Atmung von Tumorzellen. Defizite in Form von zahlreichen Mutationen innerhalb des mitochondrialen Genoms (mtDNA) können alle vier Enzymkomplexe (COX I bis IV) betreffen und führen zu Fehlfunktionen. Zugleich intensiviert die fehlerhafte mitochondriale Atmung die Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) und führt somit zu einer verstärkten Bildung reaktiver  $\text{O}_2$ -Spezies (ROS). Simultan beeinflusst die metabolische Umschaltung von oxidativer Phosphorylierung zu einer hochregulierten Glykolyse die mitochondriale Atmung von Tumorzellen (Lemarie und Grimm, 2011).

### **1.4.1.2 Zellulärer Energiestoffwechsel und Redoxstatus**

Tumorzellen weisen trotz einheitlicher metabolischer Tendenzen zum Teil starke Differenzen bezüglich der Ausprägung ihres deregulierten Stoffwechsels auf. Bereits Tumoren gleicher Entität zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihres Glukose- und Laktatgehalts sowie der Expression von Stoffwechsel-assoziierten Proteinen (Walenta et al., 2004; Ziebart et al., 2011).

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine starke Laktatanreicherung in Primärtumoren unterschiedlicher Entitäten mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko, einem gesteigerten Auftreten eines Lokalrezidivs und einer schlechten Patientenprognose einhergeht (Brizel et al., 2001; Walenta et al., 2000). Darüber hinaus konnte im Rahmen einer Studie mit xenotransplantierten humanen Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereiches nachgewiesen werden, dass ein hoher Laktatgehalt im Tumor mit einer erhöhten Strahlenresistenz korreliert (Quennet et al., 2006; Sattler et al., 2010b). Laktat ist somit nicht nur ein Malignitäts-Indikator, sondern beeinflusst möglicherweise aktiv die Strahlenresistenz eines Tumors. Die beschriebene erhöhte Malignität und die gesteigerte Resistenz gegenüber Gammabestrahlung könnten somit ihren Ursprung in der gesteigerten

glykolytischen Umsatzrate und der damit einhergehend erhöhten Bildung von Laktat entarteter Zellen haben. Ein Aspekt wäre die beschriebene antioxidative Eigenschaft von Laktat, in der Laktat als Radikalfänger für Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ -Anionen) und Hydroxyl-Radikale (OH-Radikale) fungiert und somit eine strahleninduzierte Radikalbildung und Fixation von DNA-Schäden mindern könnte (Groussard et al., 2000).

Das Endprodukt der Glykolyse, Pyruvat, gehört zur Gruppe der  $\alpha$ -Ketosäuren, die zur Neutralisation von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) beitragen. Im Rahmen einer nicht-enzymatischen Reaktion wird die  $\alpha$ -Ketosäure decarboxyliert und  $H_2O_2$  zu Wasser ( $H_2O$ ) und Acetat umgesetzt (Nath et al., 1995; Salahudeen et al., 1991).

Des Weiteren liefert der im Rahmen der Karzinogenese gesteigerte Glukosemetabolismus durch die Generierung von NADPH Reduktionsmittel zum enzymatischen Abbau von ROS. Als antioxidative Systeme fungieren Glutathion (GSH) und Thioredoxin  $Trx(SH)_2$ , die, katalysiert durch die Enzyme Glutathionperoxidase (GPx) und Thioredoxinperoxidase (TPx), Elektronen auf ROS übertragen und diese somit unschädlich machen. Die oxidierten Moleküle GSSG und  $Trx(S)_2$  müssen im Rahmen einer Redoxreaktion unter Einfluss von Glutathionreduktase (GR) und Thioredoxinreduktase (TrxR) sowie NADPH wieder in ihren reduzierten Zustand überführt werden, um erneut antioxidativ wirksam zu sein (Simons et al., 2007).

Der in Tumorzellen gesteigerte Glukosemetabolismus generiert somit zahlreiche Intermediate mit antioxidativen Eigenschaften (Abbildung 2), deren Inhibition in zahlreichen Studien zu einer Steigerung des zellulären oxidativen Stresses und einem erhöhten Zelltod führte (Fath et al., 2009).

Die vom Glukosemetabolismus ausgehende antioxidative Kapazität steht der erhöhten mitochondrialen ROS-Produktion kanzerogener Zellen gegenüber (Ahmad et al., 2005).

Hyperreaktive ROS, wie das  $O_2^-$ -Anion, entstehen unter anderem in den Mitochondrien als Nebenprodukt der Zellatmung, wobei besonders die Komplexe I und III als Hauptquellen der ROS-Bildung angesehen werden (Lenaz et al., 2006; Turrens, 1997). Auf Grund der hohen Toxizität von ROS besitzen Zellen spezielle antioxidative Abwehrmechanismen zu deren Neutralisation. Ein wichtiger enzymatischer Radikalfänger ist das Enzym Superoxiddismutase (SOD). Es fängt  $O_2^-$  ab, indem es die Umwandlung zweier Radikale in  $H_2O_2$  und  $O_2$  katalysiert.  $H_2O_2$  wird durch nachfolgende enzymatische oder nicht-enzymatische Schritte neutralisiert.

Der zelluläre Redoxstatus basiert somit auf einem Gleichgewicht zwischen toxischen Stoffwechselederivaten und zellulären Verteidigungsstrategien. Dieses Gleichgewicht nutzen Onkologen als Angriffspunkt für zahlreiche Krebstherapien. Durch gezielte Manipulation des Redoxsystems mittels biochemischer Stoffwechselmanipulatoren ist es möglich, die Effektivität anderer ROS-erzeugender Therapieformen, wie beispielsweise



Strahlen- oder Chemotherapie, zu erhöhen (Pelicano et al., 2003; Scarbrough et al., 2012; Simons et al., 2007).

Der Einfluss von Stoffwechselmanipulatoren, wie etwa Oxamat (OXA), 2-Deoxy-D-glukose (2DG) und Rotenon (ROT), sowie von Strahlentherapie auf den Energiestoffwechsel und Redoxstatus von Tumorzellen wird in den folgenden Kapiteln 1.4.2 und 1.5 genauer erläutert.

### **1.4.2 Stoffwechselmanipulation von Tumorzellen**

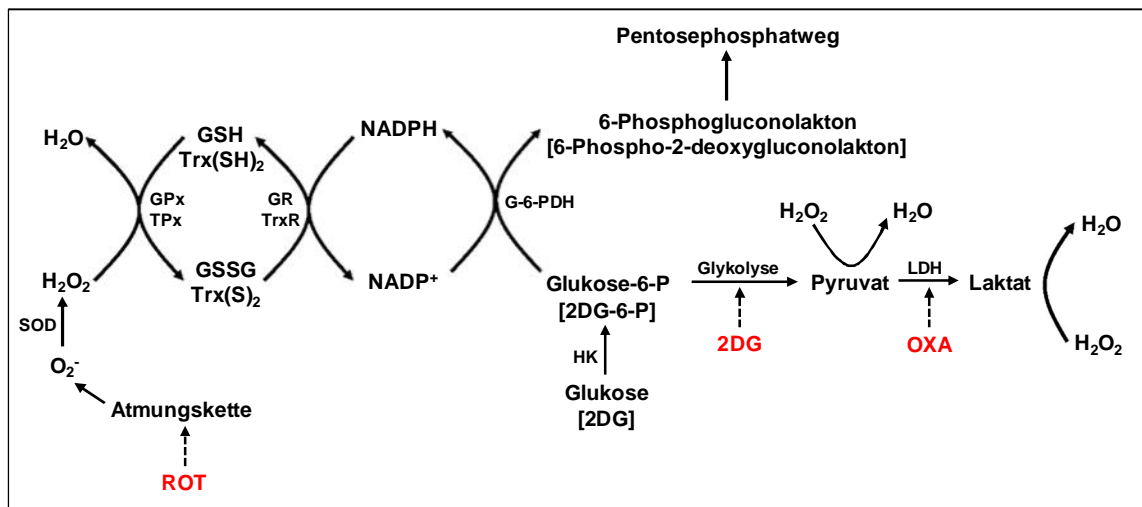
Ein großes Forschungsfeld untersucht Stoffwechseleigenschaften von Tumorzellen, die sich grundlegend von gesunden Zellen unterscheiden, um gezielte Angriffe auf jene entarteten Zellen mit systemischen Therapien zu realisieren (Sattler et al., 2010a). Die in dieser Arbeit verwendeten Stoffwechselmanipulatoren OXA, 2DG und ROT, deren Angriffspunkte in Abbildung 2 zu sehen sind, greifen diese Idee auf und wirken auf den Stoffwechsel und Redoxstatus von Tumorzellen.

OXA ist ein Strukturanalogon zu Pyruvat, dem eine Wirkung als  $H_2O_2$  Radikalfänger nachgewiesen werden konnte (Nath et al., 1995; Salahudeen et al., 1991). Außerdem ist OXA ein kompetitiver und spezifischer Inhibitor der LDH (Abbildung 2). Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von OXA die LDH-Aktivität und somit die Laktatproduktionsrate verringert und das Tumorumfang von Experimentaltumoren gegenüber unbehandelten Kontrolltumoren reduziert (Zhao et al., 2011). Obendrein konnte durch Gabe von OXA die Wirkung des Chemotherapeutikums Paclitaxel gesteigert und chemoresistente Brustkrebszelllinien resensitiviert werden (Zhou et al., 2010).

2DG ist ein Glukoseanalogon, dessen zweite Hydroxylgruppe durch Wasserstoff ersetzt ist. Die HK, die für die Umwandlung von Glukose zu Glukose-6-P zuständig ist, verstoffwechselt 2DG zu 2-Deoxyglukose-6-phosphat (2DG-6-P). Die Isomerisierung von 2DG-6-P durch das Enzym Glukose-6-phosphat-isomerase (GPI) ist chemisch nicht möglich. 2DG-6-P reichert sich folglich als nicht weiter zu metabolisierendes Intermediat in den Tumorzellen an (Abbildung 2).

Der Pentosephosphatweg wird durch die Verstoffwechslung von 2DG ebenfalls gestört. Die Glukose-6-phosphat-dehydrogenase (G-6-PDH) oxidiert 2DG-6-P unter Reduktion von  $NADP^+$  zu  $NADPH$ . Das hierbei gebildete 6-Phospho-2-deoxygluconolaktone kann durch den Pentosephosphatweg nicht weiter metabolisiert werden (Andringa et al., 2006). Der Einsatz von 2DG beeinflusst somit sowohl den zellulären Energiestoffwechsel durch die Inhibition von Glykolyse und Pentosephosphatweg als auch den Redoxstatus einer Zelle durch eine Abnahme von Pyruvat, Laktat sowie reduziertem  $NADPH$  (Abbildung 2).

Das Reduktionsäquivalent NADPH bedient das Thioredoxinperoxidase/Thioredoxinreduktase-System sowie das Glutathionperoxidase/Glutathionreduktase-System mit Elektronen, die ihrerseits Elektronen auf ROS übertragen und letztere somit unschädlich machen (Lin et al., 2003; Scarbrough et al., 2012). In zahlreichen unabhängigen präklinischen Studien konnte durch den Einsatz von 2DG eine signifikante Wachstumsinhibition, eine Reduktion der Strahlenresistenz sowie eine Sensibilisierung von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika nachgewiesen werden (Dwarkanath et al., 2001; Simons et al., 2007; Zhang et al., 2006).



**Abbildung 2: Der zelluläre Energiestoffwechsel und Redoxstatus unter dem Einfluss von Stoffwechselmanipulatoren**

Gezeigt ist der Zusammenhang zwischen Energiestoffwechsel und Redoxstatus (schwarz) sowie die Angriffspunkte der drei verwendeten Stoffwechselmanipulatoren 2DG, ROT und OXA (rot). Glukose konkurriert mit 2DG hinsichtlich der Aufnahme in die Zelle und die durch HK-II katalysierte Phosphorylierung in Glukose-6-P und 2DG-6-P. Glukose-6-P wird im Rahmen der Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt und optional durch die LDH weiter zu Laktat reduziert, beide sind bekannte Radikalfänger für  $H_2O_2$ . Die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat kann durch den kompetitiven Hemmstoff OXA inhibiert werden. 2DG-6-P hingegen kann die Glykolyse nicht weiter durchlaufen. Innerhalb des Pentosephosphatzyklus werden Glukose-6-P und 2DG-6-P durch die G-6-PDH zu 6-Phosphogluconolakton und 6-Phospho-2-deoxygluconolakton oxidiert bei gleichzeitiger Reduktion von  $NADP^+$  zu NADPH. 6-Phospho-2-deoxygluconolakton kann durch Enzyme des Pentosephosphatzyklus nicht weiter verstoffwechselt werden. NADPH dient als Reduktionsmittel für das Glutathionsystem, bestehend aus reduziertem GSH, dem oxidierten Dimer GSSG, GPx und GR, sowie für das Thioredoxinsystem, bestehend aus reduziertem  $Trx(SH)_2$ , oxidiertem  $Trx(S_2)$  und den Enzymen TPx und TrxR. Beide Systeme sind an der Neutralisation von  $H_2O_2$  beteiligt. Bildungsort für  $O_2^-$  ist unter anderem die mitochondriale Atmung. Das Enzym SOD wandelt  $O_2^-$  in  $H_2O_2$  um, welches durch genannte Systeme abgebaut wird. ROT inhibiert die Atmungskette und verändert somit die mitochondriale  $O_2^-$ -Bildung. Modifiziert nach Simons et al. (2007).

ROT ist ein Naturstoff, dessen toxische Wirkung auf einer Blockade der Elektronenübertragung am ersten Proteinkomplex der Atmungskette beruht. Die NADH-Q-Oxidoreduktase katalysiert diesen ersten Schritt der Elektronentransportkette, indem sie NADH oxidiert und zwei Elektronen auf das Coenzym Q (Ubichinon) überträgt. Durch den Fluss von Elektronen vom NADH zum Coenzym durch die NADH-Q-Oxidoreduktase

werden vier  $H^+$  aus der Matrix des Mitochondriums herausgepumpt und ein  $H^+$ -Gradient aufgebaut, dessen Rückfluss durch die ATP-Synthase die Bildung von ATP generiert (Berg et al., 2012). Neben seiner Rolle innerhalb der Elektronentransportkette ist Komplex I eine Hauptbildungsquelle von mitochondrialen ROS. Die Übertragung einzelner Elektronen auf  $O_2$  führt hierbei zur Bildung von hochreaktiven  $O_2^-$ -Anionen (Lenaz et al., 2006; Pelicano et al., 2003). Die Gabe von ROT stimuliert die Bildung von ROS am Komplex I der Atmungskette und beeinflusst somit den zellulären Redoxstatus (Abbildung 2). In Studien konnte eine ROT bedingte Abnahme der Zellatmung und ATP-Synthese sowie Steigerung der ROS und Apoptoserate nachgewiesen werden (Li et al., 2003). Des Weiteren sensitiviert ROT Tumorzellen gegenüber exogenen Noxen, z. B. Gammabestrahlung, deren Zelltoxizität ebenfalls auf Radikalbildung basiert (Pelicano et al., 2003).

### 1.5 Strahlentherapie

Zur Therapie von Tumorerkrankungen werden verschiedene Strahlenqualitäten eingesetzt: Photonen-, Elektronen-, Protonen- oder Schwerionenstrahlung.

Die Photonenstrahlung ist die innerhalb der Strahlentherapie am häufigsten verwendete Strahlung. Sie kann durch die Wechselwirkung schneller Elektronen mit Materie (Röntgenstrahlung, hochenergetische Photonenstrahlung) oder aus Kernprozessen (Gammastrahlung) stammen. Eine Weiterentwicklung der Strahlentherapie ist beispielsweise die intensitätsmodulierte Radiotherapie (IMRT). Hierbei erfolgt eine dreidimensionale Bestrahlung des Zielgewebes; dies ermöglicht empfindliche Organe vom Bestrahlungsfeld auszuschließen und zu schonen.

UV-Strahlung wird nicht der Strahlentherapie zugeordnet und ist mit einer Wellenlänge zwischen 100-380 nm erheblich energieärmer als Gammastrahlung. Lediglich das kurzwellige Ende der UV-Strahlung besitzt genügend Energie, um bei Absorption Atome zu ionisieren, das heißt Elektronen aus den Atomhüllen zu lösen.

#### 1.5.1 Gammastrahlung

Gammastrahlung ist eine Photonenstrahlung mit einer Wellenlänge  $< 5$  pm und einer Energie  $> 200$  keV. Sie entsteht durch Kernreaktionen beim Zerfall radioaktiver Elemente. Therapeutisch genutzt wird beispielweise die beim radioaktiven Zerfall von  $^{60}\text{Co}$  oder  $^{137}\text{Cs}$  freigesetzte Gammastrahlung. Biologisch wirksam ist lediglich die in einem Körper absorbierte Energie, die so genannte Energiedosis. Sie wird in Gray (Gy) angegeben, wobei ein Gy einer Energie von einem Joule pro Kilogramm entspricht (Hiddemann und Bartam, 2010).

### 1.5.2 Strahlenbiologie

Die Strahlenbiologie befasst sich mit der Wirkung von Strahlung auf biologische Systeme. Das wichtigste biologische Target der Strahlentherapie ist die DNA mit dem Ziel der radio-genen Auslösung von DNA-Schäden (Einzel- und Doppelstrangbrüchen, Basenmodifikationen, Insertionen, Deletionen und Crosslinks). Nicht reparierte Schäden führen zum Zelltod via Apoptose, mitotischem Zelltod, Autophagy oder einem terminalen Wachstumsarrest (Thoms und Bristow, 2010).

Erfolgt die Energieabsorption und die Auslösung der biologischen Wirkung innerhalb des Zielmoleküls, wird von einer direkten Strahlenwirkung gesprochen. Bei der indirekten Wirkung erfolgt die Energieabsorption und Auslösung der biologischen Wirkung in unterschiedlichen Molekülen. Als Radikal wird ein Atom oder Molekül bezeichnet, das ein ungepaartes Elektron in der äußeren Elektronenhülle trägt. Da H<sub>2</sub>O-Moleküle 80 % der Zelle ausmachen, kommt es häufig zu deren Ionisierung. Die hierbei gebildeten Radikale, wie z. B. das OH-Radikal, ist stabil genug, um über kurze Distanzen zu diffundieren und in Wechselwirkung mit der DNA Läsionen zu erzeugen (Hall und Giaccia, 2006).

Neben H<sub>2</sub>O ist auch O<sub>2</sub> ein Radikalbildner. Die durch Strahlung gebildeten ROS, wie beispielsweise das hochreaktive O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Anion, führen durch Radikalkettenreaktionen zu einer sekundären Schädigung des biologischen Zielmoleküls (Cook et al., 2004). Auf Grund dessen sind hypoxische Tumoren strahlenresistenter als gut oxygenierte Tumoren. Darüber hinaus intensiviert die medikamentöse Reoxygenierung hypoxischer Zellen die Strahlentherapie (Overgaard, 2007).

Die Zahl der Schäden, die durch eine Bestrahlung an der DNA erzeugt werden, ist hingegen weit größer als die Zahl der Ereignisse, die zu Mutationen oder Nekrosen führen. Die Zellen verfügen über ein komplexes Reparatursystem, so dass der Großteil der Schäden folgenlos bleibt. DNA-Einzelstrangbrüche und Basenschäden werden durch die Basenexzisionsreparatur behoben. Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) erfolgt mittels non-homologous end joining (NHEJ) oder durch homologe Rekombination (Hall und Giaccia, 2006). Zudem besitzen Zellen eine Reihe an enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien, die durch ihre Wirkung als Radikalfänger die Zellen vor strahleninduzierten ROS schützen (Kapitel 1.4.1.2).

DSBs stellen den gravierendsten DNA-Schaden dar. Die Reparatur von DSBs mittels NHEJ verläuft ohne Vorlage einer Matrize, ist fehlerbehaftet und kann zu zahlreichen Mutationen führen (Hall und Giaccia, 2006). Die Quantifizierung initiiertes und residualer DSBs ist infolgedessen ein wichtiger Marker zur Charakterisierung der zellulären Strahlenantwort. Die Ausbildung eines DSBs bewirkt die Phosphorylierung der Histon-Untereinheit H2AX zu  $\gamma$ -H2AX (Kinner et al., 2008). Das phosphorylierte Protein ist immunologisch nachweisbar und ermöglicht somit die Detektion der DSBs in Form

sogenannter Foci innerhalb eines Zellkerns. Die Quantifizierung von  $\gamma$ -H2AX-Foci nach Gammabestrahlung ist eine in der Wissenschaft anerkannte Methode zur Visualisierung von DNA-DSBs und deren Reparatur (Mah et al., 2010).

### 1.6 Aufgabenstellung

In Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten experimentelle Untersuchungen zur Wechselbeziehung zwischen Proteom, Energiestoffwechsel, Redoxstatus und Radiosensibilität von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*. Zusätzlich wurde die Auswirkung einer gezielten Stoffwechselmanipulation auf die Ausbildung von DNA-DSBs und das klonogene Überleben nach Gammabestrahlung erforscht.

Hierzu wurden mittels In-Cell Western Expressionsanalysen ausgewählter Stoffwechselassoziierter Proteine durchgeführt. Ergänzend wurde die Enzymaktivität der LDH quantifiziert. Die energieliefernden Stoffwechselwege der Tumorzellen, die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung, konnten mit Hilfe einer modernen Messtechnik, dem Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 (Seahorse Bioscience), untersucht werden. Hierbei geben die extrazelluläre Azidifizierungsrate, die Kohlenstoffdioxidbildungsrate und die Sauerstoffverbrauchsrate Aufschluss über die Glykolyserate sowie die Aktivität der mitochondrialen Atmung. Zielsetzung war, durch die Seahorse-Methode das Verhältnis zwischen glykolytischer und oxidativer Energiegewinnung für die jeweils untersuchte Tumorzelllinie zu eruieren. In fortführenden Experimenten wurde mittels photometrischen und Lumineszenz-basierten Messverfahren die Konzentration bzw. der Umsatz weiterer Metabolite wie Glukose, Laktat und ATP analysiert. Die ermittelten Daten ergänzten die Charakterisierung des Energiestoffwechsels und dienten der Messdaten-Validierung des Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3.

Die Quantifizierung des zellulären oxidativen Stresses erfolgte durch die Analyse des Gehalts an  $O_2^-$ -Anionen mit der DHE-Fluoreszenzfärbung und durch die Bestimmung der SOD-Aktivität mittels eines kommerziellen Test-Systems. Darüber hinaus sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Energiestoffwechsel und dem zellulären Redoxstatus hergestellt werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss des Tumormikromilieus auf die Wirkung von Gammastrahlung untersucht. Es sollte die Hypothese überprüft werden, wonach eine hohe glykolytische Aktivität in Tumorzellen zu einer Anreicherung von antioxidativen Metaboliten und infolgedessen zu einer Strahlenresistenz führt (Sattler et al., 2010b; Sattler und Mueller-Klieser, 2009). Endpunkte zur Beurteilung der Strahlenwirkung waren das

zelluläre Überleben und die Häufigkeit sowie die Reparatur von DNA-Läsionen, welche anhand des Auftretens von  $\gamma$ H2AX-Foci untersucht wurden.

Zusätzlich wurde der Einfluss einer biochemischen und gentechnischen Stoffwechsellmanipulation auf den Energiestoffwechsel, Redoxstatus und die Strahlenantwort von Tumorzellen untersucht. Dabei kamen die biochemischen Inhibitoren OXA, 2DG und ROT zur Verwendung. Während OXA die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat inhibiert, reduziert 2DG die oftmals in Tumorzellen hochregulierte Glykolyserate (Sattler et al., 2010a). Die Wirkung von ROT beruht auf der Hemmung des Elektronentransports am Komplex I der Atmungskette und mindert somit die mitochondriale Atmung (Li et al., 2003).

Die gentechnisch manipulierten Tumorzellen wurden vom Kooperationspartner Herrn Dr. Indraccolo (Istituto Oncologico Veneto IRCCS, Padua, Italien) zur Nutzung bereitgestellt. Sie wurden mit einem shMCT-4 kodierenden Vektor transfiziert, wodurch die Expression des membranständigen Transporters MCT-4 reduziert wird. Es sollte erforscht werden, ob die gezielte biochemische oder gentechnische Manipulation des Tumorstoffwechsels zu einer Reduktion der Strahlenresistenz führt. Anhand manipulierter Zellen und mitgeführter Kontrollen wurde hierfür zum einen das klonogene Überleben und zum anderen die Ausprägung sowie Reparatur von DNA-DSBs nach Gammabestrahlung untersucht.

Nach den Analysen an herkömmlichen zweidimensionalen Zellkulturen wurden ausgehend von den untersuchten Tumorzelllinien unter Leitung von Herrn Dr. Indraccolo und Herrn Prof. Dr. Baumann Experimentaltumoren erzeugt und die Gehalte von ATP, Laktat, Glukose und Pyruvat in soliden Tumoren ermittelt. Hierzu kam die in der Arbeitsgruppe weiterentwickelte und etablierte Technik der bildgebenden Biolumineszenz (induced metabolic Bioluminescence Imaging, imBI) zum Einsatz. In parallelen Kryoschnitten wurde zusätzlich der Gehalt an  $O_2^-$ -Anionen mit der DHE-Fluoreszenzfärbung bestimmt. Die Charakterisierung des Expressionsmusters glykolytischer und stoffwechselrelevanter Proteine erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbungen an Tumorschnitten.

Abschließend sollte die Frage geklärt werden, ob die Überführung der Tumorzelllinien in das *in vivo* Modell zu einer Umformung der metabolischen und proteomischen Eigenschaften führt und ob das Modell für weiterführende Experimente hinsichtlich der Erforschung des Einflusses von Tumormikromilieu und Redoxstatus auf die Strahlen- und Chemotherapie am soliden Tumor nutzbar ist.

Strategisches Ziel des Projektes ist die Entwicklung neuer Tumorthérapien durch metabolisches Targeting, das heißt durch gezielte Intervention in tumortypische Stoffwechselwege sowie die Identifikation prädiktiver Tumormarker für die Radioonkologie.

## 2 MATERIALIEN und METHODEN

### 2.1 Zellkultivierung

#### 2.1.1 Tumorzelllinien

Zur Prüfung der dieser Arbeit zugrunde liegenden wissenschaftlichen Fragestellung wurden die im Folgenden beschriebenen humanen Tumorzelllinien und die daraus gewonnenen Experimentaltumoren (Xenografts) verwendet.

Die Zelllinie OC316 wurde 1994 aus Aszites eines niedrig differenzierten ovariellen Adenokarzinoms einer 60-jährigen Patientin etabliert und von Herrn Dr. Indraccolo (Istituto Oncologico Veneto IRCCS, Padua, Italien) zur Nutzung bereitgestellt. Die Patientin erhielt vor der Biopsieentnahme eine Behandlung mit Zytostatika (Alama et al., 1996).

Des Weiteren erzeugte Herr Dr. Indraccolo ausgehend von der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OC316 einen genetisch veränderten Zelltypus. Hierzu wurde die für MCT-4 shRNA kodierende DNA-Sequenz in das Genom von Lentiviren kloniert. Der erzeugte Vektor konnte mittels Transduktion in die OC316-Tumorzellen überführt werden. Die so genetisch veränderten Zellen wurden als OC316 shMCT-4 bezeichnet. Die mitgeführten Kontrollzellen OC316 shRNA wurden mit selbigem viralen Vektor transfiziert, jedoch exklusiv der shMCT-4 DNA-Sequenz.

Aus einem unbehandelten ovariellen Adenokarzinom einer 47-jährigen Patientin konnte 1982 die Zelllinie IGROV-1 konstituiert werden (Benard et al., 1985). Die Zelllinie IGROV-1 wurde ebenfalls von Herrn Dr. Indraccolo zur Verfügung gestellt.

Die Etablierung der Tumorzelllinien SAS und FaDu erfolgte aus humanen Plattenepithelkarzinomen der Kopf- und Halsregion. Beide HNSCC-Zelllinien wurden von Herrn Prof. Dr. Baumann (OncoRay-National Center for Radiation Reserach in Oncology, Dresden) bereitgestellt. SAS wurde 1989 aus einer schlecht differenzierten Primärläsion der Zunge fundiert (Takahashi et al., 1989). Die Etablierung von FaDu erfolgte 1968 aus einem hypopharyngealen Plattenepithelkarzinom eines 56-jährigen männlichen Hindus (Rangan, 1972).

Die aufgeführten Tumorzelllinien wurden auf Trockeneis nach Mainz überführt und bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

In der vorliegenden Arbeit findet hauptsächlich ein Vergleich der beiden Plattenepithelkarzinom- bzw. der beiden Ovarialkarzinomzelllinien untereinander statt. Auf die Gegenüberstellungen von Daten aus unterschiedlichen Tumorentitäten wird aufgrund der eingeschränkten Vergleichbarkeit, begründet durch verschiedene Kultivierungsbedingungen, überwiegend verzichtet.

Die adhärent wachsenden Zelllinien werden in Tabelle 3 bezüglich Herkunft und Histologie charakterisiert.

**Tabelle 3: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien hinsichtlich Herkunft und histologischer Klassifizierung**

Aufgeführt sind die Lokalisation der Läsion im Patienten sowie die histologische Einteilung entsprechend der Vorgaben der Union internationale contre le cancer (UICC) bzw. der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO).

Zelllinie	Ursprung	Histologie
OC316	Ovariales Adenokarzinom, Aszites	FIGO IV
OC316 shMCT-4	Ovariales Adenokarzinom, Aszites	N/A
OC316 shRNA	Ovariales Adenokarzinom, Aszites	N/A
IGROV-1	Ovariales Adenokarzinom, Primärtumor	FIGO III
SAS	Zunge, Primärläsion	Grad IV
FaDu	Hypopharynx, Primärläsion	Grad II

### 2.1.2 Medien und Zusätze

Die beiden Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 wurden in RPMI 1640-Medium (2,0 g/l Glukose und 2 mM L-Glutamin; PAA Laboratories GmbH) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS GOLD; PAA Laboratories GmbH), 10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; Carl Roth GmbH + CO. KG) und 1 mM Natriumpyruvat (AppliChem GmbH) versetzt kultiviert. Dem Medium der genetisch veränderten Zelllinien OC316 shRNA und OC316 shMCT-4 wurde zusätzlich 0,5 µg/ml Puromycin (PAA Laboratories GmbH) zugesetzt.

Die Kultivierung der Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und FaDu erfolgte in DMEM-Medium (4,5 g/l Glukose und 4 mM L-Glutamin; PAA Laboratories GmbH) mit folgenden Zusätzen: 10 % FCS GOLD, 1 % nicht essentielle Aminosäuren (PAA Laboratories GmbH), 10 mM HEPES und 1 mM Natriumpyruvat.

### 2.1.3 Kultivieren und Passagieren

Die Durchführung aller Zellkulturarbeiten erfolgte unter einer Sterilbank in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe eins. Es kamen nur sterile Materialien, Lösungen und Medien zum Einsatz. Die angefallenen Abfälle wurden vor der Entsorgung sterilisiert.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem Inkubator (HERAcell 240; Thermo Fisher Scientific Inc.) unter einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.



Hierzu wurden Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH) mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> oder 75 cm<sup>2</sup> verwendet. Das Volumen des Nährmediums pro Flasche wurde entsprechend der Wachstumsfläche angepasst und betrug 0,2 ml/cm<sup>2</sup>. Um eine adäquate Nährstoffversorgung zu gewährleisten, musste das verbrauchte Medium alle zwei bis drei Tage entfernt und durch frisches Nährmedium ersetzt werden. Zusätzlich wurden die Zellen einmal pro Woche aus der Kulturflasche abgelöst und ein Teil der Zellsuspension in eine neue Flasche überführt.

Dazu wurde das Medium aus der Zellkulturflasche verworfen und die Zellen mit 20 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) gelöst in 1x PBS pH 7,4 (phosphate buffered saline) gewaschen und mit Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH) von den Kulturflaschen abgelöst. Die hierbei verwendeten Volumina orientierten sich an der Wachstumsfläche der Kulturflaschen: 0,08 ml/cm<sup>2</sup> EDTA/PBS und 0,04 ml/cm<sup>2</sup> Trypsin/EDTA. Nach 5-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Reaktion mit 0,2 ml/cm<sup>2</sup> Nährmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellen gänzlich von Trypsin zu trennen erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 272 g für 5 min und 23 °C (Megafuge 1.0; Thermo Fisher Scientific Inc.). Anschließend wurde der Medienüberstand verworfen und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl, siehe Kapitel 2.1.4, wurde ein definiertes Volumen Zellsuspension in eine neue Kulturflasche mit frischem Medium überführt.

Die verwendeten Medien und Zusätze lagerten bei 2 °C und mussten vor dem Gebrauch im Wasserbad (Aqualine AL25; LAUDA GmbH & Co. KG) auf 37 °C erwärmt werden.

### **2.1.4 Zellzahlbestimmung**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des maschinellen Zellzählgeräts CASY<sup>®</sup> 1TT (Roche Innovatis AG). Das Messprinzip basiert auf der Pulsflächenanalyse. Hierzu wurden 100 µl Zellsuspension in 10 ml Isotonlösung (Casy<sup>®</sup>ton; Roche Innovatis AG) suspendiert und durch eine dünne Kapillare gespült. Dabei durchlaufen die Zellen ein Spannungsfeld, dessen Widerstand sich bei jedem Zelldurchtritt erhöht. Durch manuelle Anpassung des Messbereichs konnten Partikel, Zellartefakte und tote Zellen ausgeschlossen werden. Die Zellzahl/ml sowie Durchmesser (µm) und Volumen (fl) der Zellen ließen sich direkt auf dem Gerät ablesen.

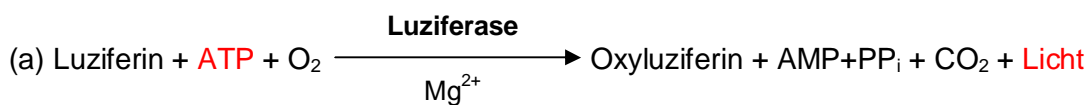
### **2.1.5 Mykoplasmentest (MycoAlert<sup>®</sup>)**

Mykoplasmen sind zellwandlose, parasitisch lebende Bakterien. Auf Grund ihrer geringen Größe (< 0,2 µm) lassen sie sich im Gegensatz zu anderen Bakterien nicht durch

Sterilfilter zurückhalten und sind lichtmikroskopisch nicht zu erkennen. Dementsprechend stellen Kontaminationen mit Mykoplasmen ein grundlegendes Problem in Zellkulturlaboren dar (Uphoff und Drexler, 2013).

Der verwendete Test „Mycoplasma Detection Kit Myco Alert<sup>®</sup>“ der Firma Lonza Group AG ist ein selektiver, biochemischer Test, der sich der Aktivität mykoplasmen spezifischer Enzyme bedient, um die Anwesenheit dieser zu detektieren.

Die Mykoplasmen wurden hierzu lysiert und die freigesetzten Enzyme katalysieren die Umwandlung des MycoAlert<sup>®</sup>-Substrats bei gleichzeitiger Phosphorylierung von ADP zu ATP. Der ATP-Gehalt wurde dabei über folgende Lumineszenz-basierte Reaktion (a) ermittelt:



Durch die luminometrische Messung des ATP-Gehalts vor (Messung E1) und nach Zugabe des MycoAlert<sup>®</sup>-Substrats (Messung E2) ließ sich ein Quotient (E2/E1) ermitteln, der Aufschluss über eine mögliche Kontamination gab (DTX 880 Multimode Detector; Beckman Coulter GmbH).

Der errechnete Quotient (E2/E1) ist folgendermaßen zu deuten: Quotient < 1, die Probe ist negativ für Mykoplasmen; Quotient > 1, die Probe ist mit Mykoplasmen kontaminiert. In einem Grenzbereich zwischen 1 und 1,3 sollte die entsprechende Kultur nach einer weiteren Inkubation von mindestens 24 h erneut getestet werden.

### 2.1.6 Kryokonservierung von Zellen

Nach maximal 20 Passagen wurden die Zellen verworfen und Zellen niedrigerer Passagen neu aufgetaut. Hierzu wurden tiefgefrorene Zellbanken in flüssigem Stickstoff angelegt.

Um eine Zerstörung der Zellmembran durch die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses zu verhindern, war es erforderlich, das entsprechende Zellkulturmedium mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) zu versetzen. Des Weiteren erfolgte der Einfrierprozess über 24 h schrittweise in einem Einfrierbehälter (Thermo Fisher Scientific Inc.) bei -80 °C, bevor die Zellen in -196 °C kalten flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Während des Auftauprozesses musste die toxische Eigenschaft des DMSO durch eine rasche Verdünnung in 9 ml Zellkulturmedium abgeschwächt werden. Darauf folgten ein Zentrifugationsschritt bei 272 g für 8 min und 23 °C (Megafuge 1.0; Thermo Fisher Scientific Inc.), das Verwerfen des Überstandes und das Resuspendieren des Zellpellets in

1 ml frischem Medium. Abschließend wurde die neue aufgetaute Zellsuspension in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit 4 ml Medium transferiert.

## **2.2 Wachstumskurven und Zellzahlverdopplungszeiten**

Die Zelllinien SAS, FaDu, OC316 und IGROV-1 wurden in zwei unabhängigen Versuchen mit 4.000 bzw. 5.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in einem Gesamtvolumen von 1 ml pro Well in mehrere 24-Well Platten (Greiner Bio-One GmbH) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Drei Wells pro Zelllinie wurden täglich und zu definierten Zeitpunkten abgelöst und gezählt.

Hierzu wurde der Medienüberstand entfernt und der Zellrasen zweimal mit 500 µl EDTA/PBS (20 mM EDTA gelöst in 1x PBS pH 7,4) gewaschen und anschließend mit 150 µl Trypsin/EDTA (PAA Laboratories GmbH) für 7 min im Inkubator behandelt. Abschließend wurden 350-1300 µl Medium hinzugegeben, die Zellen suspendiert und die Zellzahl mittels des Zellzählgeräts CASY<sup>®</sup> 1TT bestimmt. Die aus drei Ansätzen gemittelte Zellzahl/cm<sup>2</sup> wurde in Abhängigkeit von der Zeit halblogarithmisch aufgetragen. Durch die Messpunkte im exponentiellen Wachstumsbereich wurden lineare Regressionsgeraden gelegt und anhand deren Steigungen die Zellzahlverdopplungszeiten errechnet.

## **2.3 Analyse stoffwechselrelevanter Proteine**

### **2.3.1 In-Cell Western**

Die Methode des In-Cell Westerns bietet die Möglichkeit, die Expression von Proteinen mit Hilfe von Antigen-Antikörper-Reaktionen in Zellkulturen vergleichend zu quantifizieren. Das etablierte System bietet die Möglichkeit, einen großen Probensatz zeit- und kostensparend zu testen und vergleichend zu analysieren (Fabian et al., 2012).

Die Zellen der Linien OC316, IGROV-1 und SAS wurden mit einer definierten Zellzahl von 4,5 x10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>, die Zelllinie FaDu mit 6,0 x10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> in einem Gesamtvolumen von 100 µl in eine 96-Well Platte ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen wurde eine Konfluenz des Zellrasens von 80-90 % erreicht. Um vergleichbare Aussagen bezüglich der Proteinexpression treffen zu können, erfolgte die Aussaat aller vier Zelllinien auf einer Platte. Zusätzlich musste auf jeder Platte neben den für die Zielproteine notwendigen Wells ein Haushaltsprotein, in diesem Fall α-Tubulin, mitgeführt werden. Die α-Tubulin Proteinexpression wurde genutzt, um Varianzen in der Zelldichte zwischen den einzelnen Wells auszugleichen und die Messdaten zu normalisieren.

Alle folgenden Volumenangaben beziehen sich auf ein Well einer 96-Well Platte. Die Lösungen wurden an die Seitenwand des Wells pipettiert, um ein Ablösen der Zellen zu vermeiden. Längere Inkubationsschritte erfolgten auf dem Orbitalschwenker (Polymax 1040; Heidolph Instruments GmbH & Co. KG).

Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 200 µl kaltem 1x PBS gewaschen. Es folgte eine 10 min Inkubation mit 125 µl -20 °C kaltem Methanol. Nach Abklopfen des Methanols und Lufttrocknen der Zellen lagerte die Platte bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung.

Zu Beginn der Färbung wurde die Platte für 10 min bei 50 °C auf einer Heizplatte (H22 electronic; C. Gerhardt GmbH & Co. KG) enteist, mit 200 µl 1x PBS rehydriert und 10 min mit 125 µl 0,3%igem Triton-X100 (Sigma-Aldrich GmbH) in 1x PBS permeabilisiert. Nach einem Waschschrift mit 125 µl 1x PBS folgte das Blocken unspezifischer Antikörperbindungsstellen mittels 50 µl RotiBlock (Carl Roth GmbH + CO. KG), 1:10 verdünnt in 1x PBS. Nach dem Abklopfen des Blockierungsreagenz wurde mit zweimal 125 µl 1x PBS gewaschen und anschließend 125 µl 1x PBS in die Wells pipettiert. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, konnte das 1x PBS erst kurz vor Zugabe des Erstantikörpers aus dem jeweiligen Well entfernt werden. Im folgenden Schritt wurden 50 µl Erstantikörper in RotiBlock (1:10 in 1x PBS) gelöst bzw. RotiBlock als Negativkontrolle aufgetragen und 1 h inkubiert. Angaben zu den verwendeten Antikörpern und eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Darauf folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 200 µl 1x PBS. Der anschließende Peroxidase-Block mit 50 µl 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (AppliChem GmbH) in 1x PBS für 10 min diente zur Absättigung endogener Peroxidasen, die zu Hintergrundfärbungen bei Verwendung Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper führen können. Daran schlossen sich zwei Waschschriffe mit 200 µl bzw. 125 µl 1x PBS und die Inkubation von 50 µl Zweitantikörper (alle Dianova GmbH; Tabelle 4), verdünnt in RotiBlock (1:10 in 1x PBS), über einen Zeitraum von 30 min an. Durch dreimal 5-minütiges Waschen mit zweimal 200 µl und einmal 100 µl 1x PBS wurden die überschüssigen, nicht gebundenen Zweitantikörper entfernt und daraufhin der Leerwert E1 in 100 µl 1x PBS bei 655 nm Wellenlänge im Mikroplatten-Lesegerät (DTX 880 Multimode Detector; Beckman Coulter GmbH) photometrisch gemessen. Anschließend wurde das 1x PBS durch 100 µl Tetramethylbenzidin-Lösung (BD OptEIA; Becton Dickinson and Company), die zuvor auf Raumtemperatur gebracht worden war, ersetzt. Das Tetramethylbenzidin (TMB) wurde durch die Peroxidasen des Zweitantikörpers zu einem löslichen blauen Farbstoff umgewandelt. Je nach Farbintensität erfolgte die Messung der Extinktion (E2) nach 20-30 min.

$\Delta E$  der einzelnen Wells ergab sich aus der Subtraktion der Leerwerte E1 von den Messwerten nach TMB-Zugabe E2 ( $\Delta E = E2 - E1$ ). Da alle Messungen in Dreifachbestimmung

durchgeführt wurden, konnte aus allen  $\Delta E$ -Triplets der Mittelwert (MW) berechnet und der MW der Negativkontrollen (ohne Erstantikörper) vom MW der Positivfärbungen subtrahiert werden. Die Proteinexpressionen wurden auf das Haushaltsprotein  $\alpha$ -Tubulin normiert und für die beiden Ovarialkarzinomzelllinien auf IGROV-1 (= 100 %) bzw. innerhalb der HNSCCs auf FaDu (= 100 %) bezogen.

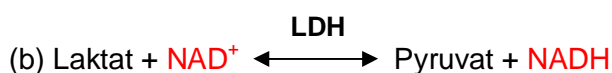
**Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper für In-Cell Western**

Die Tabelle zeigt die für den In-Cell Western verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Verdünnungen in RotiBlock (1:10 in 1x PBS).

zu detektierendes Protein	Primärantikörper	Hersteller	Sekundärantikörper HRP-konjugiert
$\alpha$ -Tubulin	rabbit anti-human 1:500	Abcam Inc.	donkey anti-rabbit 1:1000
GLUT-1	sheep anti-human 1:50	US Biological Inc.	donkey anti-sheep 1:1000
MCT-1	rabbit anti-human 1:50	Santa Cruz Bio- technology	donkey anti-rabbit 1:1000
MCT-4	rabbit anti-human 1:100	Santa Cruz Bio- technology	donkey anti-rabbit 1:1000
CA-IX	goat anti-human 1:50	Santa Cruz Bio- technology	rabbit anti-goat 1:1000
PDH-E1 $\beta$	mouse anti-human 1:100	Abcam Inc.	donkey anti-mouse 1:1000
COX-IV	rabbit anti-human 1:50	Abcam Inc.	donkey anti-rabbit 1:1000
HK-II	mouse anti-human 1:50	Abcam Inc.	donkey anti-mouse 1:1000
PK-M2	rabbit anti-human 1:50	Cell Signaling Technology, Inc.	donkey anti-rabbit 1:1000
LDH-A	sheep anti-human 1:100	Abcam Inc.	donkey anti-sheep 1:1000

### 2.3.2 LDH-Enzymaktivitätstest

Neben der Proteinexpression beeinflusst die Proteinaktivität den Substratumsatz eines Enzyms. Das hier verwendete „Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit“ der Firma BioVision Inc. quantifiziert auf Grundlage einer Farbreaktion mit anschließender photometrischer Auswertung die LDH-Enzymaktivität. Hierbei bedient sich der Hersteller folgender durch LDH katalysierten Reaktion (b).



Das Kit unterscheidet nicht zwischen verschiedenen Isoenzymen der LDH, sondern misst den Substratumsatz aller Isoformen. Zu Versuchsbeginn wurden  $10^6$  Zellen lysiert und die von LDH innerhalb von 30 min umgesetzte Substratmenge anhand der Extinktion bei 450 nm mit Hilfe der Geradengleichung der mitgeführten NADH-Standards errechnet. Entsprechend der Formel (I) resultierte die LDH-Enzymaktivität in mU/ml.

$$(I) \frac{\text{NADH}}{(T_2 - T_1) \times Z_{\ddot{u}}} * \text{GV} = \text{Enzymaktivität in mU/ml}$$

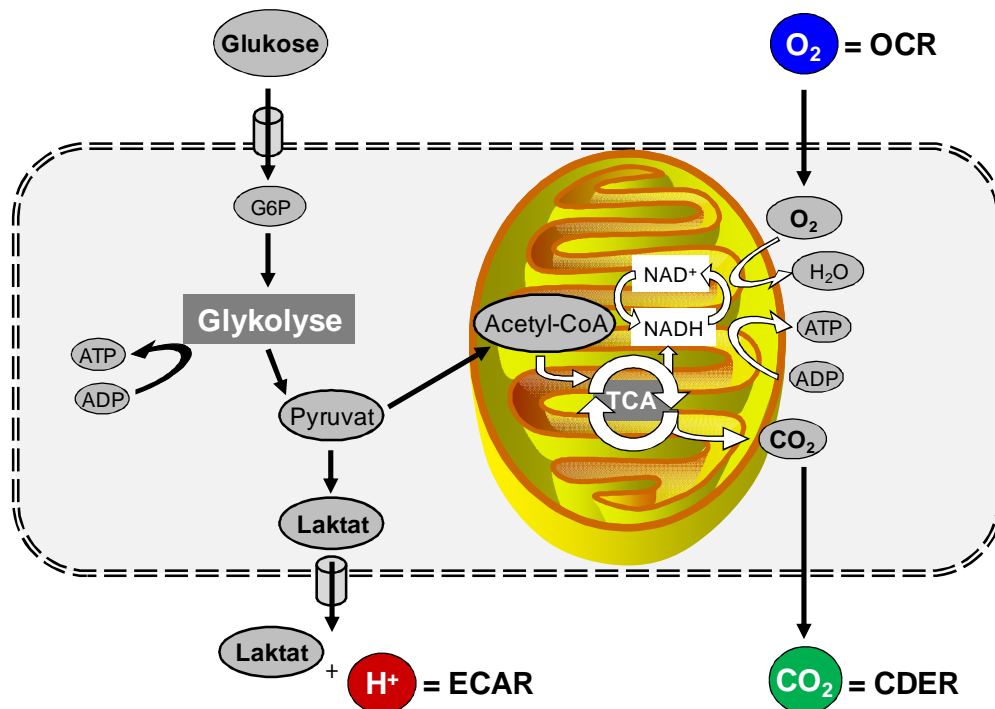
Dabei entspricht NADH der errechneten Menge des zwischen den Zeitpunkten  $T_1$  und  $T_2$  gebildeten Koenzyms in nmol,  $Z_{\ddot{u}}$  der eingesetzten Menge des lysierten Zellüberstandes in ml und GV der Gesamtverdünnung der Probe.

## 2.4 Metabolische Analysen

### 2.4.1 Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3

Der Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 (Seahorse Bioscience) ist eine nicht zellschädigende, nicht invasive Methode zur simultanen und repetitiven Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate; OCR), der Azidifizierungsrate (Extracellular Acidification Rate; ECAR) und der Kohlenstoffdioxidproduktionsrate (Carbon dioxide Evolution Rate; CDER) im Medienüberstand adhärent wachsender Zellen.

Das Messprinzip beruht auf analyt-spezifischen Fluorophoren, deren Fluoreszenzsignal durch die Anwesenheit des entsprechenden Analyts verringert wird. Eine Abnahme des Analyts  $O_2$  lässt Rückschlüsse auf das Ausmaß der Reduktion von  $O_2$  zu  $H_2O$  im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung zu. Der Anstieg des  $H^+$ -Gehalts in der Messkammer ist ein Indikator für die glykolytische Aktivität der Zellen und wird hauptsächlich durch die Dissoziation des Glykolyseprodukts Milchsäure zu Laktat und  $H^+$  verursacht. Eine gesteigerte Bildung von  $CO_2$  deutet ebenfalls auf eine gesteigerte Atmungskettenphosphorylierung hin. Aus der Analyse dieser drei Parameter ( $O_2$ ,  $H^+$ ,  $CO_2$ ) innerhalb eines Versuchszeitraums von mehreren Stunden ist es somit möglich, Rückschlüsse auf den bevorzugten Stoffwechselweg einer Zelllinie zu ziehen (Abbildung 3).

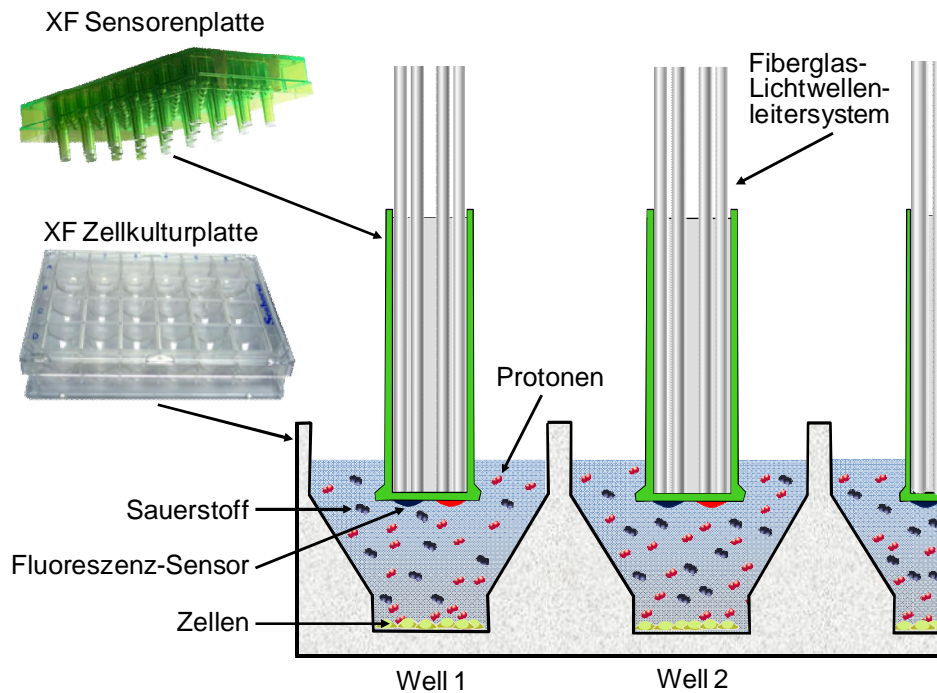


**Abbildung 3: Schematischer Zellstoffwechsel und Analyse des Seahorse Extracellular Flux Analyzers XF 24/3**

Dargestellt ist der schematische Energiestoffwechsel einer Zelle. Blau abgebildet ist der im Medium gelöste O<sub>2</sub>, dessen Verbrauch im Zuge der oxidativen Phosphorylierung durch den Seahorse Analyzer XF 24/3 gemessen und in Form der OCR ausgegeben wird. Rot markiert ist das im Symport mit dem glykolytischen Endprodukt Laktat aus der Zelle transportierte H<sup>+</sup>, das zu einer vom Seahorse Analyzer XF 24/3 detektierten Änderung des pH-Werts im extrazellulären Medium führt (ECAR). Im Medium gelöstes CO<sub>2</sub>, das u.a. im Zuge der oxidativen Phosphorylierung anfällt, ist grün dargestellt. CO<sub>2</sub> wird nicht direkt, sondern über ein komplexes Messprinzip bestimmt (Abbildung 6) und als CDER vom Gerät ausgegeben. Modifiziert nach Seahorse Bioscience.

Der Versuchsaufbau basiert auf einem Zellträgersystem, der Zellkulturplatte XF24 V7PS (Seahorse Bioscience), sowie der XF Sensorenplatte (Seahorse Bioscience). Die Zellkulturplatte besitzt 24 konisch zulaufende Wells mit einer Wachstumsfläche von jeweils 34 mm<sup>2</sup>. Die Sensorenplatte ist mit analyt-spezifischen, fluoreszierenden Biosensoren bestückt, deren Fluoreszenzsignale durch ein optisches Fiberglas-Lichtwellenleitersystem an einen Photodetektor weitergeleitet und computergestützt ausgewertet werden (Abbildung 4).

Zu Beginn jeder Messung wird der Abstand zwischen Zellkultur- und Sensorenplatte verkleinert, so dass eine 7 µl große Messkammer entsteht. Innerhalb dieser Kammer können metabolisch bedingte Konzentrationsänderungen der Analyte (O<sub>2</sub>, H<sup>+</sup> und CO<sub>2</sub>) innerhalb weniger Minuten detektiert werden.



**Abbildung 4: Schematisiertes Messprinzip des Seahorse Extracellular Flux Analyzers XF 24/3**

Dargestellt ist die Sensorenplatte (grün), die über der Zellkulturplatte (grau) positioniert wird. In jedem Well der Zellkulturplatte befinden sich Zellen und Medium mit darin gelöstem  $O_2$  und  $H^+$ . Die Konzentration an gelöstem  $O_2$  und  $H^+$  wird durch analyt-spezifische Fluoreszenz-Sensoren detektiert und in ein Lichtsignal umgewandelt. Das von den Fluorophoren ausgehende Licht kann mittels eines Fiberglas-Lichtwellenleitersystems zum Detektor übertragen und computergestützt ausgewertet werden. Modifiziert nach Seahorse Bioscience.

Der Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 bietet neben der Eigenschaft, basale Stoffwechselraten zu messen, die Möglichkeit, vier Substanzen pro Well an definierten Zeitpunkten zu injizieren und somit künstlich die Glykolyse oder die oxidative Phosphorylierung zu steigern oder zu hemmen. Weitere methodische Details finden sich bei Fabian et al. (2012), Ferrick et al. (2008) und Wu et al. (2007).

#### 2.4.1.1 Simultane Messungen von $H^+$ und $O_2$

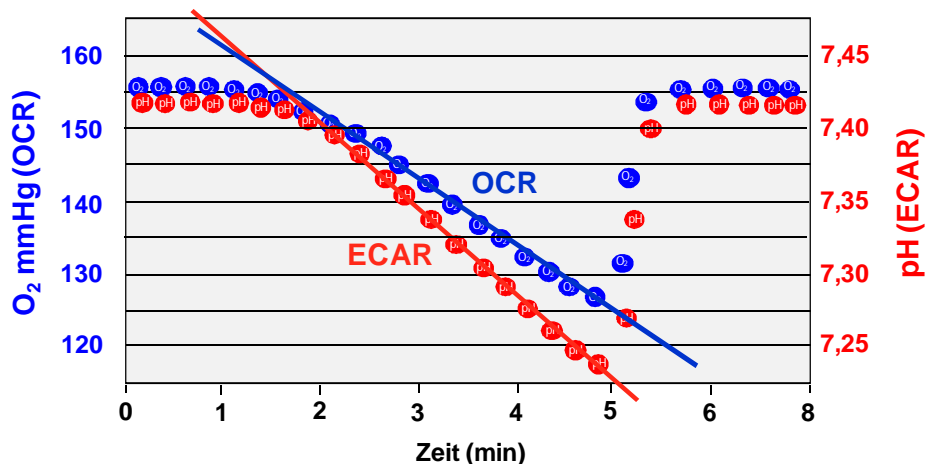
Zwei Tage vor Versuchsdurchführung erfolgte die Aussaat von 25.000 Zellen/Well in eine spezielle Zellkulturplatte XF24 V7PS (Seahorse Bioscience) in 100  $\mu$ l Medium pro Well. Die Inkubation fand bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  statt. Die Sensorenplatte (Seahorse Bioscience) wurde 24 h vor Versuchsbeginn mit XF24 Calibrant Solution pH 7,4 (Seahorse Bioscience) hydriert und bei 37 °C ohne  $CO_2$ -Begasung inkubiert.

Der Austausch des Vollmediums gegen ein ungepuffertes Minimalmedium (D5030; Sigma-Aldrich GmbH), pH 7,4 versetzt mit 1 g/l Glukose, erfolgte 1 h vor Versuchsbeginn.



Anschließend wurde die Zellkulturplatte eine weitere Stunde bei 37 °C ohne CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Nach dem Transfer der Zellkultur- und der Sensorenplatte in den Seahorse Analyzer XF 24/3 führte dieser selbstständig eine Kalibrierung der Biosensoren durch, um deren Funktion zu gewährleisten. Eine anschließende Äquilibrierungsphase von 10 min diente der Reduktion von Temperaturschwankungen innerhalb des Systems. Abschließend setzte das Gerät die Sensoren- und Zellkulturplatte zusammen und begann mit den Messzyklen. Vor jedem Messzyklus (2 min) wurde ein Misch- (5 min) und Wartevorgang (1 min) durchgeführt. Diese Schritte wiederholten sich automatisch über einen Messzeitraum von circa 3 h. Pro Well detektierten zwei unabhängige Fluorophore den O<sub>2</sub>-Partialdruck und den pH-Wert im Medienüberstand adhärenter Zellen.

OCR wurde aus der Steigung der Kurve O<sub>2</sub>-Partialdruck (mmHg) aufgetragen gegen die Zeit (min) berechnet und in pmol/min angegeben. ECAR ergab sich aus der Steigung der pH-Kurve gegen die Zeit und wurde in mpH/min definiert (Abbildung 5).



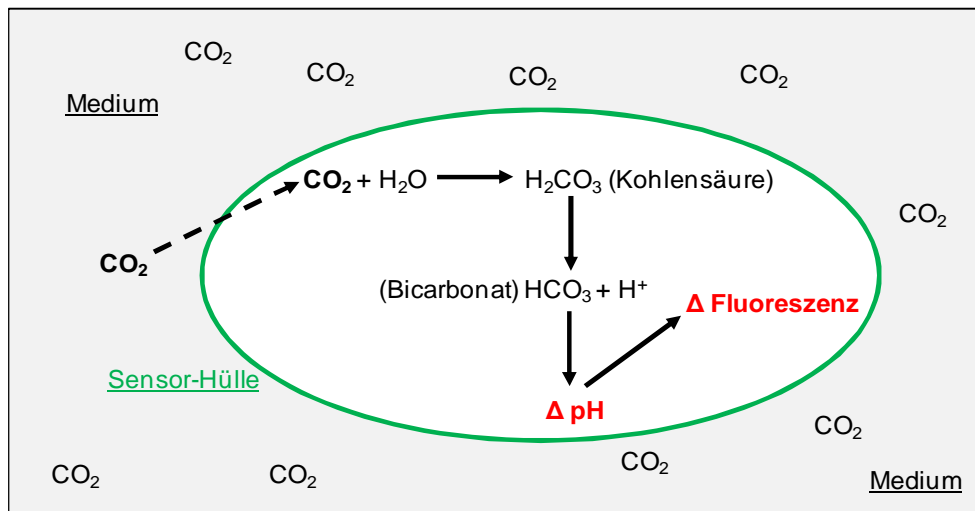
**Abbildung 5: Berechnung von OCR und ECAR mittels Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3**

Dargestellt ist ein Messzyklus eines Wells des Seahorse Analyzers XF 24/3. OCR in pmol/min (blaue Gerade) wurde berechnet aus der Steigung der Kurve O<sub>2</sub>-Partialdruck (mmHg) aufgetragen gegen die Zeit (min). ECAR in mpH/min (rote Gerade) ergab sich aus Steigung der pH-Kurve gegen die Zeit. Modifiziert nach Seahorse Bioscience.

Zu definierten Zeitpunkten wurden entsprechend der Fragestellung verschiedene Stoffwechsellinhibitoren (OXA, 2DG und ROT) in steigenden Konzentrationen in die Medienüberstände injiziert. Die maximalen Endkonzentrationen pro Well betragen 60 mM für OXA, 40 mM für 2DG und 5 µM für ROT.

### 2.4.1.2 Detektion von CO<sub>2</sub>

Im Gegensatz zu O<sub>2</sub> und H<sup>+</sup> kann der Analyt CO<sub>2</sub> nicht direkt detektiert werden. Nachdem ein Molekül CO<sub>2</sub> die semipermeable Membran des Fluorophors durchdringt, reagiert es mit dem darin gebundenen Wasser zu H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, das zu HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> und H<sup>+</sup> dissoziiert (Abbildung 6). Die so gebildeten H<sup>+</sup> führen zu einer Reduktion des pH-Wertes innerhalb der Membran und des vom Fluorophor ausgehenden Signals. CO<sub>2</sub> ist somit ein transientes Molekül, dessen Konzentration sich abhängig vom pH-Wert und der Bicarbonatkonzentration verschiebt.



**Abbildung 6: CO<sub>2</sub>-Messprinzip des Seahorse Extracellular Flux Analyzers XF 24/3**

Gezeigt ist der schematische Aufbau eines CO<sub>2</sub>-Sensors des Seahorse XF 24/3 Analyzers. Die exklusiv für CO<sub>2</sub> permeable Sensor-Hülle (grün) ist mit Wasser gefüllt, was zum Ablauf einer Bicarbonatreaktion innerhalb der Hülle führt. Die hierbei gebildeten H<sup>+</sup> verändern den pH-Wert und reduzieren das vom Fluorophor ausgehende Fluoreszenzsignal.

Hieraus ergaben sich einige notwendige Anpassungen: Im Vergleich zur O<sub>2</sub> und H<sup>+</sup> Detektion erfolgte die Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in einem gepufferten Medium pH 6,8 (D5030; Sigma-Aldrich GmbH), versetzt mit 1 g/l Glukose. Das gepufferte System und der niedrige pH-Wert waren notwendig, um eine möglichst hohe und konstante Löslichkeit für CO<sub>2</sub> im Medium zu erzielen. Aufgrund dessen waren keine simultanen ECAR- und CDER-Messungen möglich. Des Weiteren mussten die Misch- (4 min) und Messvorgänge (3 min) angepasst werden. CDER wurde in Units angegeben und entsprach somit der Steigung der pH-Kurve gegen die Zeit. Hierbei war zu beachten, dass sich die auf der CDER begründete Änderung des pH-Wertes ausschließlich auf H<sup>+</sup> der Bicarbonatreaktion bezog.

Unabhängig vom detektierten Analyt wurde die Zellkultur- und Sensorplatte nach Ablauf des Versuchs aus dem Analyzer gefahren. Die Sensorenplatte wurde verworfen und die Zellkulturplatte mit zweimal 200 µl 1x PBS pH 7,4 gewaschen, der Puffer abgeklopft und die Zellen für 40 min bei 50 °C auf einer Heizplatte hitzefixiert. Abschließend konnte die

Zellkulturplatte bis zur Durchführung der Normalisierung mit Janusgrün-B bei -20 °C gelagert werden.

#### **2.4.1.3 Normalisierung mit Janusgrün-B**

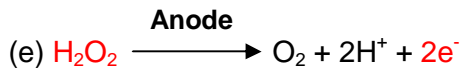
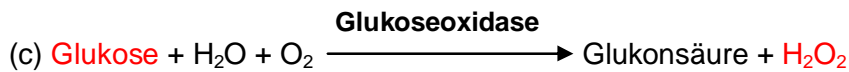
Janusgrün-B ist ein Vitalfarbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe. Ziel der Janusgrün-B-Färbung war eine Normalisierung aller Reaktionskammern, um mögliche Wachstumsunterschiede innerhalb einer Platte und zwischen verschiedenen Zelllinien auszugleichen (Raspotnig et al., 1999).

Hierzu wurde die bei -20 °C gelagerte Zellkulturplatte XF24 V7PS für 15 min auf der 50 °C warmen Heizplatte getrocknet und anschließend mit 200 µl 1x PBS pro Well gewaschen. Nach sorgfältigem Ausklopfen wurde in jede Reaktionskammer 100 µl 1x PBS pipettiert und der Leerwert (E1) mittels eines Mikroplatten-Lesegeräts (DTX 880 Multimode Detector) bei 595 nm gemessen. Nach erneutem Abklopfen folgte eine 10-minütige Inkubation von 100 µl Janusgrünlösung pro Well (0,3 g/l Janusgrün-B gelöst in Aqua dest.; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) auf dem Orbitalschwenker. Die darauf folgenden Waschschritte mit 200 µl 1x PBS wurden so lange durchgeführt, bis alle Spuren des ungebundenen Farbstoffes entfernt waren. Die anschließende Elution des Farbstoffes aus den Zellen erfolgte durch die Zugabe von 100 µl 0,5 N Salzsäure pro Well auf dem Schüttler (IKA Vibrax VXR; IKA GmbH & Co. KG) für 10 min. Der so ausgewaschene Farbstoff konnte bei 595 nm detektiert (E2) werden. Die Differenz  $\Delta E = E2 - E1$  war proportional zur Anzahl der auf der Platte vorhandenen Zellen. Die Extinktionsdifferenzen  $\Delta E$  konnten nun mit den metabolischen Umsatzraten des Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 verrechnet werden.

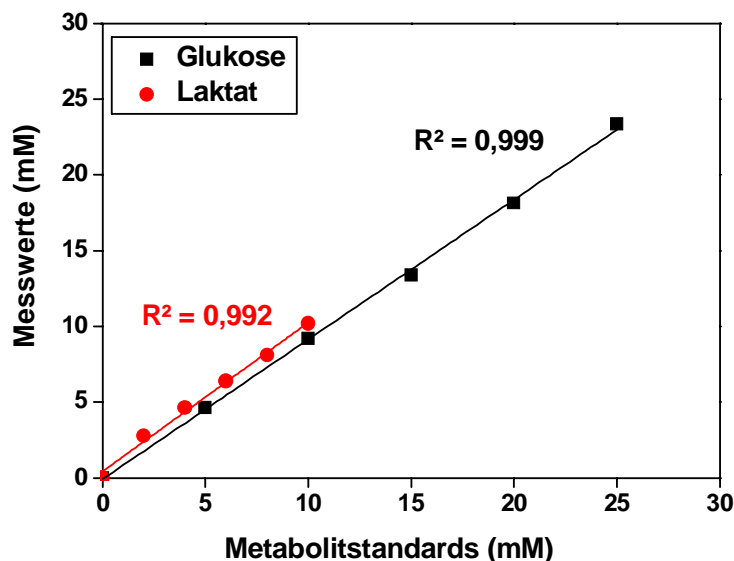
#### **2.4.2 SUPER GL2-Analysator (Glukose- und Laktatbestimmung)**

Der SUPER GL2-Analysator (Dr. Müller Gerätebau GmbH) ist ein Gerät für biochemische Analysen in der *in vitro*-Diagnostik. Der Analysator wurde zur enzymatisch amperometrischen Bestimmung von Glukose und Laktat in humanem Probenmaterial konzipiert. Dabei durchläuft die Probe in Form eines Flüssigkeitsstroms einen Biosensor mit integrierten Platinelektroden, die durch semipermeable Membranen vom Analytenstrom getrennt sind. Auf diesen Sperrschichten befinden sich die immobilisierten Enzyme Glukoseoxidase bzw. Laktatoxidase, die Glukose bzw. Laktat in Anwesenheit von  $H_2O$  und  $O_2$  zu Glukonsäure (Reaktion c) bzw. Pyruvat (Reaktion d) oxidieren und  $O_2$  zu  $H_2O_2$  reduzieren. Das gebildete  $H_2O_2$  diffundiert anschließend zur Anode, wo es oxidiert wird (Reaktion e). Der dabei fließende elektrische Strom wird gemessen und ist proportional

zur Glukose- bzw. Laktatkonzentration in der Probe. Den enzymatisch amperometrischen Messungen liegen folgende chemische Reaktionen (c) bis (e) zu Grunde:



Um korrekte Messergebnisse zu gewährleisten, führt das Gerät vor jeder Messung eine automatische Kalibrierung durch. Die Messdaten werden in mM Glukose bzw. mM Laktat ausgegeben. Um sicherzustellen, dass der Analysator auch entgegen seiner ursprünglichen Konzeption, dem klinischen Einsatz, unphysiologisch hohe Glukose- und Laktatkonzentrationen detektieren kann, erfolgte die Messung von Metabolitstandards bis 25 mM Glukose und 10 mM Laktat gelöst in Zellkulturmedium (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Glukose- und Laktatstandards gemessen mit dem SUPER GL2-Analysator**

Gezeigt sind die Glukose- und Laktatstandards (mM) in Abhängigkeit von den vom Analysator detektierten Messwerten (mM). Durch die Messpunkte wurden Regressionsgeraden gelegt und die Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) errechnet.

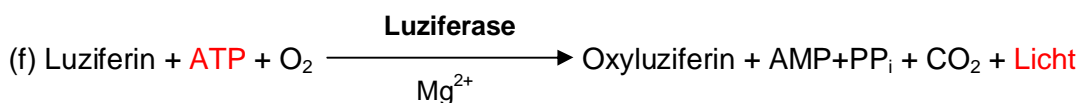
Die in Abbildung 7 dargestellten Kurven zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen den eingesetzten Metabolitstandards und den mittels SUPER GL2-Analysator ermittelten Messwerten auch unter unphysiologisch hohen Metabolitkonzentrationen.

Die Bestimmung der Glukose- und Laktatkonzentration in Medienüberständen der adhären wachsenden Tumorzellen fand zwei Tage nach deren Aussaat (OC316, IGROV-1 und SAS  $1,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>; FaDu  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) in 6-Well Platten mit einer Wachstumsfläche von 9,6 cm<sup>2</sup> pro Well statt. Die Anfangszellzahlen wurden so gewählt, dass die Platten am Ende des Versuchs 90 % Konfluenz nicht überschritten. Die erste Probeentnahme nach zwei Tagen erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 70 % und definierte den Zeitpunkt 0 h. Ihr ging ein Medienwechsel voraus, bei dem das alte Medium vollständig entfernt und durch 1,5 ml frisches Medium ersetzt wurde. Weitere Probenentnahmen fanden zur Messung der basalen Stoffwechseleigenschaften alle 2 h, bei zusätzlicher Beeinflussung durch einen Stoffwechsellinhibitor (20 mM 2DG bzw. 60 mM OXA) stündlich statt. Dazu wurden jeweils 100 µl des Medienüberstandes abgenommen und die Zellzahl mittels des Zellzählgeräts CASY® 1TT bestimmt. Die Bestimmung der Zellzahl in Verbindung mit der Messung der Laktat- und Glukosekonzentration im Medium ermöglichte die Angabe der Metabolitmenge in pmol/Zelle. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten von 2DG und Glukose war nach Zugabe von 2DG keine Bestimmung der Glukosekonzentration mehr möglich. Unter Berücksichtigung verschiedener Medien und Zusätze wurden die entsprechenden Leerwerte von den jeweiligen Messwerten subtrahiert.

### 2.4.3 Luminometrische ATP-Bestimmung

Durch die Quantifizierung des ATP-Gehalts von Zellen können Rückschlüsse auf deren metabolische Aktivität und die Viabilität gezogen werden.

Der intrazelluläre ATP-Gehalt wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation) gemessen. Hierzu wurden 120.000 Zellen pro Ansatz in ein Reaktionsgefäß überführt und entsprechend (Tabelle 8) optional mit Stoffwechselmanipulatoren behandelt oder als Kontrollzellen unbehandelt mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurden jeweils 3.000 Zellen/Well in eine weiße Multiwellplatte (Greiner Bio-One GmbH) pipettiert. ATP-Standards zur Quantifizierung der Messdaten wurden auf jeder Platte mitgeführt. Weitere Schritte erfolgten nach Anleitung des Herstellers. Das von einer ATP-induzierten Lumineszenzreaktion ausgehende Licht (Reaktion f) wurde mit Hilfe eines Mikroplatten-Lesegeräts (DTX 880 Multimode Detector) detektiert.



Zum Vergleich des relativen ATP-Gehalts innerhalb einer Tumorentität wurden die Zelllinien OC316 und SAS als 100 % definiert.

## 2.5 Beurteilung des Redoxstatus

### 2.5.1 DHE-Färbung zum Nachweis von $O_2^-$ -Anionen

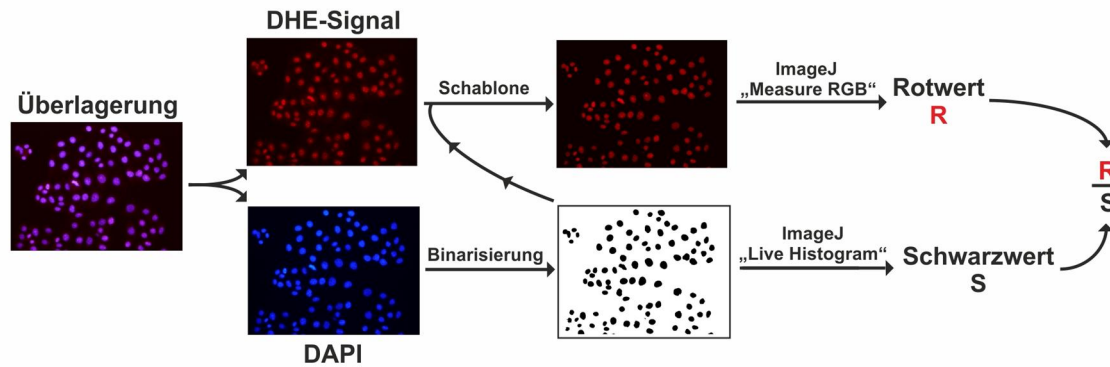
Dihydroethidium (DHE) ist eine Substanz, die durch Oxidation mittels ROS, hierbei insbesondere durch  $O_2^-$ , ihre chemische Struktur ändert. Das dabei entstehende Ethidium besitzt DNA-interkalierende und fluoreszierende Eigenschaften, die mittels Immunfluoreszenzmikroskopie visualisier- und quantifizierbar sind (D'Agostino et al., 2007).

Die untersuchten Tumorzelllinien wurden in definierte Zellzahlen (OC316, IGROV-1, SAS  $1,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> und FaDu  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) auf Glasobjektträger (Menzel-Gläser GmbH) ausgesät und drei Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Bestimmung des basalen  $O_2^-$ -Status wurden die Objektträger direkt aus dem Medium in eine Glasküvette mit 1x PBS überführt, um etwaige Medienreste zu entfernen, und für 10 min in 5 µM DHE, gelöst in -20 °C kaltem Methanol, inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Glasobjektträger mit Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI (Dianova GmbH) eingedeckt, 24 h bei 2 °C getrocknet und abschließend versiegelt.

Um einen Zusammenhang exogener Noxen und dem intrazellulären  $O_2^-$ -Status *in vitro* zu untersuchen, erfolgten zusätzlich zu den basalen Versuchsreihen Experimente, bei denen der Färbung eine zweistündige Inkubation mit Stoffwechsellinhibitoren (1 mM 2DG + 5 nM ROT oder 10 mM 2DG + 50 nM ROT) oder 0-8 min UV-Bestrahlung vorangingen.

Zur Visualisierung des durch  $O_2^-$ -Radikale entstandenen Ethidiums wurde dessen fluoreszierende Eigenschaft unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops (BZ8000-K; Keyence GmbH) sowie den Polarisationsfiltern OP-66832 BZ DAPI-BP und OP-66383 BZ TexasRed (Keyence GmbH) genutzt. Die Belichtungszeiten wurden an den mitgeführten Negativkontrollen (Inkubation in 100 % Methanol) ausgerichtet.

Das vom Ethidium ausgehende rote Fluoreszenzsignal (DHE-Signal) konnte mittels ImageJ 1.44 unter Verwendung des Plugins „Measure RGB“ (Autor: Wayne Rasband; Version 1) ausgewertet werden. Dabei bestimmte das verwendete Plugin u.a. die Anzahl und die Intensität aller roten Pixel und berechnete daraus das mittlere Intensitätssignal (Rotwert R). Um die Zellkernfläche zu bestimmen, konnte das vom Eindeckmittel DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ausgehende blaue Fluoreszenzsignal genutzt werden. Hierzu wurde der blaue Farbkanal in ein binäres Foto umgewandelt und die Anzahl der schwarzen Pixel mit Hilfe des ImageJ Plugins „Live Histogram“ (Autor: Wayne Rasband, modifiziert von Bob Dougherty; Version 8.6) gezählt und als Zellkernfläche definiert (Schwarzwert S). Des Weiteren diente das binäre DAPI-Foto als Schablone für das DNA-interkalierende und rot fluoreszierende Ethidium und stellte somit sicher, dass das ausgewertete Signal auf den Nukleus limitiert ist. Abschließend wurde ein Quotient (R/S) aus der mittleren intranukleären Intensität des roten Farbkanals und der binarisierten Zellkernfläche, basierend auf den DAPI gefärbten Arealen, gebildet (Abbildung 8).

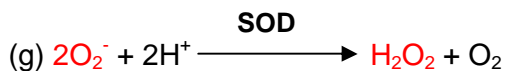


**Abbildung 8: Computergestützte Quantifizierung der DHE-Färbung**

Gezeigt ist die computergestützte Quantifizierung der DHE-Färbung. Für jede DHE-Färbung wurde parallel eine DAPI-Färbung auf selbiger Probe mitgeführt. Das DAPI-Signal wurde zunächst binarisiert und anschließend die Anzahl schwarzer Pixel durch das ImageJ Plugin „Live Histogram“ bestimmt (Schwarzwert S). Des Weiteren wurde das binäre DAPI-Foto als Schablone über das DHE-Signal gelegt und somit das DHE-Signal auf den Nukleus begrenzt. Die Analyse des DHE-Signals erfolgte durch die Detektion der Anzahl und der Intensität der rot fluoreszierenden Pixel pro Bild mittels des Plugins „Measure RGB“ (Rotwert R). Abschließend wurde ein Quotient gebildet ( $R/S$ ), um das mittlere intranukleäre DHE-Signal auf die Zellkernfläche pro Bild zu beziehen.

### 2.5.2 Photometrische Bestimmung der SOD-Aktivität

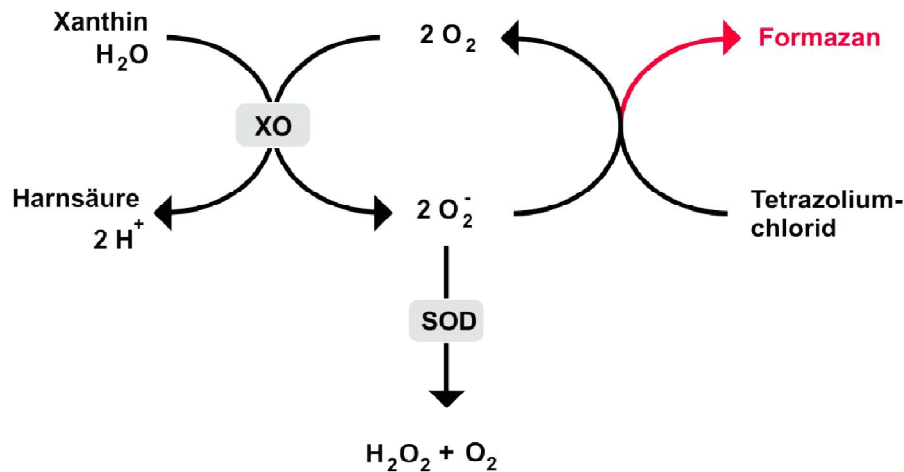
Die SOD dient der Reduktion von ROS. Diese für einen Organismus schädliche Form des  $O_2$  entsteht beispielsweise im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung an Atmungskettenkomplexen sowie durch oxidativen Stress ausgelöst durch exogene Noxen (Strahlung, Chemikalien). ROS führen zu Lipidperoxidationen, Proteinoxidationen und Schädigungen der DNA. SOD katalysiert die Umwandlung des Radikals  $O_2^-$  zu  $O_2$  und  $H_2O_2$ , siehe Reaktion (g):



Neben der SOD-Expression ist die SOD-Aktivität ein entscheidender Parameter für die Gewährleistung seiner antioxidativen Funktion. Das in dieser Arbeit verwendete „Superoxid Dismutase (SOD) Activity Assay Kit“ der Firma BioVision Inc. bestimmt die SOD-Aktivität jedoch nicht direkt, sondern durch Tetrazoliumchlorid (Abbildung 9).

Tetrazoliumchlorid wird bei Anwesenheit von  $O_2^-$ -Anionen von einem farblosen wasserlöslichen Zustand zum wasserunlöslichen roten Formazan reduziert. Formazan kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert werden (DTX 880 Multimode Detector). Zur Generierung von  $O_2^-$  wird das Enzym Xanthinoxidase (XO) eingesetzt. Dieses physiologisch in der Niere und Leber vorkommende Metalloenzym bewirkt in Anwesenheit von  $H_2O$  und  $O_2$  die Umwandlung von Xanthin zu Harnsäure unter

zusätzlicher Bildung von  $\text{H}^+$  und  $\text{O}_2^-$ . Letzteres ist Substrat der zuvor beschriebenen Formazan-Reaktion sowie dem durch SOD katalysierten Abbau von  $\text{O}_2^-$ . Die Bildung des roten Farbstoffs Formazan wird somit durch den Abbau von  $\text{O}_2^-$  durch das Enzym SOD gemindert (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der chemischen Zusammenhänge des SOD-Aktivitätstests**

Die photometrisch nachweisbare Umsetzung eines  $\text{O}_2^-$ -Anions und Tetrazoliumchlorid zu  $\text{O}_2$  und Formazan bildet einen chemischen Kreislauf mit der Xanthinoxidase-Reaktion (XO). Der rote Formazan-Farbstoff wird durch die SOD aufgrund der Nutzung derselben Substratquelle ( $2 \text{O}_2^-$ ) gemindert gebildet.

Zur Bestimmung der SOD-Aktivität wurden die verwendeten Tumorzelllinien nach drei Tagen Inkubation von der Wachstumsfläche der Zellkulturflaschen abgelöst und nach einem Zentrifugationsschritt, 270 g für 5 min, mit 3 ml kaltem 1x PBS resuspendiert. Darauf folgten die Zellzahlbestimmung sowie das Überführen von  $10^6$  Zellen in geeignete Reaktionsgefäße. Nach erneutem Zentrifugieren, 270 g für 5 min, erfolgte die Zellyse. Diese wurde jedoch nicht entsprechend den Herstellerangaben, sondern unter Verwendung von 200  $\mu\text{l}$  kaltem RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay) Lysepuffer durchgeführt. Der Grund hierfür lag in der bewussten Vermeidung stark toxischer und kanzerogener Chemikalien. RIPA-Lysepuffer ermöglichte einen effizienten Aufschluss der Zellen, ohne die Proteine abzubauen oder in ihrer Aktivität zu beeinflussen. Das in Reaktionsgefäße überführte Zelllysate wurde nun bei 4 °C für 10 min bei 14.000 g zentrifugiert, der Überstand für die weitere Durchführung der Aktivitätsuntersuchung aufbewahrt und die abgesetzten Zelltrümmer verworfen. Die Aktivitätstests erfolgten in einer Multiwellplatte (Greiner Bio-One GmbH), die entsprechend dem Pipettierschema des Herstellers beladen wurde. Nach erfolgter Zugabe der XO inkubierten die Platten für 20 min bei 37 °C, um anschließend die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 450 nm zu bestimmen (DTX 880 Multimode Detector).



Die Berechnung der prozentualen Inhibitionsrate, die mit der SOD-Aktivität gleichgesetzt ist, erfolgte anhand der Mittelwerte der Dreifachbestimmungen entsprechend dem Herstellerprotokoll.

## **2.6 Klonogenes Überleben und Radiosensibilität**

### **2.6.1 Gamma- und UV-Bestrahlung**

Gammastrahlung wirkt auf unterschiedliche Weise auf biologische Systeme. Erfolgt die Energieabsorption und die Auslösung der biologischen Wirkung innerhalb des Zielmoleküls, wird von einer direkten Wirkung gesprochen. Bei der indirekten Wirkung erfolgt die Energieabsorption und Auslösung der biologischen Wirkung in unterschiedlichen Molekülen. Hierbei entstehen Radikale, die durch Radikalkettenreaktionen zu einer sekundären Schädigung des biologischen Zielmoleküls führen (Cook et al., 2004). Die gravierendste Wirkung von Gammastrahlung auf Zellen sind DNA Läsionen, die falsch oder nicht repariert zu Mutationen und letzten Endes zum klonogenen Zelltod führen (Thoms und Bristow, 2010).

Die Bestrahlung der Proben erfolgte in Räumlichkeiten des Instituts für Toxikologie der Universitätsmedizin Mainz, die sich circa 30 Fahrminuten außerhalb der eigenen Laboratorien befanden. Für die Gammabestrahlung wurde das Gerät Gammacell 2000 (Molsgard medical) mit einer Leistung von 3,24 Gy/min verwendet. Die Proben wurden mit Energiedosen von 0, 2, 4 oder 8 Gy bestrahlt. Als Strahlenquelle diente das synthetisch hergestellte Radioisotop  $^{137}\text{Cs}$  (Caesium) mit einer Halbwertszeit von 30,17 Jahren. Hierbei zerfiel Caesium in das stabile Barium-Isotop  $^{137}\text{Ba}$ , wobei Gammastrahlung freigesetzt wurde.  $^{137}\text{Cs}$  ist eine klinisch relevante Gammastrahlenquelle, die in der Strahlentherapie von Tumorerkrankungen eingesetzt wird.

Die ultraviolette Strahlung wird anhand ihrer Wellenlänge in drei Stufen eingeteilt: UV-A, UV-B und UV-C. Das langwellige Ende der für den Menschen unsichtbaren elektromagnetischen UV-Strahlung bildet UV-A mit Wellenlängen zwischen 380–315 nm.

Die relativ hohe Wellenlänge von UV-A Strahlung im Vergleich zu UV-B und UV-C ermöglicht eine wesentlich höhere Eindringtiefe in biologische Systeme. Hierdurch kann UV-A zu strukturellen Veränderungen in unteren Zellschichten führen und wird auf Grund dessen z. B. mit einer beschleunigten Hautalterung assoziiert. Die mutagene und karzinogene Wirkung von UV-A Strahlung basiert wesentlich auf indirekten, durch Radikale verursachten Schädigungen des Erbgutes (Nishigori et al., 2004).

Die UV-A Bestrahlung erfolgte mittels des Bio Vision 3026 (Vilber Lourmat Deutschland GmbH) bei einer Leistung von sechsmal 8 W und einer Wellenlänge von 312 nm. Die mit Zellen bewachsenen Objektträger wurden hierzu in quadriPERMs® (Sarstedt AG & Co.) über den UV-A-Röhren positioniert und 0-8 min bestrahlt.

Versuche mit UV-A-Strahlung wurden durchgeführt, um kurzfristige Veränderungen an Zellen nach deren Manipulation durch Strahlung zu erforschen. Die Nutzung der Gammastrahlenquelle war aufgrund der Transportzeit von mindestens 30 min für Fragestellungen hinsichtlich der direkten Strahlenantwort von Zellen nicht praktikabel.

### 2.6.2 Klonogenitätstest

Exogene Noxen wie Strahlung oder Chemotherapeutika sind vor allem gegen die unbegrenzte Proliferationsfähigkeit klonogener Tumorzellen gerichtet. Die Effizienz eines solchen anti-klonogenen Ansatzes kann mit Klonogenitätstests (Plating Efficiency, PE) quantitativ erfasst werden.

Zur Durchführung eines Klonogenitätstests wurden die Zellen abgelöst und in definierten Konzentrationen in verschließbare 50 ml Reaktionsgefäße überführt (Abbildung 10). Das Gesamtvolumen pro Reaktionsgefäß betrug 4 ml inklusive optional zugesetzter Stoffwechselmanipulatoren. Nach einstündiger Inkubation, die primär durch den Transportweg zur Strahlenquelle bedingt war, wurden die Zellsuspensionen mit 0-8 Gy bestrahlt. Eine Stunde nach Bestrahlung wurden die Proben in Vierfachbestimmung und in definierten Zellzahlen, abhängig von der verwendeten Zelllinie und Strahlendosis, in 21 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturschalen ausgesät und sieben bis elf Tage in 4 ml Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (Abbildung 10 und Tabelle 5).

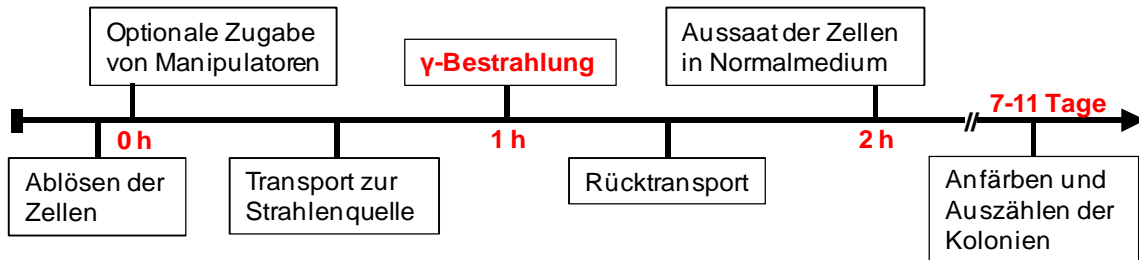
**Tabelle 5: Ausgesäte Zellzahlen und Inkubationszeiten für Klonogenitätstests**

Die Tabelle zeigt die für die Klonogenitätstests ausgesäten Zellzahlen, angepasst an die Gammastrahlendosis und die entsprechende Zelllinie sowie die Inkubationszeiten nach Bestrahlung.

Zelllinie	Ausgesäte Zellzahl (Zellen/cm <sup>2</sup> )				Inkubationszeit (Tage)
	0 Gy	2 Gy	4 Gy	8 Gy	
OC316	50	100	200	3000	7
IGROV-1	50	100	200	800	7
SAS	100	200	400	2000	8
FaDu	100	200	400	3000	11

Ziel war es, Kolonien mit mindestens 2<sup>6</sup> Zellen zu erreichen, was sechs Zellteilungen oder mehr entsprach. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt (Intergra Vacusafe; Intergra Biosciences GmbH) und die Zellkulturschalen mit 2 ml

0,3%igem Methyleneblau gefüllt. Nach 30 min konnte der Farbstoff entfernt und die Schalen mehrmals mit 4 ml Wasser gewaschen werden. Anschließend wurden die Zellkulturschalen eingescannt und mit Hilfe der Programme Photoshop CS3 (Adobe Co.), ImageJ 1.44 und Excel (Microsoft) Kolonien > 60 Zellen computergestützt ausgezählt. Der Versuchsablauf ist chronologisch in Form einer Zeitabfolge in Abbildung 10 dargestellt:



**Abbildung 10: Zeitabfolge eines Klonogenitätstests**

Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese in verschließbare Reaktionsgefäße überführt und optional mit Stoffwechselmanipulatoren versetzt (Zeitpunkt 0 h). Darauf folgte der Transport zur Strahlenquelle und die Gammabestrahlung (Zeitpunkt 1 h). Eine Stunde nach Gammabestrahlung wurde mit der Aussaat der Zellen in Normalmedium begonnen (Zeitpunkt 2 h). Die Inkubationszeit optionaler Manipulatoren betrug somit exakt 2 h. Das Anfärben und Auszählen der Kolonien erfolgte nach sieben bis elf Tagen entsprechend der jeweiligen Zelllinie (Tabelle 5).

Das klonogene Überleben (Plating Efficiency, PE) wurde entsprechend Formel (II) berechnet:

$$(II) \frac{\text{Anzahl}_{\text{Kolonien}}}{\text{Zellzahl}_{\text{Einsaat}}} * 100 = PE$$

Zur Berechnung der klonogenen Überlebensrate nach Behandlung (Surviving Fraction, SF) wurde folgende Formel (III) verwendet:

$$(III) \frac{PE_{\text{behandelte Kolonien}}}{PE_{\text{unbehandelte Kolonien}}} * 100 = SF$$

### 2.6.3 $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung

Die DNA eukaryotischer Zellen ist in Nukleosomen organisiert. Der Nukleosomenkern ist um ein sogenanntes Histon-Oktamer gewunden, das jeweils aus zwei Exemplaren der Histone H2A, H2B, H3 sowie H4 besteht und wesentlich zur Kondensierung der DNA beiträgt. Das Histon H2AX ist eine Variante des Histons H2A, das sich durch einen um 14 Aminosäuren verlängerten C-Terminus unterscheidet. Als Reaktion auf einen Doppelstrangbruch (DSB) kommt es zu einer Phosphorylierung am C-terminalen Ende des

Histons H2AX zu  $\gamma$ H2AX an der nicht-essentiellen Aminosäure Serin 139. Verantwortlich für die Phosphorylierung sind Kinasen aus der Familie PI3 (Phosphoinositid-3).  $\gamma$ H2AX ist in der Wissenschaft als Nachweis für DSBs etabliert (Kinner et al., 2008). Durch die Verwendung eines spezifischen Erstantikörpers ist es möglich, die Phosphorylierungsstelle P-Serin 139 zu markieren und mit Hilfe eines Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpers zu visualisieren. Die Phosphorylierung erfolgt im Bereich von eins bis zwei Mega-Basenpaaren um den Doppelstrangbruch und wird im Fluoreszenzmikroskop als sogenannter Focus sichtbar.

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde *in vitro* an den adhären wachsenden Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu durchgeführt. Diese wurden mit einer Zellzahl von  $0,5 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf Glasobjektträger (Menzel-Gläser GmbH) ausgesät. Als Zellkulturgefäß erwiesen sich sogenannte quadriPERMs<sup>®</sup> (Sarstedt AG & Co.) als praktikabel, die eine parallele, aber getrennte Inkubation von vier Objektträgern ermöglichen. Jedes Kompartiment wurde mit 6 ml Medium gefüllt und drei Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Eine Stunde vor Bestrahlung wurden die Objektträger in verschließbare 50 ml Reaktionsgefäße überführt, die mit 30 ml Medium und entsprechend des Versuchs optional mit Stoffwechsellinhibitoren in definierten Konzentrationen (Tabelle 8) gefüllt wurden. Die Gammabestrahlung der Objektträger erfolgte mit den Dosen 0, 2, 4 und 8 Gy. Eine Stunde nach Bestrahlung wurden die Objektträger aus den Reaktionsgefäßen entnommen und gefärbt oder weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die verwendeten Stoffwechsellinhibitoren wirkten somit eine Stunde vor und eine Stunde nach Bestrahlung auf die Zellen ein.

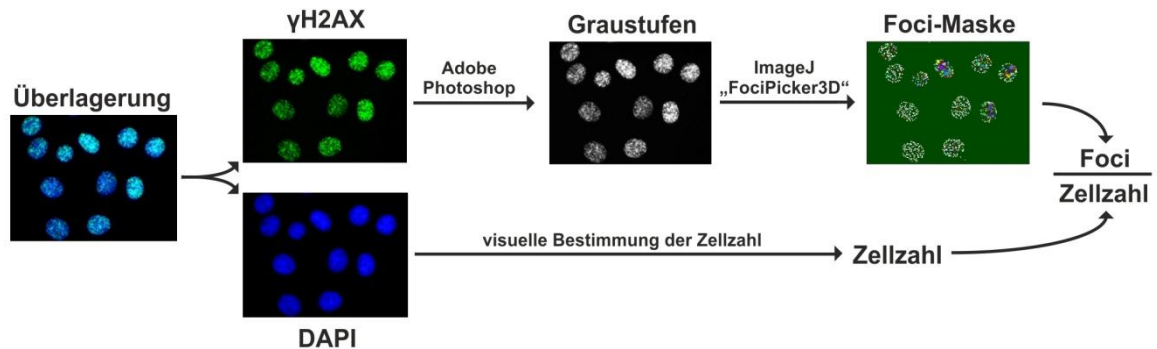
Zur Visualisierung der phosphorylierten Histon-Proteine  $\gamma$ H2AX wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierzu wurden die Objektträger zweimal in 1x PBS gewaschen, um Medienreste abzuspülen. Darauf folgte eine Unterteilung des Zellrasens in zwei Kompartimente, die mit einem Fettstift (ImmEdge Pen, Vector Laboratories) eingeraht wurden. Die Abtrennung separater Reaktionsflächen ermöglichte das Mitführen einer Negativkontrolle auf selbigem Objektträger. Nach erneutem Waschen in 1x PBS wurden die Objektträger 15 min in 2,25 % Paraformaldehyd (PFA; Carl Roth GmbH + CO. KG) fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die beiden Reaktionsflächen 10 min mit 100  $\mu$ l 0,5%iger Triton X-100 Lösung (Sigma-Aldrich GmbH) behandelt. Es folgten erneut drei Waschschrte à 3 min in 1x PBS. Um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu minimieren, erfolgte die Blockade dieser Strukturen durch eine 20-minütige Inkubation der Reaktionsflächen mit 100  $\mu$ l 0,5 % bovine serum albumin (BSA; AppliChem GmbH) in 1x PBS. Nach Abklopfen der Objektträger wurde die Hälfte der Reaktionskammern mit 100  $\mu$ l Erstantikörper (Anti-phospho-histone H2AX Ser139, mouse anti human; Millipore), 1:500 verdünnt in 0,5 % BSA, behandelt.

Die als Negativkontrollen definierten Reaktionsbereiche wurden hingegen nur mit 100  $\mu$ l 0,5 % BSA beladen. Nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit war ein Waschschriff, 3 min in 1x PBS, erforderlich. Anschließend folgte eine 45-minütige Inkubation aller Reaktionskammern mit 100  $\mu$ l des Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpers (donkey anti mouse DyLight 488; Dianova GmbH), verdünnt 1:800 in 1x PBS. Um das Fluorophor nicht zu beschädigen, mussten die weiteren Arbeitsschritte in abgedunkelten Räumen durchgeführt werden. Nachfolgend wurde der Objektträger abgeklopft und dreimal 3 min in 1x PBS gewaschen. Mit Hilfe eines mit DAPI versetzten Eindeckmittels (Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI; Dianova GmbH) wurde der Objektträger abschließend konserviert, 24 h bei 2 °C getrocknet und mit farblosem Nagellack versiegelt.

Die Visualisierung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (BZ8000-K; Keyence GmbH) jeweils 24 h nach Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung bei 600facher Vergrößerung. Der Fluorophor-gekoppelte Zweitantikörper sowie der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI emittierten Licht spezifischer Wellenlänge nach entsprechender Anregung. Zur Anregung und Detektion wurden die Polarisationsfilter OP-66832 BZ DAPI-BP und OP-66836 BZ GFP-BP der Firma Keyence genutzt. Aus deren Verwendung ergaben sich pro Aufnahme zwei separate Fotos, die spezifisch das emittierte Licht der beiden Fluorophore abbildeten. In einem dritten Foto wurden die beiden Einzelfotos automatisch übereinander gelagert (Abbildung 11).

Von jedem Objektträger wurden elf Aufnahmen angefertigt. Die Aufnahme aus dem Bereich des Objektträgers, der ohne Erstantikörper inkubiert wurde (Negativkontrolle), diente hierbei der Kalibrierung der Belichtungszeit. Der restliche Teil des Objektträgers, behandelt mit Erst- und Zweitantikörper, wurde in Form von zehn Aufnahmen aus verschiedenen Positionen visualisiert. Anschließend mussten Zellkerne entfernt werden, die nur teilweise auf den Fotos abgebildet waren. Es folgten notwendige Formatierungsschritte, um die  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle bzw. Zellkern computergestützt auszuwerten (Abbildung 11). Die Zielsetzung war hierbei die Reduktion der Bildgröße der ursprünglichen  $\gamma$ H2AX-Fotos sowie deren Umwandlung in Graustufen und in ein 16 bit Bildformat mittels Photoshop CS3 (Adobe Co.). Das Auszählen der Foci erfolgte durch ImageJ 1.44 unter Verwendung des Plugins „FociPicker3D 3D and 2D particle counter“ (Autor: Guanghua Du; 16.04.2010 erste Version). Grundlage des FociPickers ist, dass jeder Focus durch ein lokales Maximum repräsentiert ist, das aus einem oder einer Gruppe an Pixeln mit der gleichen Intensität besteht, jedoch die Intensität höher als die aller umliegenden Pixel ist. Die Toleranz und die minimale Anzahl an Pixel, die ein Focus definiert, wurden innerhalb einer Tumor-entität gleich gehalten. Im Rahmen der Foci-Analyse wurde neben der Gesamtzahl an Foci pro Foto eine Foci-Maske generiert, die jeden Focus als bunten Punkt auf grünem Hintergrund darstellt. Um eine Aussage über die Zahl der Foci pro Zelle treffen zu können,

wurden anhand des DAPI-Fotos die Zellkerne optisch ausgezählt und ins Verhältnis zur Focizahl gesetzt. Hierbei wurde die Annahme getroffen, dass jede Zelle durch einen Zellkern definiert wird (Abbildung 11). Mitosen und Apoptosen wurden generell von der Auswertung ausgeschlossen.



**Abbildung 11: Computergestützte Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle**

Gezeigt ist die computergestützte Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle. Die mittels eines Fluoreszenzmikroskops erstellten Fotos der  $\gamma$ H2AX-markierten DSBs wurden durch Adobe Photoshop CS3 in ihrer Auflösung reduziert, in Graustufen umgewandelt sowie in ein 16 bit Bildformat überführt. Diese Anpassungen waren zur späteren Auszählung der  $\gamma$ H2AX-Foci mit Hilfe des ImageJ Plugins „FociPicker3D 3D and 2D particle counter“ notwendig. Hierbei wird neben einer Foci-Maske die Anzahl der Foci pro Bild ermittelt. Ausgehend von einer DAPI-Kernfärbung wurden die Zellkerne pro Bild ausgezählt und mit den Foci verrechnet (Foci/Zellzahl).

## 2.7 Dosisfindungstest

Zur Manipulation des Tumorstoffwechsels wurden drei Substanzen einzeln und in Kombination verwendet: OXA, ein Strukturanalogon von Pyruvat und kompetitiver Inhibitor der LDH; 2DG, ein Glukoseanalogon und HK-Hemmstoff; ROT, ein Inhibitor des 1. Komplexes der Atmungskette. Die maximal anwendbaren Konzentrationen unter Ausschluss zelltoxischer Wirkungen wurden in sogenannten Dosisfindungstests eruiert. Hierzu wurden die Zellen abgelöst, gezählt und 2 h mit verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen der Stoffwechselmanipulatoren inkubiert.

Ziel der Dosisfindungstests war, die maximale Chemikalienkonzentration zu ermitteln, die im eingesetzten Zeitfenster von 2 h keine drastischen Zelltoxizitäten aufwies. Angestrebt wurde eine maximale Abnahme der PE von  $\leq 10\%$  gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Der PE-Dosisfindungstest errechnete sich nach folgender Formel (IV):

$$(IV) \frac{\text{Anzahl}_{\text{behandelte Kolonien}}}{\text{Anzahl}_{\text{unbehandelte Kolonien}}} * 100 = \text{PE-Dosisfindungstest}$$

Die Stoffwechsellinhibitoren wurden in Medium verdünnt. Lediglich ROT musste in DMSO gelöst werden, jedoch wurden finale Konzentrationen von 0,01 % DMSO im Medium nicht überschritten. Anschließend wurden 100 Zellen/cm<sup>2</sup> in 4 ml frischem Normalmedium in 21 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturschalen ausgesät und entsprechend den Klonogenitätstests (Tabelle 5) inkubiert. Die anschließende computergestützte Auszählung der Kolonien erfolgte analog der in Kapitel 2.6.2 erläuterten Methode.

## **2.8 Erzeugung von Experimentaltumoren**

Die Generierung der Experimentaltumoren aus den humanen Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 erfolgte unter Leitung von Herrn Dr. Indraccolo. Hierzu wurden Gruppen von sechs bis acht Wochen alten SCID-Mäusen (severe combined immunodeficiency) 5 x 10<sup>5</sup> Zellen, gelöst in 300 µl 4 °C kaltem Matrigel (Becton Dickinson GmbH), subkutan in beide Flanken injiziert. Beginnend mit dem Tag der Injektion wurden die Tumoren zweimal wöchentlich vermessen und das Volumen berechnet [(Länge x Breite<sup>2</sup>) x 0,5]. Nachdem die Tumoren eine Größe von 200-300 mm<sup>3</sup> erreicht hatten, erfolgte die operative Tumorsektion und die Überführung der Tumoren in flüssigen Stickstoff (Fabian et al., 2012).

Die HNSCC-Experimentaltumoren wurden unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Baumann im OncoRay-National Center for Radiation Research in Oncology (Dresden) aus den Zelllinien SAS und FaDu konstituiert. Die Tumorzellen wurden subkutan in das rechte Hinterbein von NMRI (Naval Medical Research Institute) Nacktmäusen (nu/nu) implantiert. Ab einer Größe von 180 mm<sup>3</sup> wurden die Tumoren entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Sattler et al., 2010b).

Die Lieferung nach Mainz und die weitere Lagerung bis zur Verarbeitung der Tumorproben erfolgten bei -80 °C.

## **2.9 Untersuchungen an Experimentaltumoren**

### **2.9.1 Immunfluoreszenzfärbungen stoffwechselrelevanter Proteine**

Zur Erstellung serieller Kryoschnitte wurden die Tumoren mit Tissue Tek<sup>®</sup> eingebettet (Sakura Finetek) und mit Hilfe eines Kryotoms (SLEE medical GmbH) bei -20 °C in 10 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Glasobjektträger (Menzel-Gläser GmbH) aufgezogen. Nach 24 h Lagerung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte für 7 min in Aceton fixiert, in 1x PBS gewaschen und unspezifische Bindestellen 45 min mit 2 % Eselserum (Dianova GmbH) blockiert. Anschließend wurden die Tumorschnitte 1 h mit folgenden Erstantikörpern, verdünnt in 1 % Eselserum, inkubiert: GLUT-1, MCT-1, MCT-4, CA-IX, PDH-E1β,

COX-IV, PK-M2 und LDH-A (Tabelle 6). Pro Tumor wurde ein Schnitt anstelle des Erstantikörpers ausschließlich mit 1 % Eselserum behandelt (Negativkontrolle). Nach dreimal 3 min Waschen in 1x PBS wurden die Schnitte 45 min mit den entsprechenden DyLight 594 gekoppelten Zweitantikörpern (alle Dianova GmbH), verdünnt in 1x PBS, inkubiert (Tabelle 6). Nach abschließenden Waschschritten in 1x PBS wurden die Tumorschnitte mit Eindeckmedium konserviert und gleichzeitig die Zellkerne mit DAPI gefärbt (Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI; Dianova GmbH).

**Tabelle 6: Primär- und Sekundärantikörper und verwendete Verdünnungen für Immunfluoreszenzfärbungen an Tumorschnitten**

Die Tabelle zeigt die für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Verdünnungen.

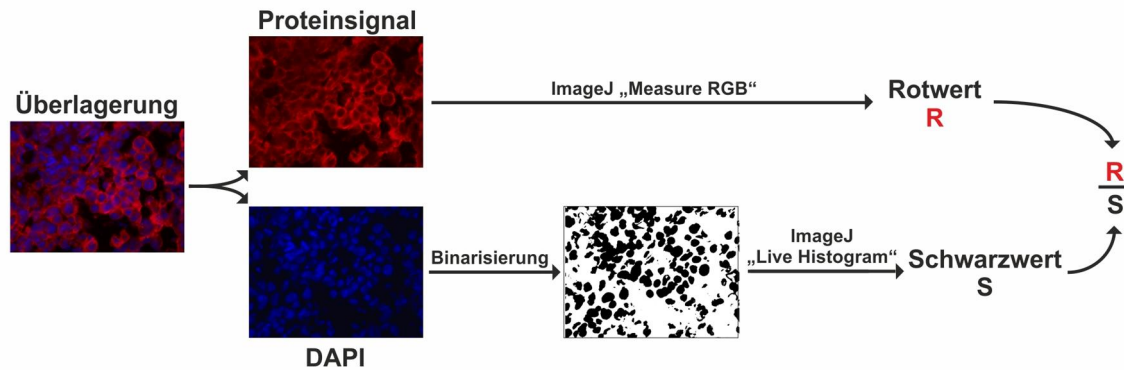
zu detektierendes Protein	Primärantikörper	Hersteller	Sekundärantikörper Fluoreszenz konjugiert
GLUT-1	sheep anti-human 1:100	US Biological Inc.	donkey anti-sheep 1:800
MCT-1	rabbit anti-human 1:50	Santa Cruz Biotechnology	donkey anti-rabbit 1:800
MCT-4	rabbit anti-human 1:50	Santa Cruz Biotechnology	donkey anti-rabbit 1:800
CA-IX	goat anti-human 1:100	Santa Cruz Biotechnology	donkey anti-goat 1:800
PDH-E1 $\beta$	mouse anti-human 1:50	Abcam plc	donkey anti-mouse 1:800
COX-IV	rabbit anti-human 1:50	Abcam plc	donkey anti-rabbit 1:800
PK-M2	rabbit anti-human 1:50	Cell Signaling Technology, Inc.	donkey anti-rabbit 1:800
LDH-A	sheep anti-human 1:100	Abcam plc	donkey anti-sheep 1:800

Pro Tumorschnitt wurden fünf Fotos am Fluoreszenzmikroskop (BZ-8000K, Keyence GmbH) bei 400facher Vergrößerung sowie bis zu neun Fotos mit 50facher Vergrößerung, die anschließend durch das Programm BZ Image Analysis Application (Keyence GmbH) zusammengelagert wurden, aufgenommen. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten unter Verwendung folgender Polarisationsfilter: OP-66832 BZ DAPI-BP und OP-66383 BZ TexasRed (Keyence GmbH).

Zur Quantifizierung der Expression des Zielproteins wurde die Fluoreszenzintensität sowie die Fläche des Proteinsignals mittels ImageJ 1.44 unter Verwendung des Plugins „Measure RGB“ (Autor: Wayne Rasband; Version 1) detektiert und als „Rotwert R“ definiert. Das von der DAPI-Kernfärbung emittierte Licht wurde zur Berechnung der Tumorzellkernfläche herangezogen. Hierzu wurde das DAPI-Bild binarisiert und anschließend mit Hilfe des ImageJ Plugins „Live Histogram“ (Autor: Wayne Rasband, modifiziert von



Bob Dougherty; Version 8.6) die Anzahl schwarzer Pixel ausgezählt (Schwarzwert S). Abschließend wurde die Proteinexpression, exklusiv für jedes Foto, aus dem Quotient (R/S) der Intensität des Zielproteins (Rotwert R) in Relation zur Tumor-Zellkernfläche (Schwarzwert S) berechnet (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Computergestützte Quantifizierung von Immunfluoreszenzfärbungen an Tumorschnitten**

Gezeigt ist die computergestützte Quantifizierung einer Immunfluoreszenzfärbung an Gewebeschnitten von Tumor-Xenografts. Für jede Zielprotein-Färbung wurde parallel eine DAPI-Färbung auf selbigem Schnitt mitgeführt. Das DAPI-Signal wurde zunächst binarisiert und anschließend die Anzahl schwarzer Pixel durch das ImageJ Plugin „Live Histogram“ bestimmt (Schwarzwert S). Die Analyse des Zielproteins erfolgte durch die Detektion der Anzahl und Intensität der rot fluoreszierenden Pixel pro Bild durch das Plugin „Measure RGB“ (Rotwert R). Abschließend wurde ein Quotient gebildet (R/S), um das Signal des Zielproteins auf die Tumor-Zellkernfläche pro Bild zu beziehen.

Für jedes untersuchte Protein wurden fünf Fotos pro Tumor bei 400facher Vergrößerung ausgewertet und gemittelt. Die Proteinexpressionslevel der OC316- bzw. SAS-Tumoren wurden in Bezug zu denjenigen der Zelllinien IGROV-1 bzw. FaDu gesetzt. Die Belichtungszeiten waren innerhalb einer Tumorentität identisch und wurden anhand der mitgeführten Negativkontrollen determiniert. Die aus bis zu neun Fotos zusammengelagerten Aufnahmen bei 50facher Vergrößerung konnten aufgrund der geringen Detailgenauigkeit nicht computergestützt ausgewertet und quantifiziert werden.

### 2.9.2 Quantifizierung von Metaboliten mittels imBI

Das Verfahren der bildgebenden Biolumineszenz (induced metabolic Bioluminescence Imaging, imBI) ist eine Methode, die von W. Paschen in den 1980er Jahren zur Untersuchung des Stoffwechsels von Gewebeschnitten entwickelt wurde (Paschen et al., 1981). Sie basiert auf Reaktionslösungen, die mit Hilfe spezifischer Enzyme das zu analysierende Metabolit einer Luziferase-katalysierten Lichtreaktion zuführen. Anfänglich war nur ein semiquantitativer Nachweis von ATP, Glukose und Laktat möglich, später wurde die

Methode um eine Möglichkeit zur Quantifizierung der Messdaten erweitert (Paschen et al., 1985; Paschen, 1985). In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Müller Klieser wurde die Methodik optimiert und standardisiert sowie um die Messung des Metabolits Pyruvat ergänzt (Mueller-Klieser und Walenta, 1993; Sattler et al., 2007; Walenta et al., 2002).

Aus Experimentaltumoren von humanen Ovarial- und Plattenepithelkarzinomzelllinien wurden mit Hilfe eines Kryotoms (SLEE medical GmbH) Gefrierschnitte angefertigt. Hieraus wurden Strukturfärbungen (Hämalaun und Eosin-Doppelfärbung an 10 µm dicken Schnitten) erstellt, sowie die quantitative Bestimmung von ATP, Laktat, Glukose (jeweils 16 µm dicke Schnitte) und Pyruvat (20 µm dicke Schnitte) mittels imBI durchgeführt. Mit Hilfe von Stanzlöchern wurden die Tumoren mit markanten Punkten versehen, um eine spätere Überlagerung der Aufnahmen und die Auswertung von seriellen Schnitten zu ermöglichen.

Alle Messungen erfolgten in einer temperierten und lichtgeschützten Reaktionskammer. Die Messkammer besaß eine Vertiefung, die mit 60 µl Enzymlösung gefüllt und im Sandwichverfahren mit dem Gefrierschnitt zusammengeführt wurde (Abbildung 13). Vor Ablauf der Inkubationszeit (Tabelle 7) musste die Messkammer und die Reaktionskammer zusammengeführt und unter einem Mikroskop (Zeiss Axiophot; Carl Zeiss AG) positioniert werden.

**Tabelle 7: Inkubations- und Messzeiten unterschiedlicher Metabolite für die imBI-Technik**

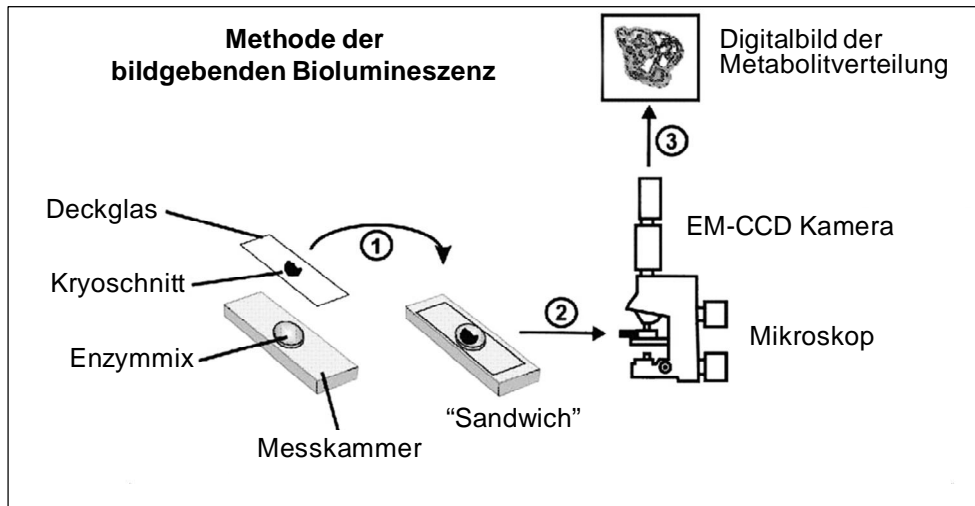
Die Tabelle zeigt die metabolitspezifischen Inkubations- und Messzeiten des imBI-Messverfahrens.

	Metabolit			
	ATP	Laktat	Glukose	Pyruvat
Inkubationszeit (s)	10	30	50	10
Messzeit (s)	30	15	40	120

Im Strahlengang des Mikroskops war eine 16 bit EM-CCD Kamera (iXon IQ DU-888; Andor Technology) montiert, die im darauffolgenden Messzeitraum (Tabelle 7) einzelne Lichtphotonen detektierte. In Kombination mit der Andor IQ-Software wurde die örtliche Verteilung unterschiedlicher Lichtintensitäten innerhalb des Gefrierschnittes in ein optisches Bild umgewandelt (Abbildung 13).

Der gesamte Versuchsaufbau wurde in einem ventilierten und lichtdichten Schrank untergebracht, der sich wiederum in einem klimatisierten Raum befand. Durch die Schaffung konstanter Reaktionsbedingungen und durch das Mitführen von Standardschnitten bekannter Konzentrationen konnte eine absolute Quantifizierung der Metabolite ATP, Laktat, Glukose und Pyruvat erzielt werden. Die so generierten Messdaten wurden in µmol/g Tumorgewebe ausgegeben. Die computergestützte Auswertung ermöglichte eine gezielte Analyse der Metabolitkonzentrationen in ausgewählten histologischen Gewebearealen,

z. B. nur innerhalb der vitalen Tumorregionen. 15 Tumoren der Linien OC316 und IGROV-1 sowie zehn Tumoren der Linien SAS und FaDu wurden unter Verwendung von drei Schnitten pro Metabolit pro Tumor analysiert. Alle Messwerte zur Berechnung der Metabolitkonzentrationen wurden ausschließlich aus vitalem Tumorgewebe erhoben.



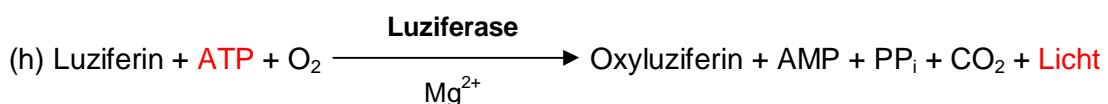
**Abbildung 13: Messung von Metaboliten mittels imBI**

Einzelne Gefrierschnitte werden auf ein Deckglas überführt und in eine Enzymlösung getaucht, die sich in einer Vertiefung der Messkammer befindet (1). Dieses „Sandwich“ wird in eine temperierte Reaktionskammer auf dem Objektisch eines Mikroskops überführt (2). Die einsetzende Lichtemission kann mit einer hochempfindlichen EM-CCD Kamera detektiert werden. Das Ergebnis (3) ist die flächenhafte Verteilung der Metabolitkonzentrationen im Gefrierschnitt. Modifiziert nach Walenta et al. (2004).

Für weitere methodische Details und repräsentative Kalibrierungskurven siehe Mueller-Klieser und Walenta (1993) sowie Sattler et al. (2007).

### 2.9.2.1 ATP

Die Quantifizierung von ATP in Gewebeschnitten mittels imBI basiert auf folgender chemischen Reaktion (h):



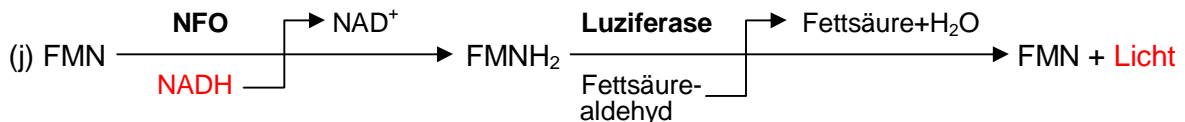
Das Enzym Luziferase oxidiert hierbei das Substrat Luziferin unter Anwesenheit von ATP, O<sub>2</sub> und Magnesiumionen zu Oxyluziferin, wobei Licht mit einem Emissionsmaximum bei 562 nm freigesetzt wird. Die Enzymlösung zur ATP-Messung wird aus der Feuerfliege *Photinus pyralis* hergestellt und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Die genaue Zusammensetzung der ATP-Enzymlösung findet sich in Mueller-Klieser und Walenta (1993).

### 2.9.2.2 Laktat

Zur Bestimmung von Laktat mittels imBI ist im Vergleich zu ATP eine komplexere Abfolge chemischer Redoxreaktionen notwendig. Laktat wird durch das Enzym LDH zu Pyruvat umgesetzt. Hierbei wird der Cofaktor  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  reduziert. Um die von der LDH bevorzugte Rückreaktion zu Laktat zu verhindern, werden dem Enzymmix zusätzlich das Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Glutamat zugesetzt, so dass Pyruvat umgehend in Alanin überführt wird (Reaktion i).



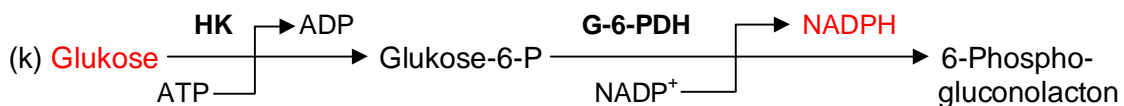
Das gebildete Reduktionsmittel  $\text{NADH}$  wird von der  $\text{NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase}$  (NFO) genutzt, um  $\text{FMN}$  zu  $\text{FMNH}_2$  zu reduzieren. Abschließend wird  $\text{FMNH}_2$  durch das Enzym Luziferase des Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* und unter Verbrauch langkettiger Aldehyde und  $\text{O}_2$  oxidiert, wobei Licht emittiert wird (Reaktion j).



Die genaue Zusammensetzung der Laktat-Enzymlösung ist in Sattler et al. (2010b) aufgeführt.

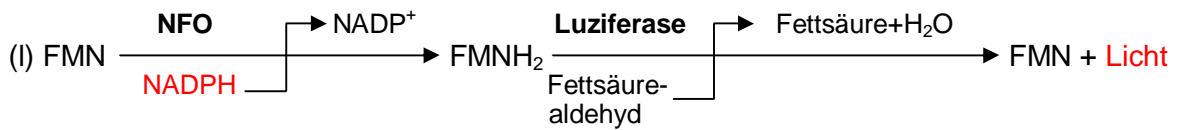
### 2.9.2.3 Glukose

Zur Visualisierung der Glukose mit Hilfe der imBI-Technik wird diese durch das erste Enzym der Glykolyse, die HK, zu Glukose-6-P phosphoryliert. Im nächsten Schritt wird Glukose-6-P zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert, eine Reaktion, die durch G-6-PDH katalysiert wird (Reaktion k).



Das dabei gebildete  $\text{NADPH}$  wird, analog zur Laktatmessung via imBI, von der NFO als Reduktionsmittel für  $\text{FMN}$  eingesetzt.

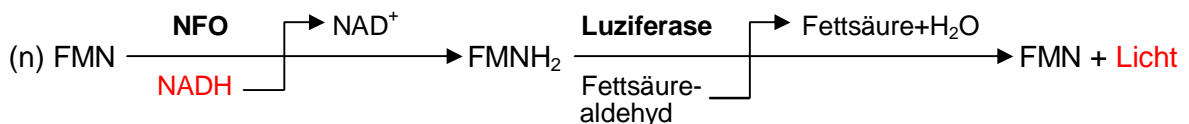
Das gebildete FMNH<sub>2</sub> wird durch das Enzym Luziferase des Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* oxidiert, wobei Licht emittiert wird (Reaktion l).



Die genaue Zusammensetzung der Glukose-Enzymlösung findet sich in Mueller-Klieser und Walenta (1993).

### 2.9.2.4 Pyruvat

Pyruvat wird mittels der PDH zu AcetylCoA oxidiert (Reaktion m). Das in dieser Reaktion entstehende NADH wird durch die NFO und die Luziferase des Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri* analog zur Laktat- bzw. Glukosemessung in sichtbares Licht umgewandelt (Reaktion n).



Die Pyruvat-Enzymlösung ist entgegen der ATP-, Laktat- und Glukose-Enzymlösung nicht lagerfähig und muss für jeden Messtag frisch angesetzt werden. Die Zusammensetzung der Enzymlösung für die Pyruvatmessung findet sich in Sattler et al. (2007).

### 2.9.2.5 Standards und Kalibrierungskurven

Zur Quantifizierung der gemessenen Metabolite wurden entsprechende Metabolit-Standards mitgeführt. ATP-, Laktat-, Glukose- und Pyruvat-Konzentrationsreihen wurden im Verhältnis 4:1 in Tissue-Tek<sup>®</sup> (Sakura Finetek) verdünnt. Die viskose Masse wurde 30 min gerührt, um eine homogene Lösung zu erhalten. Die Generierung von ATP-Standards erfolgte unter konstanter Kühlung. Die Standards wurden entsprechend den Proben im Kryotom (SLEE medical GmbH) geschnitten und gelagert.

Standards wurden stichprobenmäßig zu Beginn jedes Messtages gemessen, um zu überprüfen, ob die resultierende Lichtintensität zur verwendeten Kalibrierungskurve passt.

Bei zu starken Abweichungen wurde eine neue Kalibrierungskurve erstellt. Hierzu wurde mit Hilfe der Andor iQ Software die durchschnittliche Lichtintensität, die SD sowie die maximale Lichtintensität des Standardschnitts bestimmt und in Excel graphisch gegen die bekannte Metabolitkonzentration aufgetragen. Nach der Messung von Standards unterschiedlicher Konzentrationen wurde eine Kalibrierungskurve mittels Box-Lucas Fit berechnet und zur Quantifizierung der Proben verwendet.

#### **2.9.2.6 Hämalan- und Eosin-Färbung**

Die Hämalan- und Eosin-Färbung (H&E-Färbung) ist eine Routinefärbung zur Differenzierung feingeweblicher Strukturen. Sie dient der Unterscheidung von Muskel-, Binde- und tumorösem Gewebe und wurde für jeden Gewebeschnitt, der mittels bildgebender Biolumineszenz analysiert wurde, in einem Parallelschnitt mitgeführt.

Hierbei färbt Hämalan insbesondere die Zellkerne mit der darin enthaltenen basophilen DNA blau an, wohingegen der rote und azidophile Farbstoff Eosin hauptsächlich an Zellplasmaproteine gebunden wird.

Vor Beginn des Färbeprotokolls wurden die Kryoschnitte aufgetaut, für 7 min in Aceton fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Darauf folgte die Färbung in Hämatoxylinlösung, modifiziert nach Gill II (Hämatoxylin; Carl Roth GmbH + CO. KG) und 10 % wässriger Eosinlösung (Merck KGaA). Durch anschließende Spülschritte in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen wurden die Schnitte entwässert und abschließend in Xylol geklärt. Als Eindeckmittel wurde Roti-Histokit II (Carl Roth GmbH + CO. KG) verwendet. Die gefärbten Schnitte wurden mittels eines Mikroskops (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss AG) in Kombination mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (Nikon D100; Nikon GmbH) abfotografiert und für die imBI-Auswertung verwendet.

#### **2.9.2.7 Auswertung der imBI-Messungen**

Vor und nach jeder Metabolitmessung wurde eine Hellfeldaufnahme der Kryoschnitte erstellt, um die Position der Probe in der Messkammer zu lokalisieren. Zur Bestimmung des vitalen Gewebebereichs innerhalb eines Kryoschnitts wurden die beiden Hellfeldaufnahmen sowie die ATP-Biolumineszenzmessung und das zugehörige H&E-Bild in Photoshop CS3 (Adobe Co.) geöffnet und anhand markanter Stellen und Stanzlöcher exakt übereinander gelagert. Anhand des H&E-Bildes und der Hellfeldaufnahmen wurde im Abgleich mit der ATP-Biolumineszenzaufnahme der vitale Tumorbereich vom restlichen Gewebe abgegrenzt, nachgezeichnet und in Form einer Maske abgespeichert.

Basierend auf der ATP-Maske wurden für alle Metabolite Masken erstellt und deren Flächen mittels des imageJ Plugins „Tumor Statistics“ (J. Osthof und E. Schöner, Bioinformatik Universität Mainz) auf das zugehörige Biolumineszenzbild übertragen. Dies ermöglichte die exklusive Auslese der Metabolitkonzentrationen im vitalen Tumorgewebe. Das Plugin berechnete innerhalb der Maske die durchschnittliche Lichtintensität, die SD, die Größe sowie die maximale und minimale Lichtintensität des Biolumineszenzbildes. Die durchschnittliche Lichtintensität des vitalen Tumorgewebes konnte so anhand der Kalibrierungskurven einer definierten Metabolitkonzentration zugeordnet werden.

### **2.9.3 DHE-Färbung zum Nachweis von $O_2^-$ -Anionen an Tumorschnitten**

Zur Detektion von  $O_2^-$ -Anionen mittels Dihydroethidium (DHE) wurden Tumoren in Tissue Tek<sup>®</sup> eingebettet (Sakura Finetek) und unter Verwendung eines Kryotoms bei  $-20\text{ °C}$  in  $10\text{ }\mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten und auf Glasobjektträger (Menzel-Gläser GmbH) aufgezogen. Die Schnitte wurden nach dem Schneiden bis zur Färbung unverzüglich bei  $-80\text{ °C}$  gelagert, um den Abbau der Radikale zu verzögern.

Die Färbung der Tumorschnitte erfolgte analog zu der in Kapitel 2.5.1 beschriebenen Methode für adhärent wachsende Tumorzelllinien.

Von jedem Tumor wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops unter Nutzung der Polarisationsfilter OP-66832 BZ DAPI-BP und OP-66383 BZ (Keyence GmbH) eine Übersichtsaufnahme angefertigt. Dazu wurden mehrere Einzelbilder bei 20facher Vergrößerung erstellt und diese mit Hilfe der Software BZ Image Analysis Application (Keyence GmbH) zusammengelagert. Des Weiteren wurden pro Experimentaltumor fünf Detailaufnahmen bei 200facher Vergrößerung aus unterschiedlichen Sektoren des jeweiligen Schnitts angefertigt und computergestützt ausgewertet sowie quantifiziert. Die Auswertung erfolgte entsprechend der in Kapitel 2.5.1 dargestellten Methode.

Das Fluoreszenzsignal der Übersichtsaufnahmen konnte auf Grund der geringen Vergrößerung und Detailgenauigkeit nicht computergestützt quantifiziert werden.

## **2.10 Statistik**

Berechnet wurden die Mittelwerte (MW) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichungen (SD), wie jeweils in den Abbildungs- und Tabellenlegenden angegeben. In Boxplot-Diagrammen sind jeweils dargestellt: die Mittelwerte (Quadrat), Median (Strich), SD (Box) sowie Minimal- und Maximalwerte (Whisker). Für die Überprüfung signifikanter Unterschiede wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt und Signifikanzen mit einem  $p < 0,05$  entsprechend kenntlich gemacht.

### 3 ERGEBNISSE

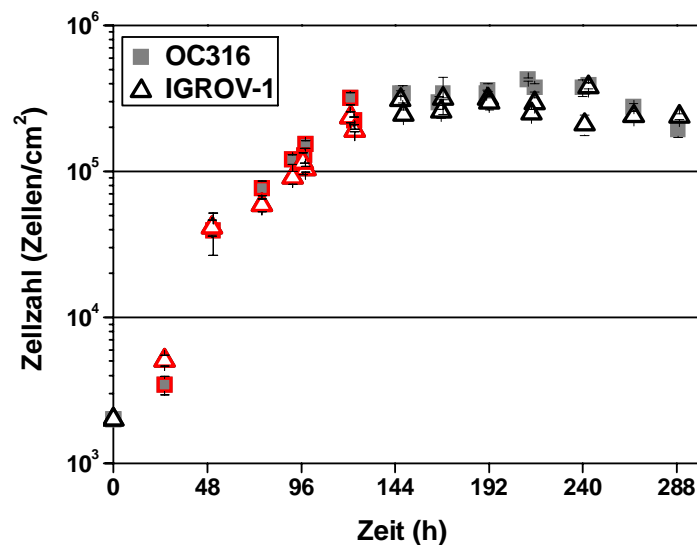
#### 3.1 Charakterisierung der Tumorzelllinien

Die vier verwendeten Tumorzelllinien wurden anhand des Wachstumsverhalten, der Proteinexpressions- und Proteinaktivitätsanalysen, ihrer metabolischen Eigenschaften und des zellulären Redoxstatus charakterisiert.

##### 3.1.1 Wachstumskurven und Zellzahlverdopplungszeiten

Um anhand der Wachstumskinetik die Zellzahlverdopplungszeiten der vier verwendeten Zelllinien bestimmen zu können, wurden Wachstumskurven erstellt (Abbildung 14 und Abbildung 15). Hierzu wurden die Zellen in 24-Well Platten ausgesät und zu definierten Zeitpunkten die Zellzahl (Zellen/cm<sup>2</sup>) in Dreifachbestimmung gemessen und anschließend der MW in Abhängigkeit von der Zeit halblogarithmisch aufgetragen.

Die beiden humanen Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 (Abbildung 14) sowie die beiden humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien aus dem Kopf- und Halsbereich SAS und FaDu (Abbildung 15) zeigten ähnliche Verläufe der Wachstumskinetik.



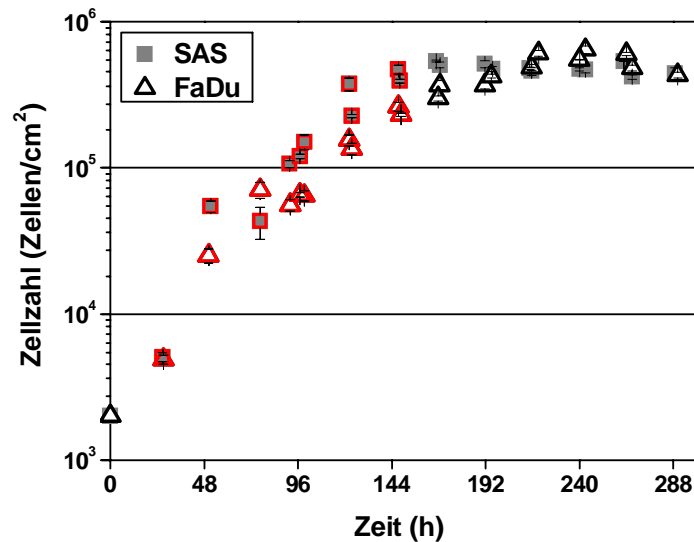
**Abbildung 14: Wachstumskurven der Tumorzelllinien OC316 und IGROV-1**

Die Zellzahl der Linien OC316 und IGROV-1 wurde in Abhängigkeit von der Zeit halblogarithmisch aufgetragen. Die roten Datenpunkte kennzeichnen den Bereich des exponentiellen Wachstums anhand derer die Zellzahlverdopplungszeiten errechnet wurden. Gezeigt sind die MW und SD aus zwei unabhängigen Versuchen.

Bei allen vier Zelllinien betrug die Phase des exponentiellen Wachstums durchschnittlich 110 h. Daran schloss sich eine ausgeprägte stationäre Phase mit leichten Tendenzen hin zur Absterbephase nach 240 h.



Die Zellzahlverdopplungszeiten wurden anhand der Steigung im Bereich des exponentiellen Wachstums errechnet, gekennzeichnet durch rote Datenpunkte, und betragen 19 h und 20,5 h für OC316 und IGROV-1 sowie 21,5 h und 23,5 h für SAS und FaDu.



**Abbildung 15: Wachstumskurven der Tumorzelllinien SAS und FaDu**

Die Zellzahl der Linien SAS und FaDu wurde in Abhängigkeit von der Zeit halblogarithmisch aufgetragen. Die roten Datenpunkte kennzeichnen den Bereich des exponentiellen Wachstums anhand derer die Zellzahlverdopplungszeiten errechnet wurden. Gezeigt sind die MW und SD aus zwei unabhängigen Versuchen.

Sich stark ähnelnde Zellzahlverdopplungszeiten innerhalb der Tumorentität sowie Typusübergreifend lassen die Zellen als geeignetes Modellsystem für die folgenden *in vitro*-Experimente erscheinen.

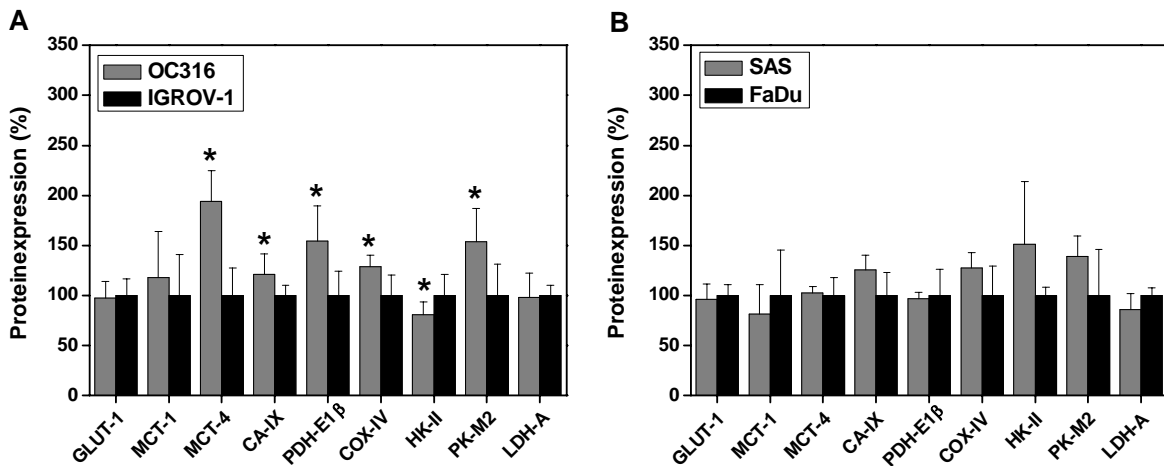
### 3.1.2 Charakterisierung stoffwechselrelevanter Proteine

#### 3.1.2.1 Expressionsanalysen stoffwechselrelevanter Proteine

Die Expression von neun verschiedenen Proteinen wurde mit Hilfe der Methode des In-Cell Western untersucht. Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurde innerhalb der Linien auf  $\alpha$ -Tubulin normiert und die erhaltenen Daten pro Tumorentität in Bezug zu IGROV-1 (= 100 %) bzw. FaDu (= 100 %) gesetzt. In Abbildung 16 ist die relative Proteinexpression der neun untersuchten Proteine aufgetragen. Gezeigt sind die MW und SD aus drei unabhängigen Versuchen.

Das Proteinexpressionsmuster der beiden humanen Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 unterschied sich signifikant in mehreren energiestoffwechselrelevanten Proteinen (Abbildung 16A).

Der membranständige Transporter MCT-4 sowie die Enzyme CA-IX, PDH-E1 $\beta$ , COX-IV und PK-M2 waren im Vergleich zur Linie IGROV-1 bei OC316 statistisch signifikant höher exprimiert. Das Protein MCT-4 zeigte bei OC316 ein um 96 % höheres Expressionsniveau als bei IGROV-1. Die Proteine GLUT-1, MCT-1 und LDH-A hingegen wiesen keine Differenzen innerhalb der beiden Ovarialkarzinomzelllinien auf. HK-II war als einziges Enzym in IGROV-1-Zellen höher exprimiert (Abbildung 16A).



**Abbildung 16: Vergleichende Proteinexpressionsanalysen Energiestoffwechsel-assoziiierter Enzyme und Transporter der verwendeten Karzinomzelllinien**

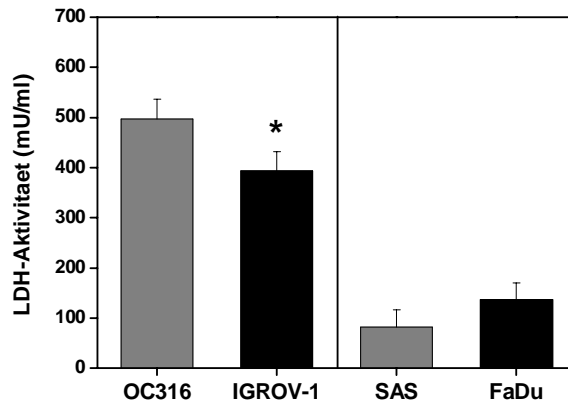
Gezeigt ist die relative Proteinexpression von neun Enzymen der beiden humanen Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 (A) sowie der beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und FaDu (B). Jeweils auf  $\alpha$ -Tubulin normiert und auf eine Linie pro Entität bezogen. Dargestellt sind MW und SD aus drei unabhängigen Versuchen. \* $p < 0,05$  OC316 vs. IGROV-1 bzw. SAS vs. FaDu.

Die beiden humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und FaDu wiesen ein homogeneres Proteinexpressionsmuster auf (Abbildung 16B). Die Proteine CA-IX, COX-IV, HK-II und PK-M2 waren bei SAS etwas stärker exprimiert, jedoch statistisch nicht signifikant unterschiedlich zur Zelllinie FaDu. GLUT-1, MCT-4 und PDH-E1 $\beta$  zeigten ein ähnliches Proteinexpressionsniveau, wohingegen MCT-1 und LDH-A bei FaDu leicht erhöht nachzuweisen waren.

### 3.1.2.2 Bestimmung der LDH-Enzymaktivität

Das zur Messung der LDH-Aktivität verwendete „Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit“ der Firma BioVision Inc. zeigte, dass die LDH-Aktivität (mU/ml) der beiden Ovarialkarzinomzelllinien um den Faktor fünf höher war als die der Plattenepithelkarzinomzelllinien (Abbildung 17). Des Weiteren besaßen OC316-Zellen eine um 20 % höhere LDH-Aktivität als IGROV-1-Zellen.

Zwischen den Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und FaDu konnte kein statistisch relevanter Unterschied gemessen werden. Dargestellt sind MW und SD aus vier unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 17: LDH-Aktivitäten der vier verwendeten Zelllinien**

Gezeigt sind die Aktivitäten des Enzyms LDH. Dargestellt sind MW und SD aus vier unabhängigen Versuchen. \* $p < 0,05$  OC316 vs. IGROV-1 bzw. SAS vs. FaDu.

### 3.1.3 Charakterisierung des zellulären Energiestoffwechsels

#### 3.1.3.1 Sauerstoffverbrauchs-, Azidifizierungs- und Kohlenstoffdioxidentwicklungsraten

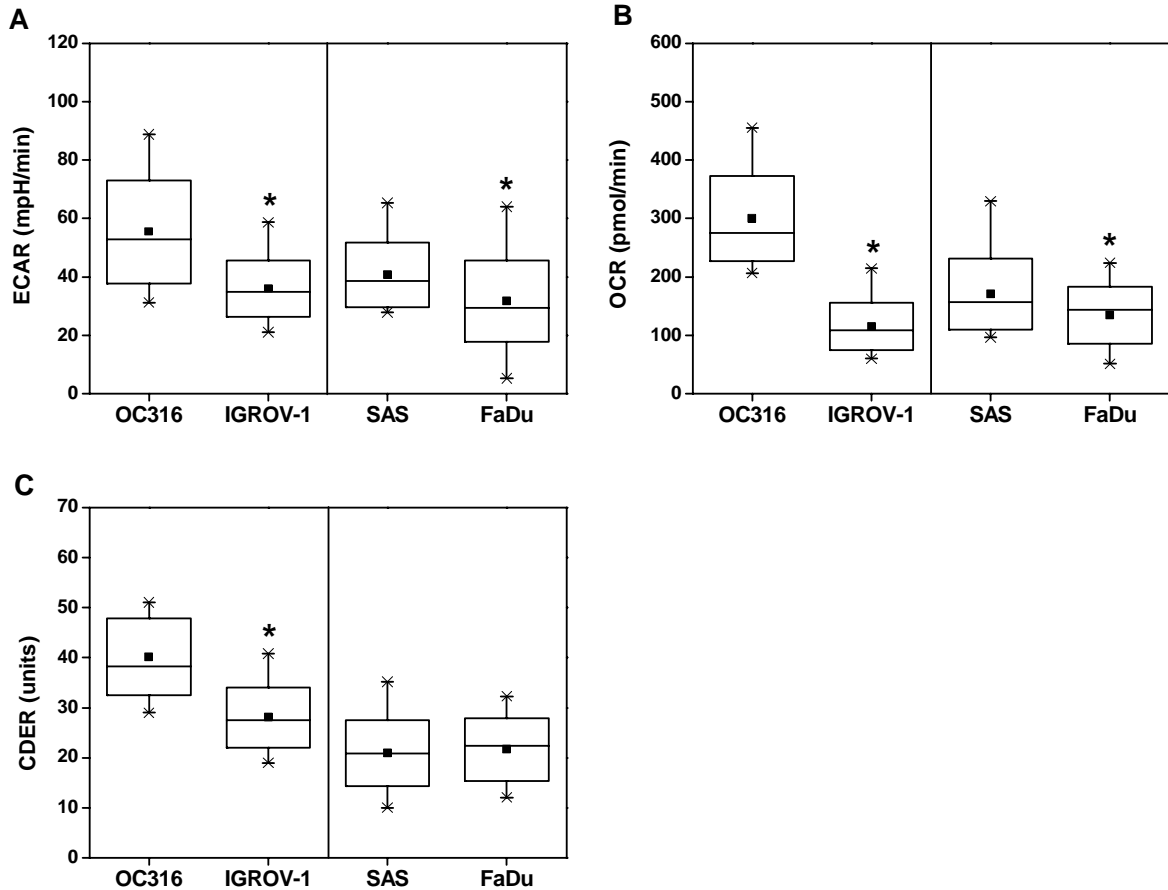
Der Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 (Seahorse Bioscience) ist zur simultanen Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR), der Azidifizierungsrate (ECAR) und der Kohlenstoffdioxidentwicklungsrates (CDER) im Medienüberstand adhärent wachsender Zellen konzipiert.

Abbildung 18A zeigt die basale ECAR der beiden humanen Ovarial- und Plattenepithelkarzinomzelllinien. OC316-Zellen zeigten im Mittel eine um 57 % und SAS um 30 % höhere extrazelluläre Azidifizierungsrate als IGROV-1- bzw. FaDu-Zellen. Die Sauerstoffverbrauchsraten (Abbildung 18B) der Linien OC316 und SAS überstiegen die basalen Raten von IGROV-1 bzw. FaDu um 160 % bzw. 27 %. Die in Abbildung 18C dargestellten Kohlenstoffdioxidentwicklungsrates unterschieden sich ausschließlich innerhalb der beiden Ovarialkarzinomzelllinien. OC316-Zellen wiesen eine um 43 % gesteigerte CDER verglichen mit IGROV-1 auf. Innerhalb der beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien konnte bezüglich der CDER kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Auffallend ist der Befund, dass Tumorentitäten übergreifend die Zelllinie mit der höheren ECAR auch eine höhere OCR aufwies ( $R^2 = 0,930$ , nicht grafisch dargestellt).

Hinsichtlich ECAR und OCR konnten drastische Unterschiede zwischen den vier untersuchten Zelllinien festgestellt werden. Innerhalb der beiden Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 wurden außerdem signifikante Unterschiede bezüglich der CDER

nachgewiesen. Die basalen metabolischen Umsatzraten der beiden Ovarialkarzinomzelllinien waren different, wobei OC316-Zellen die allgemein höchsten Messwerte generierten (Abbildung 18).



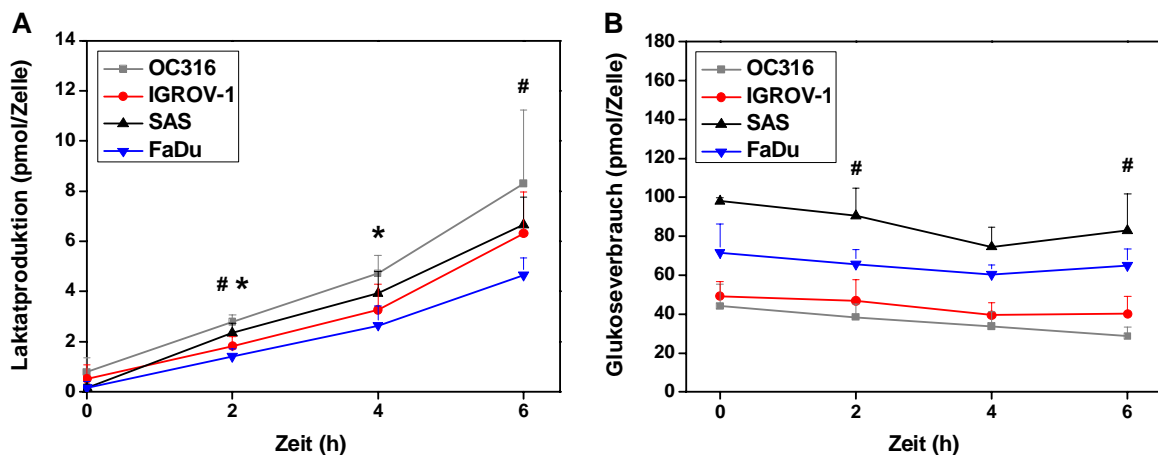
**Abbildung 18: Basale ECAR, OCR und CDER der verwendeten Karzinomzelllinien**  
**(A)** ECAR, **(B)** OCR und **(C)** CDER der Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu. Gezeigt sind MW (Quadrat), Median (Strich), SD (Box) sowie Minimal- und Maximalwerte (Whisker) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. \*p < 0,05 OC316 vs. IGROV-1 bzw. SAS vs. FaDu.

### 3.1.3.2 Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsraten

Der für Metabolitmessungen in Zellkulturüberständen konzipierte SUPER GL2-Analysator (Dr. Müller Gerätebau GmbH) ist ein Gerät für biochemische Analysen von Glukose und Laktat in humanem Probenmaterial. Die Laktat- und Glukosemesswerte wurden auf die jeweilige Zellzahl bezogen (pmol/Zelle) und in Abhängigkeit von der Zeit grafisch aufgetragen (Abbildung 19). Darauf folgend wurden durch die Messpunkte lineare Regressionsgeraden gelegt und anhand deren Steigungen die Produktions- und Verbrauchsraten berechnet, um mögliche Unterschiede im Glukosestoffwechsel zwischen den einzelnen Zelllinien zu verdeutlichen.

Abbildung 19A zeigt den Verlauf der extrazellulären Laktatanreicherung der vier untersuchten Zelllinien pro Zelle über einen Zeitraum von 6 h. Für alle Zelllinien war eine Akkumulation von Laktat im Medienüberstand zu verzeichnen. Zugleich wiesen die Zelllinien eindeutige Unterschiede in ihrer Laktatproduktion auf. Folgende Laktatproduktionsraten wurden anhand der Messdaten errechnet: OC316  $1,22 \pm 0,48$  pmol/Zelle/h; SAS  $1,05 \pm 0,21$  pmol/Zelle/h; IGROV-1  $0,94 \pm 0,23$  pmol/Zelle/h und FaDu  $0,74 \pm 0,10$  pmol/Zelle/h. Die nach 6 h akkumulierte Laktatkonzentration im Medienüberstand variierte zwischen  $8,30 \pm 2,92$  pmol/Zelle für OC316 und  $4,65 \pm 0,69$  pmol/Zelle für FaDu. Die extrazelluläre Konzentration an gebildetem Laktat unterschied sich zwischen den beiden Zelllinien einer Entität signifikant nach 2 h sowie zwischen den Ovarialkarzinomzelllinien nach 4 h und den Plattenepithelkarzinomzelllinien nach 6 h.

Es fällt auf, dass die errechneten Laktatproduktionsraten relativ gut mit der entsprechenden ECAR (Abbildung 18A) korrelierten ( $R^2 = 0,886$ , nicht grafisch dargestellt).



**Abbildung 19: Laktatproduktion und Glukoseverbrauch der Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu**

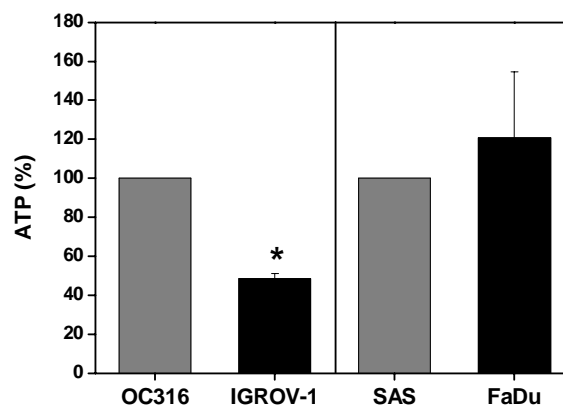
In Zellkulturüberständen der vier Karzinomzelllinien wurden die Laktatproduktion und der Glukoseverbrauch zu definierten Zeitpunkten über einen Versuchszeitraum von 6 h bestimmt und auf die Zellzahl bezogen. **(A)** Laktatproduktion in pmol/Zelle (MW und SD) aus drei unabhängigen Versuchen. **(B)** Glukoseverbrauch in pmol/Zelle (MW und SD) aus drei unabhängigen Versuchen. Die Daten wurden aus den in Abbildung 19A gezeigten Proben erhoben. \* $p < 0,05$  OC316 vs. IGROV-1; # $p < 0,05$  SAS vs. FaDu.

Der Glukoseverbrauch der vier untersuchten Zelllinien über einen Zeitraum von 6 h ist in Abbildung 19B dargestellt. Hierbei handelt es sich um den identischen Probensatz analog der Abbildung 19A. Die Glukosekonzentrationen zum Zeitpunkt 0 h variierten abhängig vom verwendeten Medium und der Anfangszellzahl. Innerhalb des Versuchszeitraums von 6 h wurden, ausgehend von den jeweiligen Kinetiken, folgende Glukoseverbrauchsrate errechnet: SAS  $2,60 \pm 2,84$  pmol/Zelle/h; OC316  $2,02 \pm 2,16$  pmol/Zelle/h; IGROV-1  $1,59 \pm 1,91$  pmol/Zelle/h und FaDu  $1,26 \pm 1,29$  pmol/Zelle/h.

Nach 6 h verbrauchten die Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 36 % bzw. 19 % der im Medium gelösten Glukose. SAS metabolisierte 15 % und FaDu 9 % der anfänglich vorhandenen Menge an Glukose. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien einer Entität konnte im extrazellulären Glukoseverbrauch nur für die beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien nach 2 h und 6 h Versuchsdauer gezeigt werden.

### 3.1.3.3 Intrazellulärer ATP-Gehalt

Der intrazelluläre ATP-Gehalt der vier Karzinomzelllinien wurde mit Hilfe des Cell Titer-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation) bestimmt. Bei den in Abbildung 20 gezeigten relativen ATP-Konzentrationen wurde das Messergebnis einer Zelllinie pro Tumorentität auf 100 % gesetzt. Innerhalb der Ovarialkarzinomzelllinien besaß IGROV-1 einen 50 % geringeren intrazellulären ATP-Gehalt als OC316. Die beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und FaDu wiesen einen ähnlichen intrazellulären ATP-Gehalt auf. Gezeigt sind MW und SD aus sechs unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 20: Relativer intrazellulärer ATP-Gehalt der vier Karzinomzelllinien**

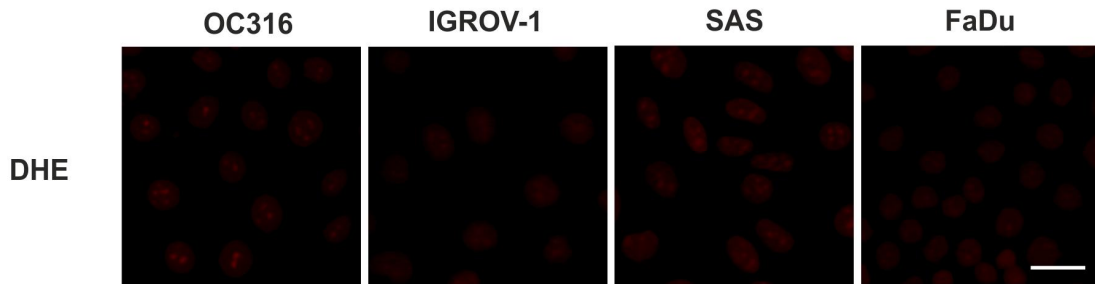
Gezeigt ist der relative intrazelluläre ATP-Gehalt der Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu. OC316 und SAS wurden aus sechs unabhängigen Versuchen auf 100 % gesetzt. Anhand dieser Linien wurden die relativen ATP-Konzentrationen (MW und SD) der Linien IGROV-1 bzw. FaDu berechnet. \* $p < 0,05$  OC316 vs. IGROV-1 bzw. SAS vs. FaDu.

### 3.1.4 Charakterisierung des Redoxstatus

#### 3.1.4.1 Nachweis von $O_2^-$ -Anionen

In Abbildung 21 sind exemplarisch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DHE-Färbungen der vier verwendeten Tumorzelllinien dargestellt. Innerhalb der Ovarialkarzinomzelllinien war bei OC316 im Vergleich zu IGROV-1 ein erhöhtes Fluoreszenzsignal zu sehen. Das durch die Wechselwirkung von DHE mit  $O_2^-$ -Anionen gebildete Ethidium interkalierte konzentriert an bestimmte DNA-Bereiche von OC316-Zellen, die in Form hell

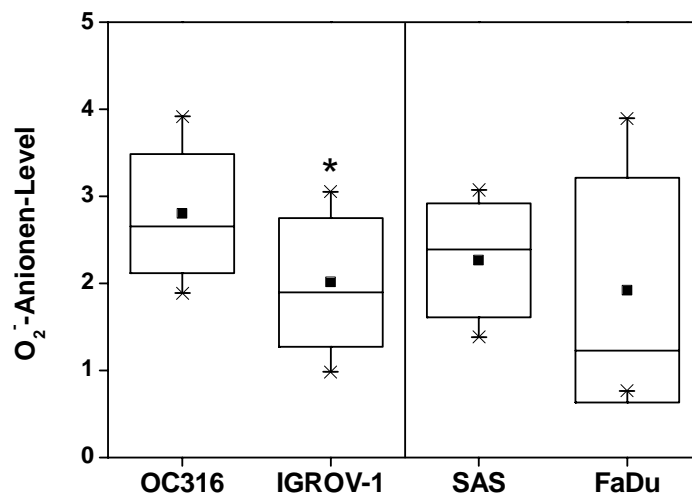
leuchtender Spots im Nukleus sichtbar wurden. Zwischen SAS und FaDu war optisch kein Unterschied in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen. Das detektierte Fluoreszenzsignal war im Vergleich zu dessen Intensität nach UV-Strahlung (Abbildung 38) oder dem Einfluss chemischer Noxen (Abbildung 40) erwartungsgemäß gering. Des Weiteren wirkten einer Akkumulation von  $O_2^-$ -Anionen die hohe chemische Reaktionsfreudigkeit sowie die enzymatisch katalysierte Eliminierung entgegen.



**Abbildung 21: DHE-Färbung der vier Tumorzelllinien**

Gezeigt sind exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen DHE-gefärbter Zellen. Die Intensität der Rotfärbung fungiert als Indikator für  $O_2^-$ -Anionen. Maßstab 30  $\mu$ m.

Die computergestützte Quantifikation des vom Ethidium ausgehenden Fluoreszenzsignals ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Menge des vom Ethidium ausgehenden Signals wurde mittels der parallel mitgeführten DAPI-Kernfärbungen auf die Zellkernfläche pro Bild normalisiert. Gezeigt sind MW und SD aus vier unabhängigen Versuchen.



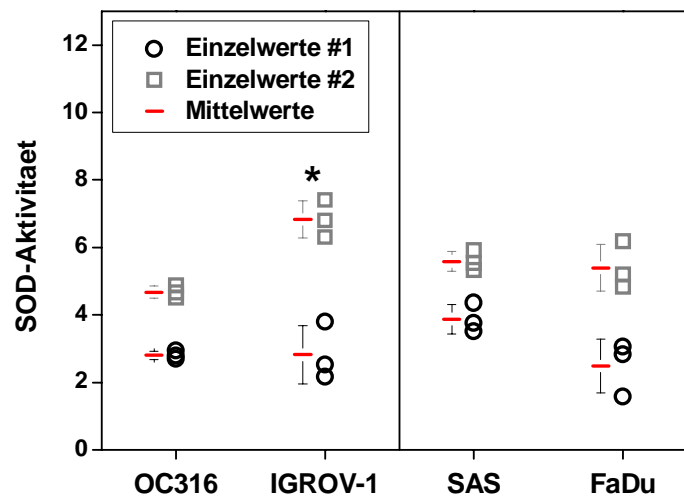
**Abbildung 22:  $O_2^-$ -Anionen-Level von vier humanen Karzinomzelllinien**

Gezeigt sind die intrazellulären  $O_2^-$ -Anionen-Level von vier humanen Karzinomzelllinien. Zur Visualisierung des Radikals wurde eine DHE-Färbung verwendet. DHE wird unter Anwesenheit von  $O_2^-$ -Anionen zu Ethidium oxidiert. Das vom Fluorophor Ethidium ausgehende Signal wurde mittels einer mitgeführten DAPI-Kernfärbung auf die Zellkernfläche normalisiert. Gezeigt sind MW (Quadrat), Median (Strich), SD (Box) sowie Minimal- und Maximalwerte (Whisker) aus vier unabhängigen Versuchen. \* $p < 0,05$  OC316 vs. IGROV-1 bzw. SAS vs. FaDu.

Die hoch-metabolische Ovarialkarzinomzelllinie OC316 zeigte einen signifikant höheren intrazellulären Gehalt des  $O_2^-$ -Anions als IGROV-1. Zwischen den Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und FaDu konnte computergestützt kein statistisch signifikanter Unterschied gemessen werden (Abbildung 22).

### 3.1.4.2 Bestimmung der SOD-Aktivität

Die SOD-Aktivität der vier Tumorzelllinien wurde mit Hilfe des kommerziellen Kits „Superoxid Dismutase (SOD) Activity Assay Kit“ der Firma BioVision Inc. untersucht. Die gezeigten Daten umfassen die durchgeführten Dreifachbestimmungen sowie den MW und die SD aus zwei unabhängigen Versuchen (Abbildung 23).



**Abbildung 23: SOD-Aktivitäten der vier verwendeten Tumorzelllinien**

Gezeigt sind die Aktivitäten des Enzyms SOD als Einzelwerte der durchgeführten Dreifachbestimmungen sowie die daraus errechneten MW und SD aus zwei unabhängigen Versuchen. \* $p < 0,05$  OC316 vs. IGROV-1 und SAS vs. FaDu.

Zwischen den beiden Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 konnte im ersten Versuch kein Unterschied bezüglich der SOD-Aktivität gemessen werden. Im zweiten unabhängigen Versuch überstieg die SOD-Enzymaktivität der Linie IGROV-1 jene der Linie OC316 signifikant um 46 %. Für die Plattenepithelkarzinomzelllinie SAS konnte im ersten Versuch eine um 35 % höhere Aktivität nachgewiesen werden. Im zweiten Versuch betrug der Aktivitätsunterschied der Linie SAS gegenüber FaDu lediglich 4 %.

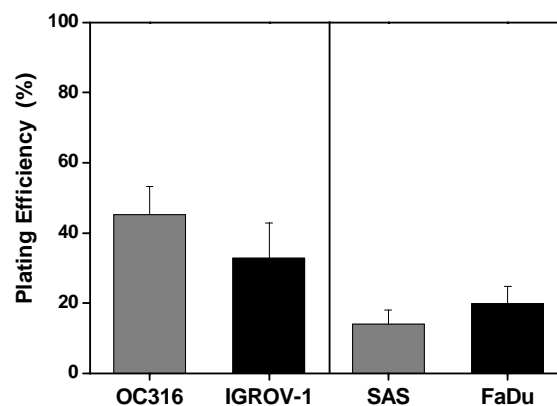


### 3.2 Klonogenes Überleben und Radiosensibilität

Im folgenden Kapitel wird die Anzahl koloniebildungsfähiger Zellen, das klonogene Überleben sowie die Ausbildung und Reparatur von DNA-DSBs nach 0-8 Gy Gammabestrahlung eruiert.

#### 3.2.1 Klonogenitätstests

In Abbildung 24 sind die MW der PEs der vier verwendeten Zelllinien aus drei unabhängigen Versuchen und deren SD aufgeführt. Die PEs wurden nach Formel (II) errechnet.



**Abbildung 24: PE der vier untersuchten Karzinomzelllinien**

Gezeigt ist die PE der unbehandelten Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu. Dargestellt sind MW und SD aus drei unabhängigen Versuchen.

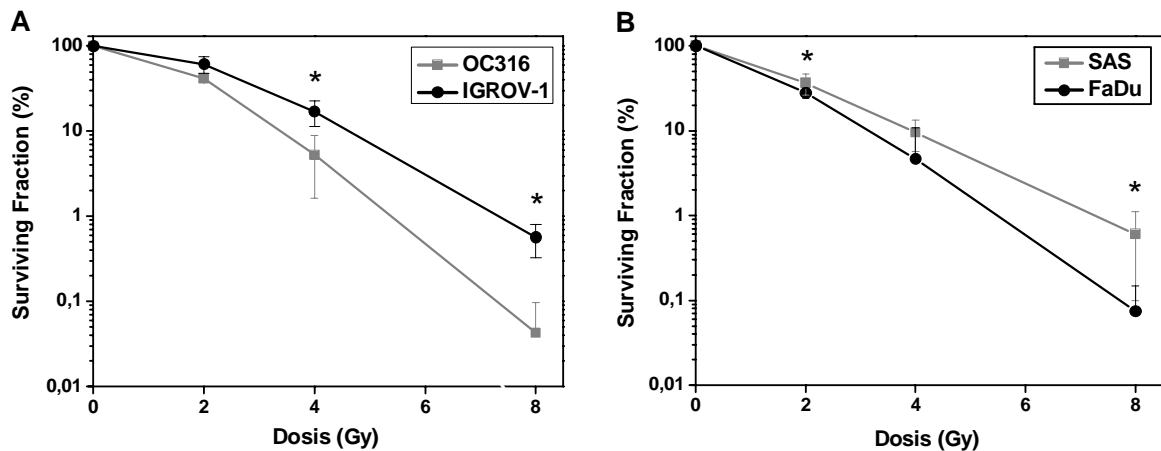
Die Ovarialkarzinomzelllinien zeigten eine wesentlich höhere Koloniebildungsfähigkeit als die beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien aus dem Kopf- und Halsbereich. Signifikante Unterschiede innerhalb einer Tumorentität konnten nicht nachgewiesen werden.

#### 3.2.2 Überlebenskurven nach Gammabestrahlung

Durch die Gammabestrahlung wird in den behandelten Proben im Vergleich zu den Kontrollen der Anteil koloniebildungsfähiger, das heißt klonogener Zellen reduziert. Die SF wurde entsprechend Formel (III) berechnet.

In Abbildung 25 sind die MW und SD der Überlebenskurven der vier untersuchten Tumorzelllinien dargestellt. Es wurden drei unabhängige Versuche mit den Dosen 0, 2, 4 und 8 Gy durchgeführt. OC316- und IGROV-1-Zellen (Abbildung 25A) zeigten ein ähnliches relatives klonogenes Überleben nach 2 Gy Gammabestrahlung. Bei höheren Strahlendosen überlebten OC316 signifikant schlechter als IGROV-1-Zellen. Im anfänglichen Kurvenverlauf, also bei niedrigen Dosen, war bei beiden Ovarialkarzinomzelllinien eine

sogenannte Schulter zu erkennen. Bei höheren Dosen ging die Kurve in einen annähernd exponentiellen Verlauf über.



**Abbildung 25: SF der untersuchten Karzinomzelllinien nach Gammabestahlung**

Gezeigt sind MW und SD der SF als Funktion der Strahlendosis aus drei unabhängigen Versuchen. \* $p < 0,05$  OC316 vs. IGROV-1 bzw. SAS vs. FaDu.

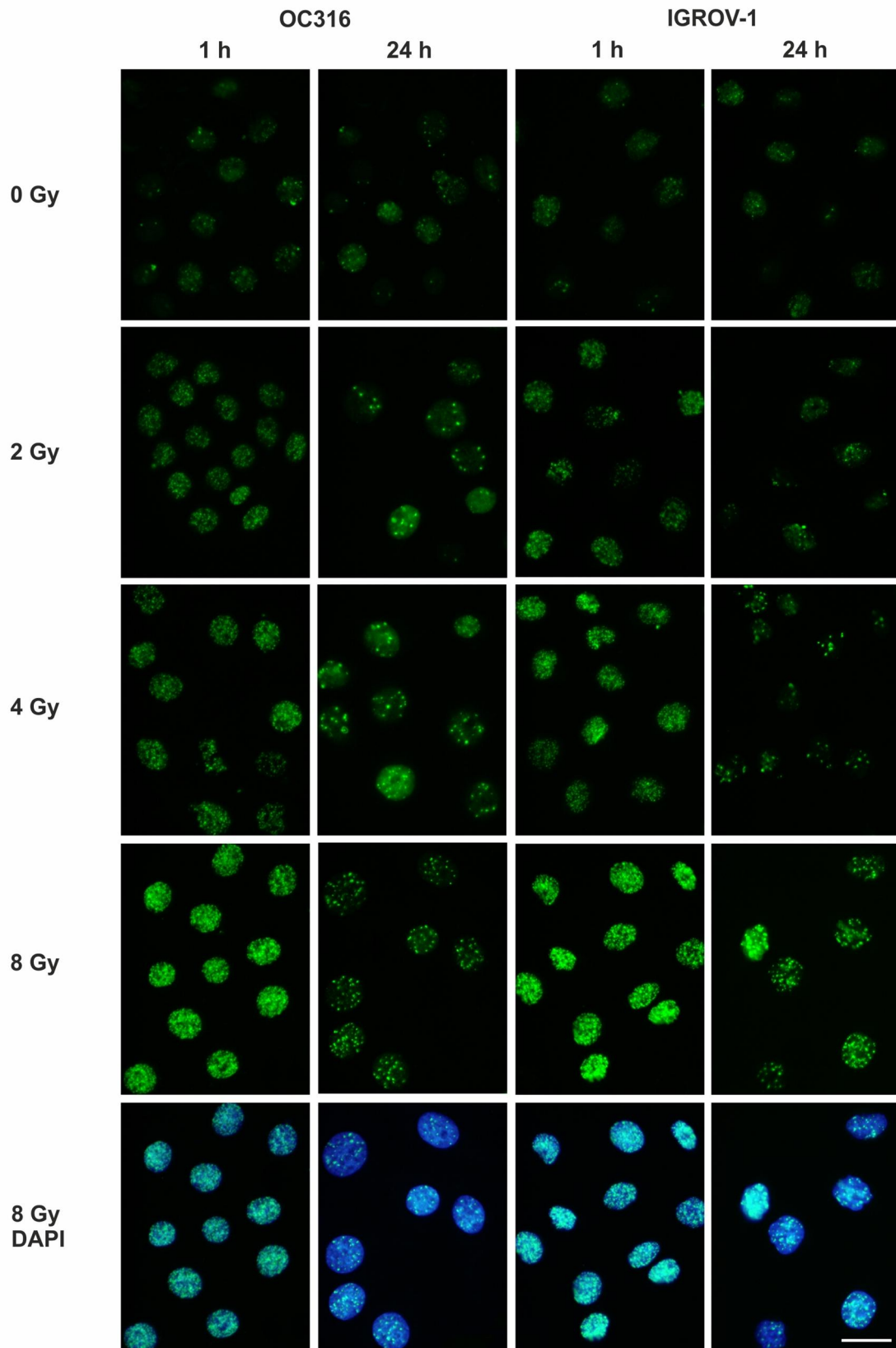
Die Überlebenskurven von SAS- und FaDu-Zellen in Abbildung 25B unterschieden sich bei Dosen von 2 Gy und 8 Gy signifikant voneinander. SAS-Zellen verfügten hierbei über ein höheres klonogenes Überleben. Das Fehlen einer ausgeprägten Schulter bei SAS und FaDu deutet auf eine generell erhöhte Strahlenempfindlichkeit beider Linien bei niedrigen Dosen hin.

### 3.2.3 $\gamma$ H2AX-Foci nach Gammabestahlung

DSBs führen zu einer Initiierung der Phosphorylierung der Histon-Untereinheit H2AX zu  $\gamma$ H2AX, die immunhistologisch nachweisbar ist.

In Abbildung 26 und Abbildung 28 sind repräsentative  $\gamma$ H2AX-Färbungen der verwendeten Ovarial- und Plattenepithelkarzinomzelllinien bei 600facher mikroskopischer Vergrößerung als Funktion der Strahlungsdosis und der Zeit nach Bestrahlung gezeigt. Die Auszählung der  $\gamma$ H2AX markierten DSBs erfolgte computergestützt unter Berücksichtigung der Zellzahl (Abbildung 27 und Abbildung 29).

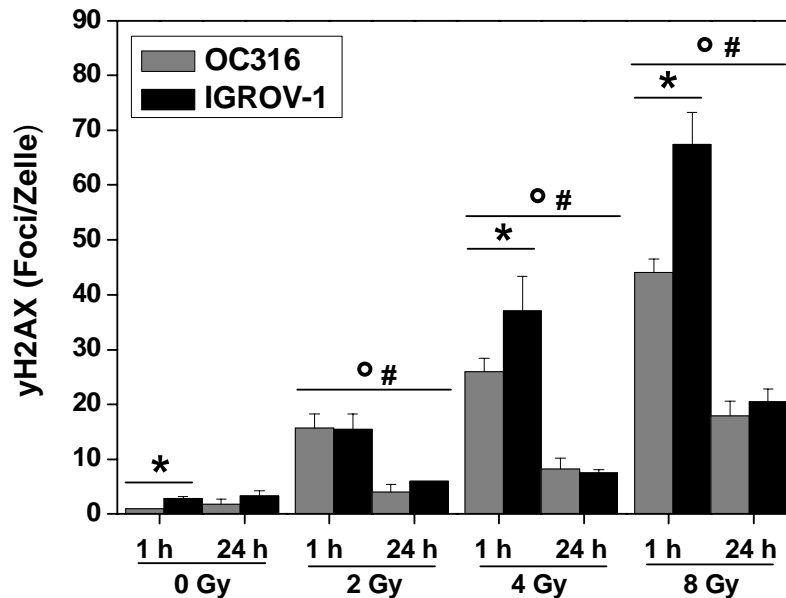
Für OC316 und IGROV-1 war eine dosisabhängige Zunahme der  $\gamma$ H2AX-gefärbten DSBs sowie eine Reduktion der Foci 24 h nach Bestrahlung zu erkennen. Für die Dosis 8 Gy ist beispielhaft die Überlagerung der  $\gamma$ H2AX-Färbung mit der DAPI-Kernfärbung gezeigt. Es wird deutlich, dass die Foci als intensiv gefärbte grüne Punkte ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind (Abbildung 26).



**Abbildung 26:  $\gamma$ H2AX-Färbungen 1 h und 24 h nach Gammabestrahlung in OC316- und IGROV-1-Zellen**

Gezeigt sind repräsentative  $\gamma$ H2AX-Färbungen (grün) der beiden Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 jeweils 1 h und 24 h nach 0-8 Gy Gammabestrahlung. Für 8 Gy sind die  $\gamma$ H2AX-Färbungen inklusive die für die Auswertung relevante mitgeführte DAPI-Kernfärbung (blau) gezeigt. Maßstab 30  $\mu$ m.

Die computergestützte Auswertung der immunhistologischen  $\gamma$ H2AX-Färbungen beruht auf durchschnittlich 150 ausgewerteten Zellen pro Zelllinie, Zeitpunkt und Dosis (Abbildung 27). Aufgetragen sind die  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle gegen den Zeitpunkt nach Bestrahlung sowie der Bestrahlungsdosis in Gy.

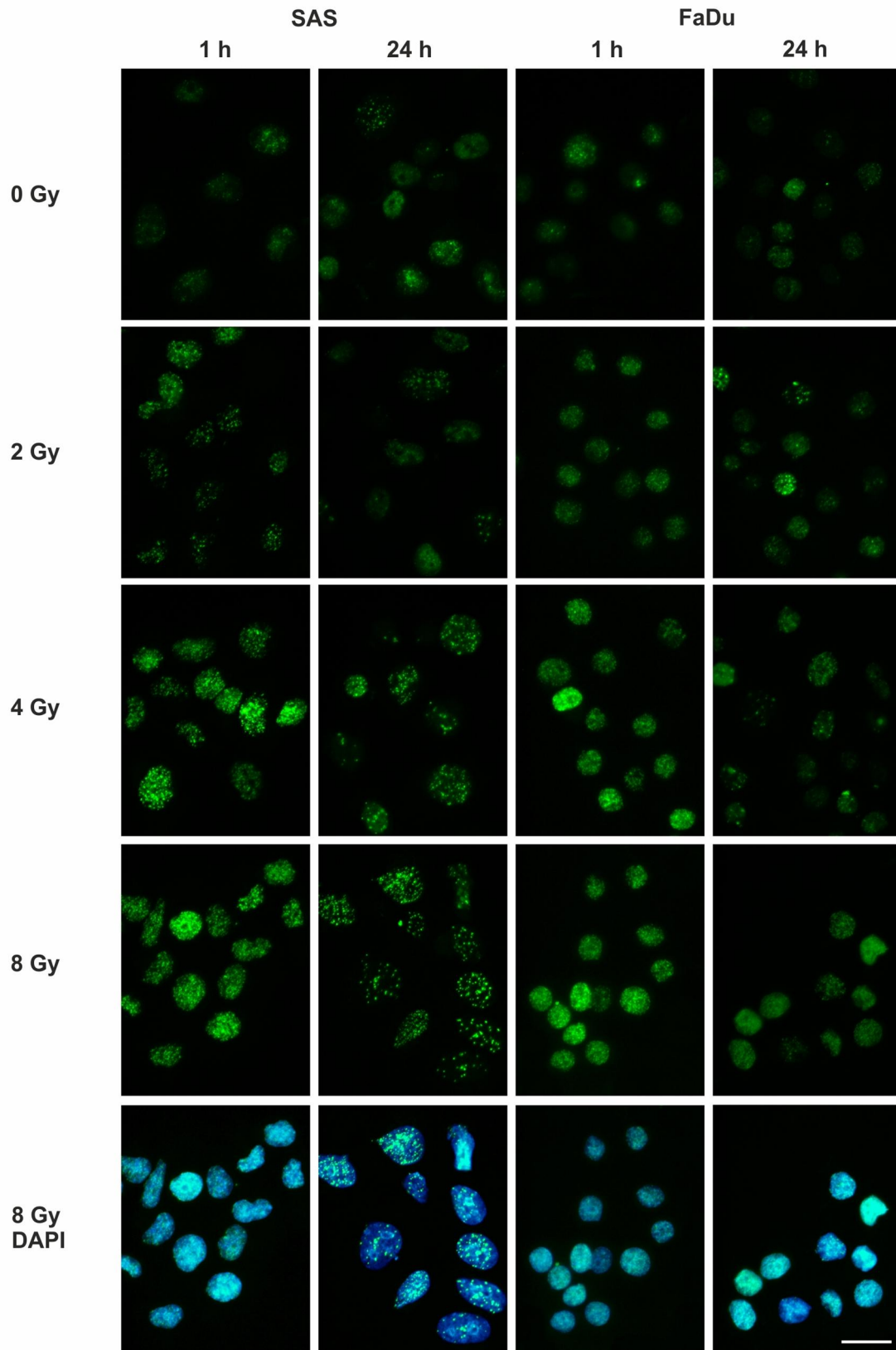


**Abbildung 27: Quantifizierung von DSBs anhand  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen in OC316- und IGROV-1-Zellen 1 h und 24 h nach Gammabestrahlung**

Gezeigt sind durch  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung markierte Foci/Zelle der Tumorzelllinien OC316 und IGROV-1, 1 h und 24 h nach 0-8 Gy Gammabestrahlung. \* $p < 0,05$  OC316 vs. IGROV-1;  $^{\circ}p < 0,05$  OC316 bzw.  $^{\#}p < 0,05$  IGROV-1 1 h vs. 24 h nach Bestrahlung. Die MW und SD basieren auf drei unabhängigen Versuchen, was einer Summe von circa 150 ausgewerteten Zellen pro Zelllinie, Strahlendosis und Zeitpunkt entspricht.

Die computergestützte Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci in den Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 in Abbildung 27 bildet die Auswirkung von Gammabestrahlung auf die Ausbildung von DSBs ab. Mit steigender Strahlendosis erhöhte sich die Anzahl der direkten (1 h) sowie der residualen (24 h)  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle. Des Weiteren war die Anzahl residualer  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle 24 h nach Bestrahlung in beiden Linien signifikant geringer als 1 h nach Bestrahlung. OC316- und IGROV-1-Zellen unterschieden sich hinsichtlich der  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle in ihrem Grundniveau (unbestrahlte Zellen) sowie in ihrem initialen Gehalt 1 h nach 4 Gy und 8 Gy Gammabestrahlung. Die Anzahl residualer  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle, 24 h nach Bestrahlung, waren in OC316- und IGROV-1-Zellen kongruent.

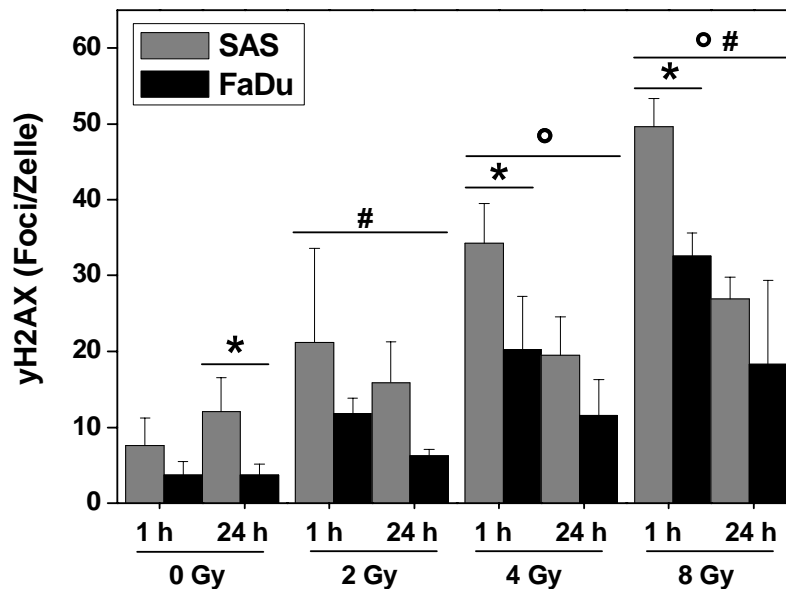
Für die beiden HNSCC-Linien SAS und FaDu war eine dosisabhängige Zunahme der  $\gamma$ H2AX-Foci sowie eine Reduktion 24 h nach Bestrahlung zu verzeichnen. Für die Dosis 8 Gy ist beispielhaft für alle Dosen die Überlagerung der  $\gamma$ H2AX-Färbung mit der für die Quantifizierung relevanten DAPI-Kernfärbung gezeigt (Abbildung 28).



**Abbildung 28:  $\gamma$ H2AX-Färbungen 1 h und 24 h nach Gammabestrahlung in SAS- und FaDu-Zellen**

Gezeigt sind repräsentative  $\gamma$ H2AX-Färbungen (grün) der beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und FaDu jeweils 1 h und 24 h nach 0-8 Gy Gammabestrahlung. Für 8 Gy sind die  $\gamma$ H2AX-Färbungen inklusive die für die Auswertung relevante mitgeführte DAPI-Kernfärbung (blau) gezeigt. Maßstab 30  $\mu$ m.

Die computergestützte Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Färbung der HNSCC-Zelllinien SAS und FaDu ist in Abbildung 29 dargestellt. Es konnte eine dosisabhängige Zunahme der direkten (1 h) sowie der residualen (24 h)  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle verzeichnet werden. Obendrein reduzierte sich die Anzahl der initial  $\gamma$ H2AX-markierten DSBs 24 h nach Gammabestrahlung. Das Grundniveau (unbestrahlte Zellen) unterschied sich signifikant 24 h nach dem Transport zur Strahlenquelle. Weitere Signifikanzen zwischen SAS und FaDu betrafen die initialen Gehalt (1 h) nach 4 Gy und 8 Gy Gammabestrahlung. Hier überstiegen die für SAS detektierten  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle diejenigen der Linie FaDu.



**Abbildung 29: Quantifizierung von DSBs anhand  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen in SAS- und FaDu-Zellen 1 h und 24 h nach Gammabestrahlung**

Gezeigt sind durch  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung markierte Foci/Zelle der Tumorzellen SAS und FaDu, 1 h und 24 h nach 0-8 Gy Gammabestrahlung. \* $p < 0,05$  SAS vs. FaDu;  $^{\circ}p < 0,05$  SAS bzw.  $^{\#}p < 0,05$  FaDu 1 h vs. 24 h nach Bestrahlung. MW und SD basieren auf drei unabhängigen Versuchen, was einer Summe von circa 150 ausgewerteten Zellen pro Zelllinie, Strahlendosis und Zeitpunkt entspricht.

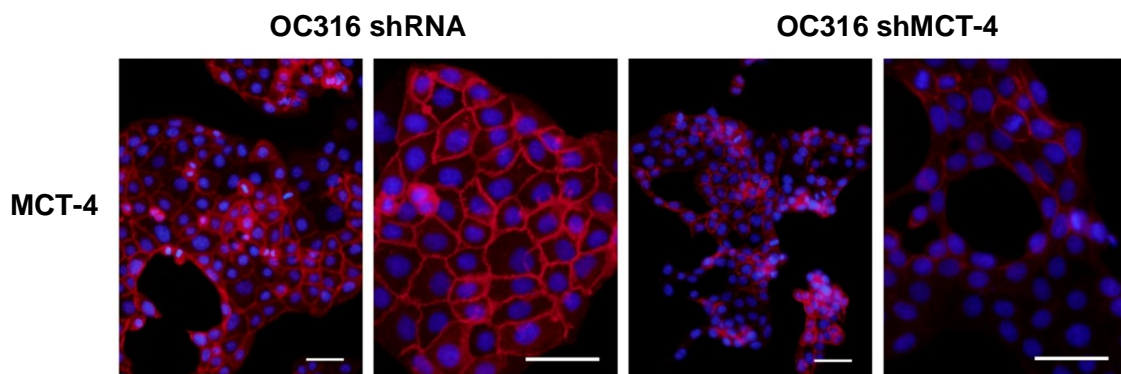
### 3.3 Stoffwechselmanipulation von Tumorzellen

Im folgenden Kapitel wird der Einfluss einer gentechnischen Stoffwechselmanipulation auf den Energiestoffwechsel der Ovarialkarzinomzelllinie OC316 sowie der Einfluss biochemischer Stoffwechselmanipulatoren auf den Tumorstoffwechsel, das klonogene Überleben sowie die Ausbildung und Reparatur von DNA-DSBs nach 0-8 Gy Gammabestrahlung und den intrazellulären Redoxstatus auf zwei Ovarial- und zwei HNSCC-Zelllinien untersucht.

### 3.3.1 Gentechnische Stoffwechselmanipulation

Die humane Ovarialkarzinomzelllinie OC316 wurde bezüglich der Expression des Proteins MCT-4 genetisch verändert. Hierzu musste die für MCT-4 shRNA kodierende DNA-Sequenz in das Genom von Lentiviren kloniert und dieser Vektor mittels Transduktion in die OC316-Tumorzellen überführt werden. Die so genetisch veränderten Zellen wurden als OC316 shMCT-4 bezeichnet. Die Transduktion der mitgeführten Kontrollzellen OC316 shRNA erfolgte mit selbigem viralen Vektor, jedoch exklusiv der shMCT-4 DNA-Sequenz.

In Abbildung 30 sind exemplarische immunhistologische MCT-4-Fluoreszenzfärbungen der Zelllinien OC316 shRNA und OC316 shMCT-4 zu sehen. Grundsätzlich war bei beiden Linien die Lokalisierung des Proteins auf der Zellmembran deutlich zu erkennen, besonders bei 400facher Vergrößerung. Zugleich war optisch wahrzunehmen, dass von den transfizierten OC316 shMCT-4-Zellen im Vergleich zu den mit dem Leervektor behandelten Kontrollzellen OC316 shRNA ein generell schwächeres Immunfluoreszenzsignal ausging.



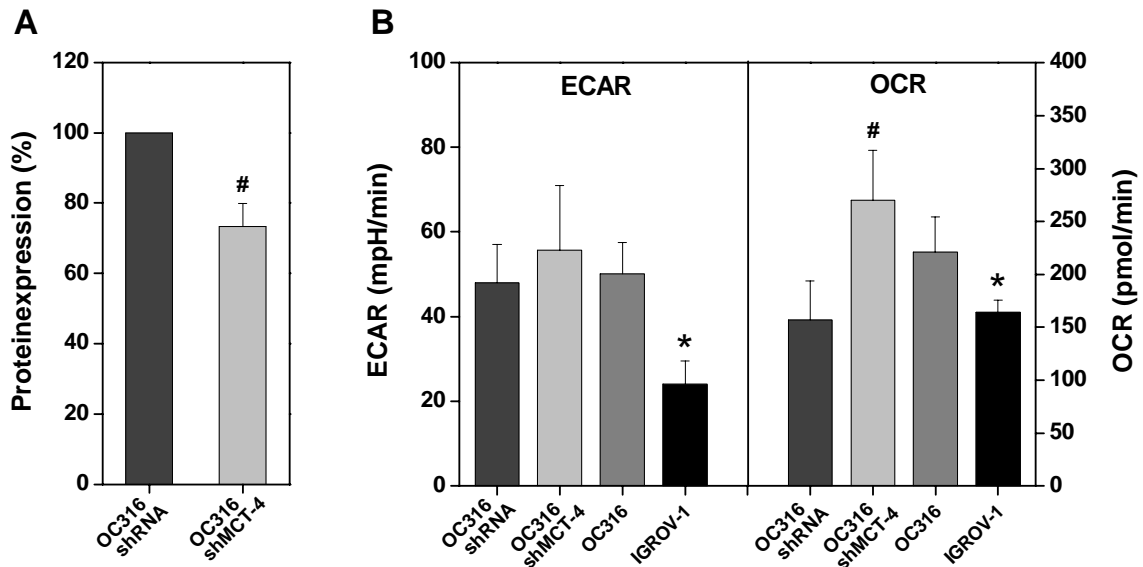
**Abbildung 30: MCT-4-Immunfluoreszenzfärbungen an transfizierten OC316-Zellen**

Gezeigt sind exemplarische Immunfluoreszenzfärbungen von OC316 shRNA- und OC316 shMCT-4-Zellen in jeweils 200 und 400facher Vergrößerung. Das vorwiegend membranständige Protein MCT-4 ist rot, Zellkerne blau (DAPI) gefärbt. Der Maßstab der 200 und der 400fachen Vergrößerungen entspricht jeweils 50 µm.

Die computergestützte Quantifizierung der MCT-4-Immunfluoreszenzfärbungen ergab ein signifikant geringeres Fluoreszenzsignal der OC316 shMCT-4 im Vergleich zu den Kontrollzellen, und zwar um  $40 \% \pm 4,4 \%$  bei 200facher Vergrößerung und  $53 \% \pm 11,8 \%$  bei 400facher Vergrößerung (nicht grafisch dargestellt). Hieraus ist zu schließen, dass die OC316 shMCT-4-Zellen eine Herunterregulation des MCT-4-Proteins erfuhren.

Das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbungen wurde durch drei unabhängige In-Cell Western-Versuche bestätigt. Hierbei war die relative MCT-4-Proteinexpression bei OC316 shMCT-4-Zellen gegenüber den Kontrollzellen im Mittel um 27 % reduziert (Abbildung 31A).

Abschließend wurden die metabolischen Umsatzraten, ECAR und OCR der transfizierten und mitgeführten unbehandelten OC316- und IGROV-1-Zellen mittels des Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 bestimmt (Abbildung 31B).



**Abbildung 31: MCT-4-Proteinexpression und metabolische Charakterisierung transfizierter Ovarialkarzinomzelllinien**

(A) Gezeigt sind die relativen MCT-4-Proteinexpressionen der transfizierten Zelllinien OC316 shRNA und OC316 shMCT-4, jeweils auf  $\alpha$ -Tubulin normiert und auf OC316 shRNA bezogen. MW und SD resultieren aus drei unabhängigen Versuchen. (B) ECAR und OCR der Zelllinien OC316 shRNA, OC316 shMCT-4, OC316 und IGROV-1. MW aus einer Dreifachbestimmung und SD sind dargestellt. <sup>#</sup> $p < 0,05$  OC316 shRNA vs. OC316 shMCT-4; <sup>\*</sup> $p < 0,05$  OC316 vs. IGROV-1.

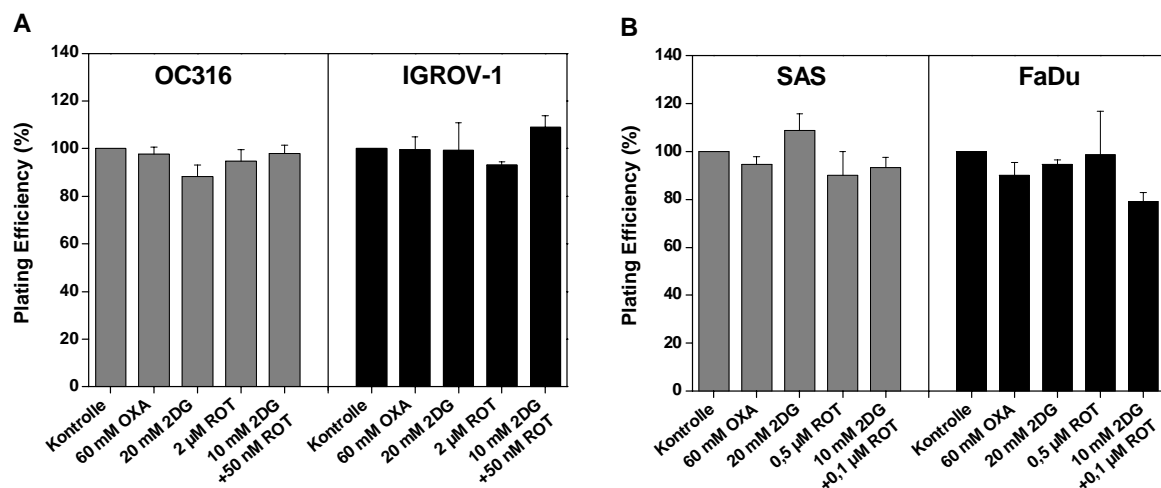
Innerhalb des Typus OC316 war kein Unterschied zwischen den transfizierten und den unbehandelten Zellen für den metabolischen Parameter ECAR auszumachen (Abbildung 31B). Die durch Immunfluoreszenzfärbungen und In-Cell Western detektierte Reduktion der MCT-4-Proteinexpression führte zu keiner Veränderung der ECAR. Die unbehandelten OC316-Zellen zeigten die in Abbildung 18 beschriebene signifikante Differenz der ECAR von 50 % im Vergleich zu IGROV-1. Hingegen war die OCR signifikant unterschiedlich zwischen OC316 shRNA und OC316 shMCT-4. Die shMCT-4 exprimierenden Zellen zeigten eine um 70 % erhöhte OCR gegenüber der Kontrolllinie OC316 shRNA. Im Vergleich zu der mitgeführten unbehandelten parentalen Zelllinie OC316 scheint die drastische Erhöhung jedoch primär durch eine Reduktion der OCR in OC316 shRNA begründet zu sein. Innerhalb der unbehandelten Zelllinien besaß IGROV-1 eine um 25 % reduzierte OCR gegenüber OC316, was den Resultaten vorangegangener Experimente entspricht (Abbildung 18).



### 3.3.2 Dosisfindungstests biochemischer Stoffwechselmanipulatoren

Um mögliche zelltoxische Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten biochemischen Stoffwechselmanipulatoren OXA, 2DG und ROT zu überprüfen, wurde nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Chemikalienkonzentrationen und -Kombinationen ein Dosisfindungstest durchgeführt. Ziel der Dosisfindungstests war, die maximale Chemikalienkonzentration zu ermitteln, die im eingesetzten Zeitfenster von 2 h keine drastischen Zelltoxizitäten aufwies. Angestrebt wurde eine maximale Abnahme der PE von  $\leq 10\%$  gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe.

Hierzu wurden Zellsuspensionen der vier verwendeten Zelllinien 2 h mit den Stoffwechselinhibitoren behandelt und anschließend entsprechend der Klonogenitätstests ausgesät, inkubiert und computergestützt ausgewertet. Der PE-Dosisfindungstest wurde entsprechend Formel (IV) errechnet. Die ermittelten Konzentrationen, die den oben aufgeführten Parametern entsprachen sind in Abbildung 32 grafisch und in Tabelle 8 tabellarisch dargestellt. Auf die Illustration ungeeigneter Chemikalienkonzentrationen wurde verzichtet.



**Abbildung 32: PE der vier untersuchten Tumorzelllinien nach Behandlung mit metabolischen Manipulatoren**

Relative PEs der Zelllinien OC316 und IGROV-1 (**A**) sowie SAS und FaDu (**B**) nach 2 h Behandlung mit verschiedenen metabolischen Inhibitoren. Gezeigt sind MW und SD aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Da die Linien gleicher Entität der Vergleichbarkeit halber mit den identischen Chemikalienkonzentrationen behandelt werden sollten, mussten Kompromisse eingegangen werden, die zu einer höheren Abnahme der PE bei FaDu nach Behandlung mit 10 mM 2DG + 0,1  $\mu$ M ROT führten.

Die im Rahmen der Dosisfindungstests ermittelten maximalen Chemikalienkonzentrationen und -kombinationen (Tabelle 8) wurden hauptsächlich in den folgenden Versuchen (Kapitel 3.3.3 bis 3.3.8) verwendet.

**Tabelle 8: Eingesetzte Konzentrationen von Stoffwechselmanipulatoren**

Die Tabelle zeigt die eingesetzten Konzentrationen der Stoffwechselmanipulatoren OXA, 2DG, ROT und 2DG + ROT auf den verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Eingesetzte Stoffwechselmanipulatoren			
	OXA	2DG	ROT	2DG + ROT
OC316	60 mM	20 mM	2 µM	10 mM 2DG + 50 nM ROT
IGROV-1	60 mM	20 mM	2 µM	10 mM 2DG + 50 nM ROT
SAS	60 mM	20 mM	0,5 µM	10 mM 2DG + 0,1 µM ROT
FaDu	60 mM	20 mM	0,5 µM	10 mM 2DG + 0,1 µM ROT

Höhere Dosen wurden ausschließlich angewandt, um die schon bei niedrigen Dosen beobachteten biologischen Effekte zu intensivieren. Zelltoxizitäten, verbunden mit einer Abnahme der PE > 10 %, sind jedoch bei höheren als den in Abbildung 32 bzw. Tabelle 8 aufgeführten Chemikalienkonzentrationen nicht auszuschließen.

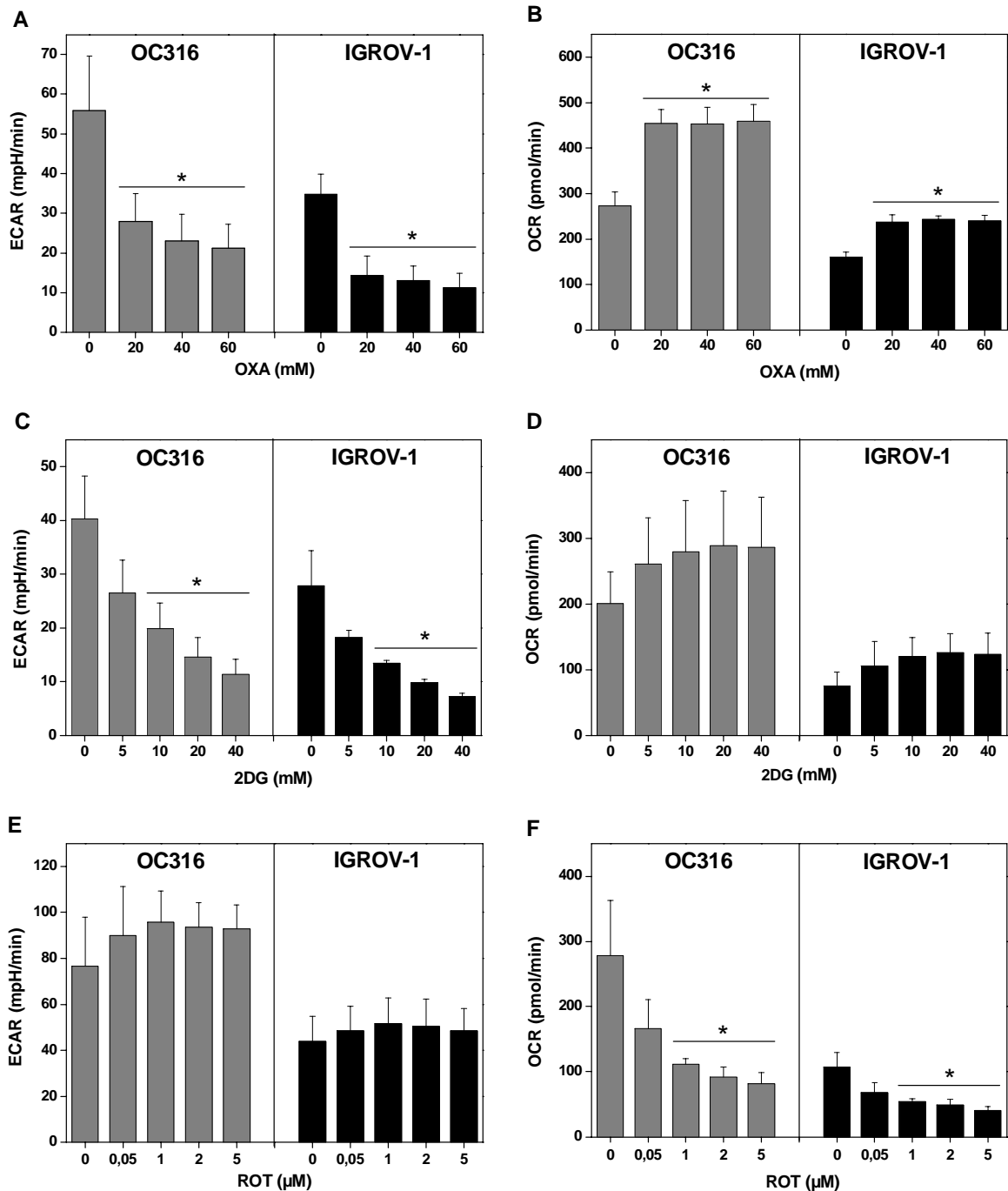
### 3.3.3 Stoffwechselraten manipulierter Tumorzellen

Neben den in Abbildung 18 gezeigten basalen Raten wurde der Einfluss von drei verschiedenen Stoffwechselmanipulatoren auf den Tumorstoffwechsel von OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Tumorzellen untersucht. Hierzu wurden sich akkumulierende Konzentrationen von OXA, 2DG und ROT in das Medium injiziert und anschließend ECAR und OCR bestimmt.

In Abbildung 33 ist der Einfluss dieser Stoffwechsellinhibitoren auf den Stoffwechsel der beiden humanen Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 zu sehen. Konzentrationen > 20 mM des LDH-Inhibitors OXA führten zu einer signifikanten Reduktion der ECAR um 50 % in OC316- und 60 % in IGROV-1-Zellen (Abbildung 33A). Die Injektion von > 10 mM 2DG reduzierte die ECAR signifikant in beiden Zelllinien um mindestens 50 %, 2DG Konzentrationen über 10 mM intensivierten die inhibierende Wirkung um bis zu 75 % (Abbildung 33C). Die Manipulation des Komplex I der Atmungskette mit ROT zeigte einen Trend in Richtung Erhöhung der ECAR auf, eine statistisch signifikante Auswirkung konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 33E).

Die OCR wurde durch Zugabe von > 20 mM OXA signifikant erhöht. Besonders im Fall der hoch-metabolischen Ovarialkarzinomzelllinie OC316 war durch die Inhibition der LDH eine Verlagerung des Tumorstoffwechsels zu Gunsten der Oxidation von Pyruvat und einer damit verbundenen Erhöhung der OCR um 70 % zu verbuchen. Die OCR der Linie IGROV-1 erhöhte sich nach Zugabe von 20 mM OXA um 50 %. Eine Steigerung der eingesetzten OXA-Konzentrationen führte zu keiner weiteren Intensivierung des Effekts (Abbildung 33B). Der Block der Glykolyse mit 2DG bewirkte eine Zunahme der OCR, eine statistisch signifikante Auswirkung konnte nicht detektiert werden (Abbildung 33D).

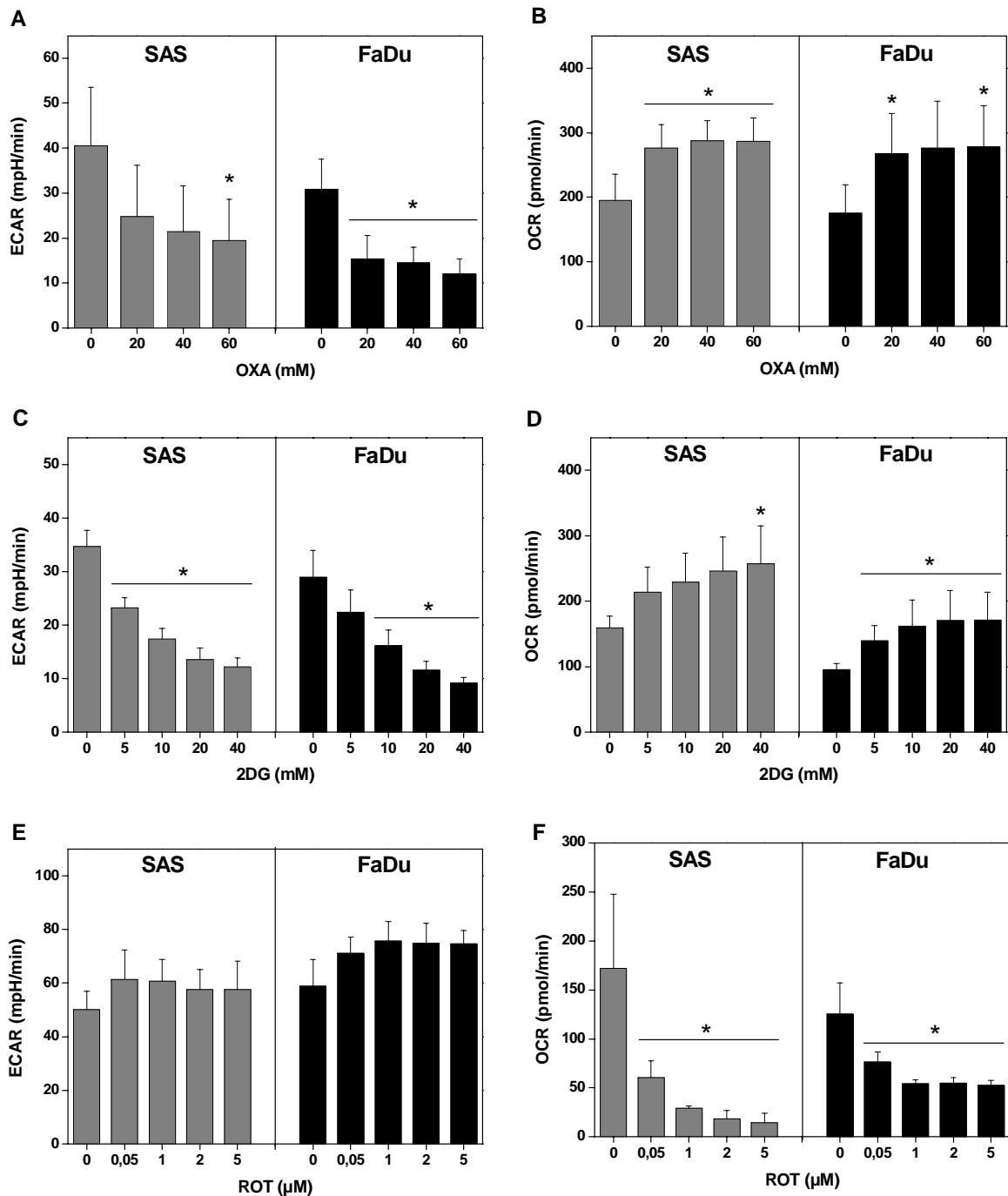
ROT hatte einen starken inhibitorischen Effekt auf die Elektronentransportkette, schon geringe Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  führten zu einer Reduktion der OCR um 60 % und 50 % in OC316- und IGROV-1-Zellen (Abbildung 33F).



**Abbildung 33: ECAR und OCR von OC316- und IGROV-1-Zellen unter dem Einfluss metabolischer Stoffwechselmanipulatoren**

(A) ECAR und (B) OCR von OC316- und IGROV-1-Zellen nach Behandlung mit OXA. (C) ECAR und (D) OCR von OC316- und IGROV-1-Zellen nach Injektion von 2DG. (E) ECAR und (F) OCR von OC316- und IGROV-1-Zellen nach ROT-Behandlung. Gezeigt sind MW und SD aus drei unabhängigen Versuchen. Alle Wells wurden mittels Janus Green-Färbung normalisiert. \* $p < 0,05$  für behandelte Zellen vs. unbehandelte Kontrollzellen.

In Abbildung 34 ist der Einfluss der verwendeten Stoffwechsellinhibitoren auf den Metabolismus der beiden humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und FaDu dargestellt.



**Abbildung 34: ECAR und OCR von SAS- und FaDu-Zellen unter dem Einfluss metabolischer Stoffwechselmanipulatoren**

(A) ECAR und (B) OCR von SAS- und FaDu-Zellen nach Behandlung mit OXA. (C) ECAR und (D) OCR von SAS- und FaDu-Zellen nach Injektion von 2DG. (E) ECAR und (F) OCR von SAS- und FaDu-Zellen nach ROT-Behandlung. Gezeigt sind MW und SD aus drei unabhängigen Versuchen. Alle Wells wurden mittels Janus Green-Färbung normalisiert. \*p < 0,05 für behandelte Zellen vs. unbehandelte Kontrollzellen.

Konzentrationen > 20 mM des LDH-Inhibitors OXA führten bei SAS zu einer 40%igen und bei FaDu zu einer 50%igen Reduktion der ECAR. Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle konnten bei der Tumorzelllinie SAS jedoch erst ab OXA-Konzentrationen von 60 mM festgestellt werden (Abbildung 34A). Die Injektion von 2DG-Konzentrationen > 10 mM bewirkten eine 50%ige und 45%ige Reduktion der ECAR in SAS und FaDu. Konzentrationssteigerungen verstärkten die durch 2DG hervorgerufene Hemmung der Glykolyse und ECAR (Abbildung 34C). Der Inhibitor des Komplex I der Atmungskette, ROT, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ECAR und den glykolytischen Flux, lediglich eine tendenzielle Erhöhung war messbar (Abbildung 34E). Die OCR der beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien wurde durch OXA-Konzentrationen > 20 mM signifikant erhöht (Abbildung 34B). 2DG Konzentrationen bewirkten eine Intensivierung der OCR. Signifikante Effekte konnten bei SAS-Zellen erst nach einer finalen Konzentration von 40 mM 2DG im Medienüberstand erzielt werden. OCR der FaDu-Zellen erhöhte sich bereits nach Zugabe von 5 mM 2DG signifikant um 45 % (Abbildung 34D). Drastische Effekte erzeugte der Hemmer des Atmungskettenkomplexes I: 0,05 µM ROT reduzierte die OCR der hoch-metabolischen Tumorzelllinie SAS um 65 %. Auch die Zelllinie FaDu verzeichnete ab Konzentrationen > 0,05 µM ROT signifikant reduzierte Sauerstoffverbrauchswerte (Abbildung 34F).

Zusammenfassend führten die Stoffwechselmanipulatoren OXA und 2DG zu einer Reduktion der ECAR sowie zu einer Erhöhung der OCR. Der Inhibitor der Atmungskette ROT verringerte die OCR und erhöhte tendenziell die ECAR.

### **3.3.4 Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsrate manipulierter Tumorzellen**

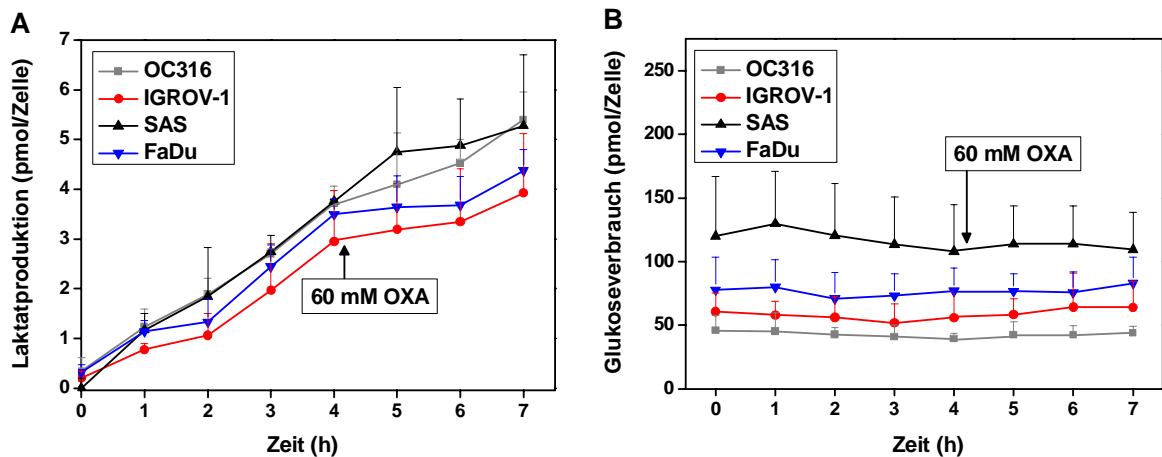
In der folgenden Versuchsreihe wurde der direkte Einfluss von 60 mM OXA und 20 mM 2DG auf Laktat- und Glukosekonzentrationen in Medienüberständen der vier Karzinomzelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu mit dem SUPER GL2-Analysator ermittelt.

Die gemessenen Laktat- und Glukosemesswerte wurden auf die jeweilige Zellzahl bezogen (pmol/Zelle) und in Abhängigkeit von der Zeit grafisch aufgetragen. Durch die erhobenen Messpunkte wurden lineare Regressionsgeraden gelegt und anhand deren Steigungen die Produktions- und Verbrauchsrate vor und nach Zugabe der Stoffwechselmanipulatoren berechnet.

In Abbildung 35 ist der Einfluss des LDH-Inhibitors OXA auf die Laktatproduktion (Abbildung 35A) und den Glukoseverbrauch (Abbildung 35B) über einen Zeitraum von 7 h gezeigt. Die Laktatkonzentrationen im Medienüberstand der vier Tumorzelllinien stieg

anfänglich an, analog den basalen Raten in Abbildung 19A, und knickte nach Zugabe von 60 mM OXA ab. Die Laktatproduktionsrate der Ovarialkarzinomzelllinie OC316 reduzierte sich von anfänglichen  $0,82 \pm 0,10$  pmol Laktat/Zelle/h innerhalb der ersten 4 h auf  $0,55 \pm 0,24$  pmol Laktat/Zelle/h nach Zugabe von 60 mM OXA, die der Linie IGROV-1 von  $0,67 \pm 0,27$  pmol/Zelle/h um über 50 % auf  $0,31 \pm 0,37$  pmol/Zelle/h nach Injektion von 60 mM OXA. Eine ähnlich starke Inhibition der Laktatproduktionsrate war mit 50 % und 75 % für die beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und FaDu festzustellen.

Der Glukoseverbrauch vor und nach Zugabe von 60 mM OXA ist in Abbildung 35B gezeigt. Nach einem anfänglichen geringen Abfall der Glukosekonzentration im Medienüberstand stagnierte dieser nach Zugabe von 60 mM OXA. Am Beispiel OC316 reduzierte sich die Glukosekonzentration im Medium innerhalb der ersten 4 h mit einer Rate von  $1,71 \pm 2,05$  pmol/Zelle/h. Dies führte nach 4 h zu einer 14%igen Reduktion der anfänglich im Medium gelösten Glukose. Nach Zugabe des LDH-Inhibitors blieb die Glukosekonzentration im Medium unverändert.

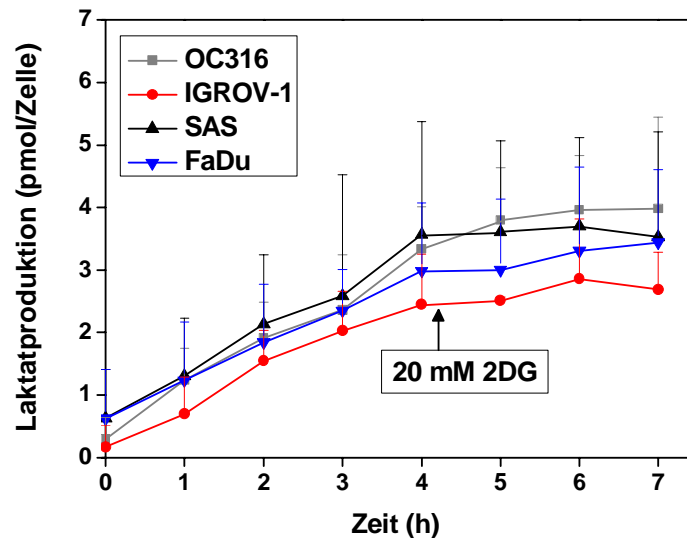


**Abbildung 35: Laktatproduktion und Glukoseverbrauch der Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu unter Einfluss der Manipulation mit 60 mM OXA**

In Zellkulturüberständen der vier Karzinomzelllinien wurde die Laktat- und Glukosekonzentration im Medienüberstand vor und nach Zugabe von 60 mM OXA bestimmt und auf die Zellzahl bezogen. **(A)** Laktatkonzentrationen (MW und SD) aus drei unabhängigen Versuchen. **(B)** Glukoseverbrauch (MW und SD) aus drei unabhängigen Versuchen. Die Daten in Abbildung 35A+B wurden aus denselben Proben erhoben.

Abbildung 36 zeigt die Auswirkungen von 20 mM 2DG auf die Laktatproduktion der vier untersuchten Tumorzelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu. Bei allen vier Zelllinien war innerhalb der ersten 4 h eine Erhöhung der im Medium gelösten Laktatkonzentration zu verzeichnen. Die Akkumulation von Laktat im Medienüberstand wurde jedoch durch Zugabe von 20 mM 2DG reduziert. Die anfängliche Laktatproduktionsrate von  $0,72 \pm 0,12$  pmol/Zelle/h für OC316 verringerte sich nach Zugabe von OXA um 70 % auf  $0,21 \pm 0,44$  pmol/Zelle/h, die der Linie IGROV-1 von  $0,59 \pm 0,30$  pmol/Zelle/h auf

0,11 ± 0,35 pmol/Zelle/h. Ähnlich starke Abnahmen der Laktatproduktionsraten waren bei den Plattenepithelkarzinomzelllinien zu beobachten. Die Laktatproduktion der Linie SAS wurde durch Zugabe von 20 mM 2DG gänzlich inhibiert, die Produktionsrate der Linie FaDu reduzierte sich von anfänglichen 0,51 ± 0,19 pmol/Zelle/h um 50 % auf 0,26 ± 0,34 pmol/Zelle/h.



**Abbildung 36: Laktatproduktion der Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu unter Einfluss der Manipulation mit 20 mM 2DG**

In Zellkulturüberständen der vier Karzinomzelllinien wurde die Laktatkonzentration im Medienüberstand vor und nach Zugabe von 20 mM 2DG bestimmt und auf die Zellzahl bezogen. Gezeigt sind Laktatkonzentrationen (MW und SD) aus drei unabhängigen Versuchen.

Die Bestimmung der Glukosekonzentration nach Zugabe von 2DG war technisch nicht möglich, da kein Messverfahren zur Verfügung stand, das zwischen Glukose und 2DG unterscheiden konnte.

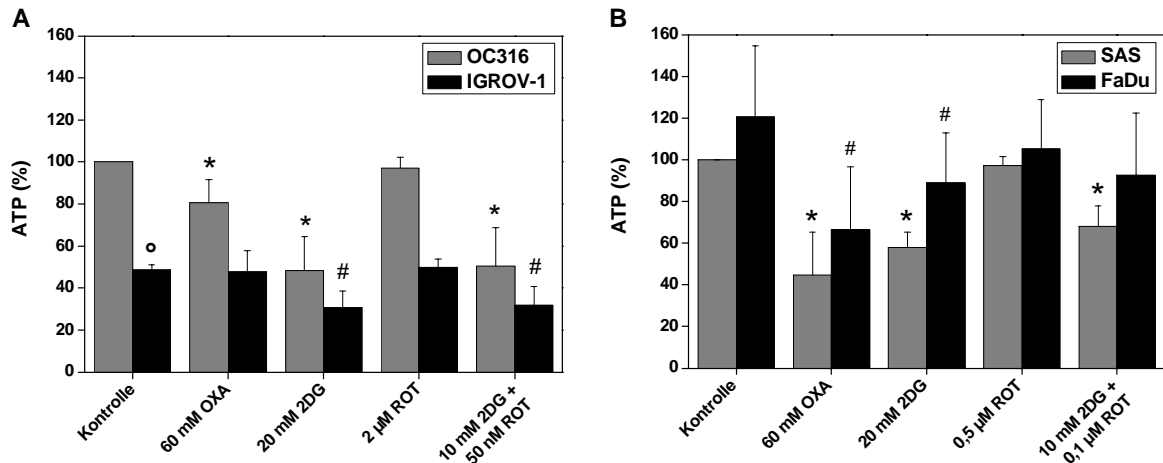
### 3.3.5 ATP-Gehalt unter dem Einfluss von Stoffwechselmanipulatoren

Zur Quantifizierung der intrazellulären ATP-Konzentration unter dem Einfluss metabolischer Inhibitoren wurden die Zellen entsprechend den Ergebnissen der Toxizitätstests (Tabelle 8) 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen 2DG, OXA, ROT und 2DG + ROT behandelt. Danach erfolgten die ATP-Messungen mittels des CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corporation).

Bei der in Abbildung 37A+B gezeigten relativen ATP-Konzentration wurde das Messergebnis einer Zelllinie pro Tumorentität auf 100 % gesetzt (OC316 bzw. SAS).

Innerhalb der unbehandelten Kontrollzellen besaß IGROV-1 einen signifikant geringeren intrazellulären ATP-Gehalt als OC316 (Abbildung 20 und Abbildung 37A). 60 mM OXA führte ausschließlich bei der metabolisch hochaktiven Linie OC316 zu einem signifikanten

Abfall der ATP-Konzentration und blieb bei IGROV-1 wirkungslos. Die Injektion von 20 mM 2DG führte bei OC316 zu einem 50%igen Abfall von ATP. Das intrazelluläre ATP der Linie IGROV-1 reduzierte sich bei gleicher 2DG-Behandlung um 35 %. Die Zugabe von 2 µM ROT hatte keine Auswirkung auf den intrazellulären ATP-Gehalt der beiden Ovariakarzinomzelllinien. Eine Behandlung mit 10 mM 2DG + 50 nM ROT bewirkte bei OC316 eine 50%ige und bei der Linie FaDu eine 35%ige Reduktion intrazellulären ATPs.



**Abbildung 37: Relative ATP-Konzentration der vier Tumorzelllinien unter dem Einfluss metabolischer Inhibitoren**

Gezeigt ist die relative intrazelluläre ATP-Konzentration der Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu nach 2 h Behandlung mit metabolischen Inhibitoren. Eine Zelllinie pro Entität (OC316 bzw. SAS) wurde auf 100 % gesetzt. Gezeigt sind MW und SD aus sechs unabhängigen Versuchen. \*p < 0,05 OC316 bzw. SAS; #p < 0,05 IGROV-1 bzw. FaDu signifikant unterschiedlich zur Kontrolle; °p < 0,05 Kontrollen signifikant unterschiedlich.

Die unbehandelten Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und FaDu wiesen ein ähnliches intrazelluläres ATP-Niveau auf (Abbildung 20 und Abbildung 37B). 60 mM OXA reduzierte den ATP-Gehalt in beiden HNSCCs signifikant um durchschnittlich 50 %. Nach Zugabe von 20 mM 2DG reduzierte sich ATP in SAS um 43 % und um 26 % in der Linie FaDu. ROT hatte keinen Einfluss auf die intrazelluläre ATP-Konzentration. Die kombinierte Anwendung von 10 mM 2DG + 0,1 µM ROT wirkte nur auf SAS mit einer statistisch signifikanten Reduktion von 33 % gegenüber den Kontrollzellen. FaDu-Zellen erreichten eine identische Reduktion, jedoch auf Grund der höheren SD ohne statistische Signifikanz.

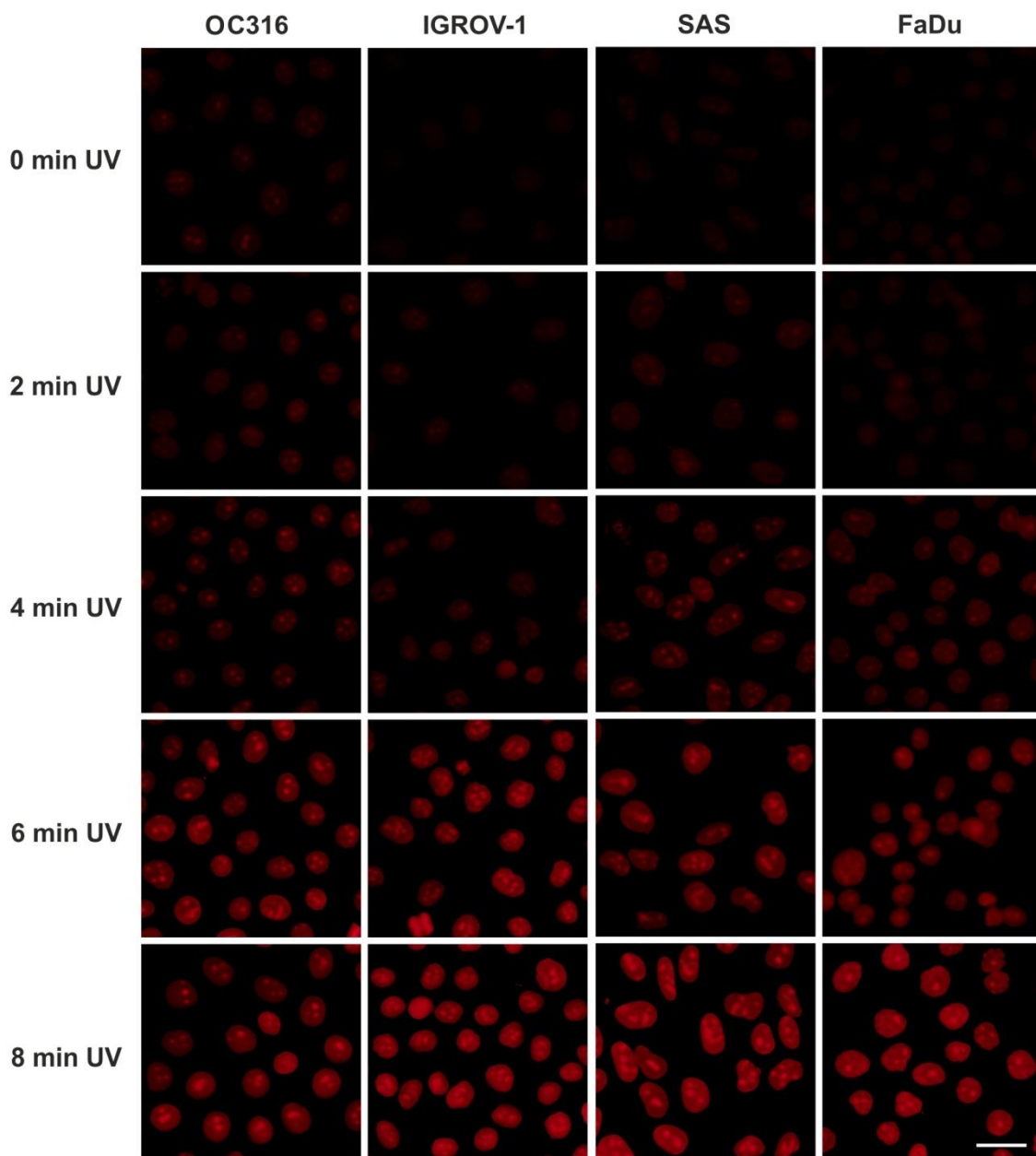
### 3.3.6 Quantifizierung von O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Anionen nach UV-A Bestrahlung bzw. Behandlung mit 2DG + ROT

Die in Tumorzellen nach UV-Bestrahlung oder nach Behandlung mit verschiedenen Dosen 2DG + ROT gebildete Menge an O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Anionen wurde mit Hilfe der Chemikalie Dihydroethidium (DHE) visualisiert.



In diesem Versuchsansatz musste auf UV-A-Strahlung zurückgegriffen werden, da die Nutzung der Gammastrahlenquelle mit Transportzeiten von mindestens 30 min für Fragestellungen hinsichtlich der direkten Strahlenantwort von Zellen nicht praktikabel war.

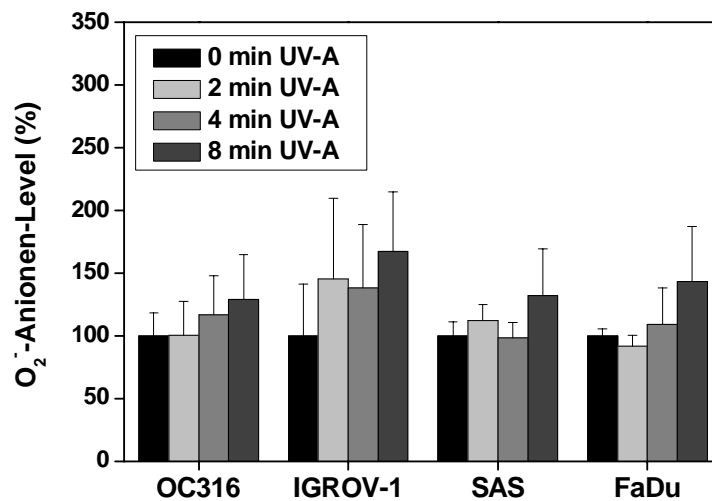
In Abbildung 38 sind exemplarische DHE-Färbungen der vier untersuchten Tumorzelllinien nach 0, 2, 4 und 8 min UV-A Bestrahlung (312 nm) dargestellt. Optisch war eine Zunahme der Fluoreszenzintensität und infolgedessen eine Zunahme der  $O_2^-$ -Anionen durch eine Intensivierung der UV-A Bestrahlungszeit zu verzeichnen.



**Abbildung 38: DHE-Färbung der vier Tumorzelllinien nach 0-8 min UV-A Bestrahlung**

Gezeigt sind exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen DHE-gefärbter Zellen nach 0-8 min UV-A Bestrahlung. Die Intensität der Rotfärbung fungiert als Indikator für  $O_2^-$ -Anionen und korreliert mit der UV-A Bestrahlungszeit. Maßstab 30  $\mu$ m.

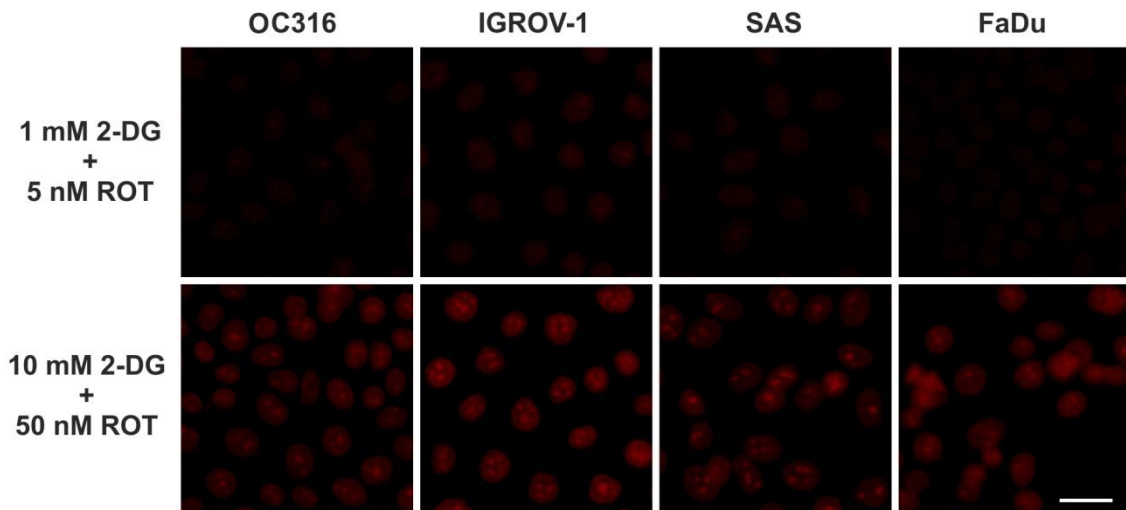
Die optische Wahrnehmung, Zunahme der Fluoreszenzintensität durch Erhöhung der UV-A Bestrahlungszeit, wurde durch eine computergestützte Auswertung tendenziell bestätigt. Die in Abbildung 39 dargestellten MW der Fluoreszenzintensität aus vier unabhängigen Versuchen, normiert auf die nicht bestrahlten Kontrollzellen, korrelierten mit der UV-A Bestrahlungsdauer. Im direkten Vergleich zwischen unbestrahlten Kontrollzellen und Zellen nach 8 min UV-A Bestrahlung war bei allen vier Tumorzelllinien eine Zunahme der  $O_2^-$ -Level zwischen 30 % OC316 und 70 % IGROV-1 ( $p=0,069$ ) zu verzeichnen. Auf Grund hoher SD konnte jedoch keine statistisch signifikante Aussage getroffen werden.



**Abbildung 39: Relative  $O_2^-$ -Anionen-Level nach 0-8 min UV-A Bestrahlung**

Gezeigt ist der relative intrazelluläre  $O_2^-$ -Anionen-Level nach 0-8 min UV-A Bestrahlung. Die Menge des Fluoreszenzsignals wurde mittels einer DAPI-Kernfärbung auf die jeweilige Zellkernfläche pro Bild normiert. Die nicht bestrahlten Kontrollzellen wurden auf 100 % gesetzt. MW und SD aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils fünf ausgewerteten Einzelaufnahmen pro Linie und Dosis sind dargestellt.

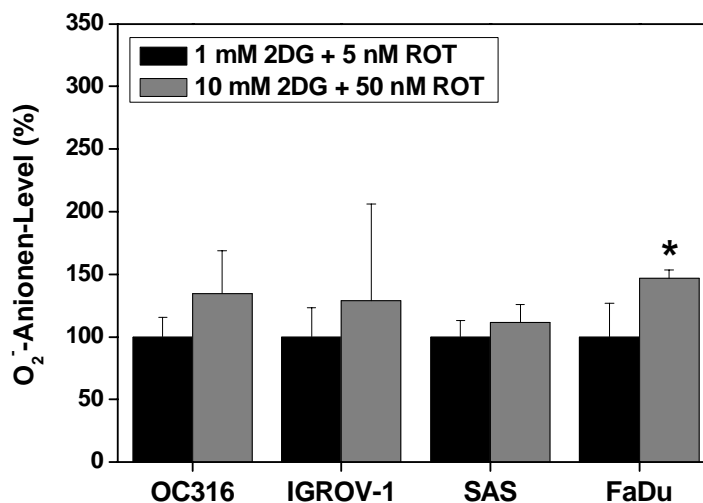
In Abbildung 40 sind exemplarische DHE-Färbungen der vier untersuchten Tumorzelllinien nach zweistündiger Inkubation in 1 mM 2DG + 5 nM ROT sowie 10 mM 2DG + 50 nM ROT gezeigt. Die zweistündige Inkubation der untersuchten Zelllinien in 10 mM 2DG + 50 nM ROT erhöhte den Gehalt an  $O_2^-$ -Anionen und führte somit zu einer Intensivierung der DHE-Färbung.



**Abbildung 40: DHE-Färbung der vier Tumorzelllinien unter dem Einfluss von 2DG + ROT**

Gezeigt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der DHE-gefärbten Zelllinien nach zweistündiger Inkubation mit einer Kombination aus 1 mM 2DG + 5 nM ROT bzw. 10 mM 2DG + 50 nM ROT. Der Maßstab entspricht 30  $\mu$ m.

Die computergestützte Auswertung von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils fünf Einzelaufnahmen pro Linie und Dosis ist in Abbildung 41 dargestellt. In allen vier verwendeten Zelllinien führte eine 2 h Inkubation in 10 mM 2DG + 50 nM ROT zu einer Zunahme der  $O_2^-$ -Level gegenüber einer 2 h Inkubation in 1 mM 2DG + 5 nM ROT. Eine statistisch signifikante Erhöhung konnte jedoch nur für die Zelllinie FaDu errechnet werden.



**Abbildung 41: Relative  $O_2^-$ -Anionen-Level nach Behandlung mit 2DG + ROT**

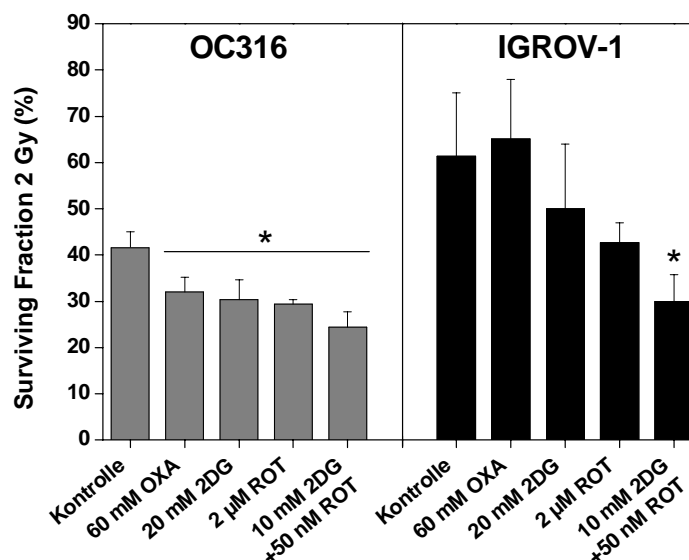
Gezeigt ist der relative intrazelluläre  $O_2^-$ -Anionen-Level nach zweistündiger Inkubation mit 1 mM 2DG + 5 nM ROT sowie 10 mM 2DG + 50 nM ROT. Das Fluoreszenzsignal wurde mittels einer DAPI-Kernfärbung auf die jeweilige Kernfläche pro Bild normiert. Die Dosis 1 mM 2DG + 5 nM ROT wurde auf 100 % gesetzt. MW und SD aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils fünf ausgewerteten Einzelaufnahmen pro Zelllinie und Dosis sind dargestellt \* $p < 0,05$  10 mM 2DG + 50 nM ROT vs. 1 mM 2DG + 5 nM ROT.

Abschließend ist festzuhalten, dass die durch Intensivierung der UV-A Bestrahlungsdauer erzeugte Zunahme an  $O_2^-$ -Anionen mittels DHE-Färbung detektier- und visualisierbar war. Des Weiteren konnte eine Erhöhung der  $O_2^-$ -Anionen nach zweistündiger Inkubation in 10 mM 2DG + 50 nM ROT im Vergleich zu 1 mM 2DG + 5 nM ROT belegt werden.

### 3.3.7 Klonogenes Überleben nach Gammabestrahlung und Zugabe metabolischer Inhibitoren

Mit dem Ziel, die Strahlenantwort der vier untersuchten Tumorzelllinien zu manipulieren, wurden 2 Gy Gammastrahlung mit verschiedenen metabolischen Inhibitoren, entsprechend den in Tabelle 8 aufgeführten Konzentrationen, kombiniert.

Das klonogene Überleben der Ovarialkarzinomzelllinie OC316 wurde durch die jeweilige Zugabe der biochemischen Stoffwechselmanipulatoren 60 mM OXA, 20 mM 2DG, 2  $\mu$ M ROT oder 10 mM 2DG + 50 nM ROT jeweils in Kombination mit 2 Gy Gammabestrahlung signifikant gegenüber den nur mit 2 Gy bestrahlten Kontrollzellen reduziert. Auf die Linie IGROV-1 wirkte nur die Kombinationsbehandlung von 10 mM 2DG + 50 nM ROT und 2 Gy Gammastrahlung signifikant reduzierend im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen. 20 mM 2DG und 2  $\mu$ M ROT führten bei IGROV-1 lediglich zu einer tendenziellen Abnahme des relativen klonogenen Überlebens (Abbildung 42).

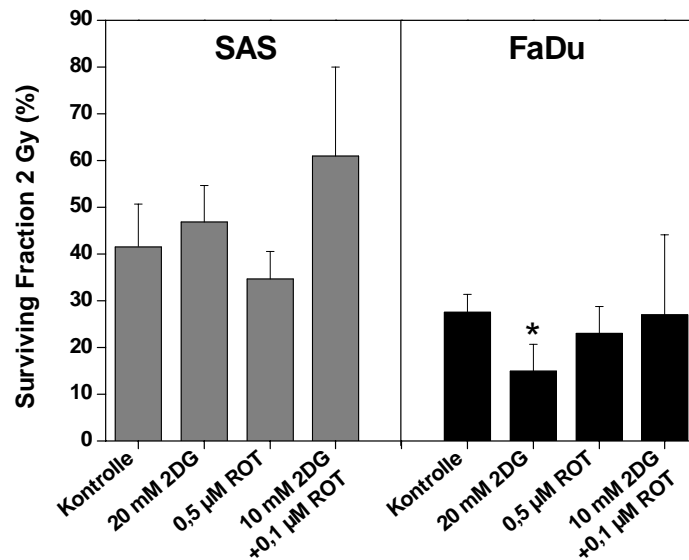


**Abbildung 42: SF von OC316- und IGROV-1-Tumorzellen nach 2 Gy Gammabestrahlung in Kombination mit metabolischen Inhibitoren**

SF der Linien OC316 und IGROV-1 nach 2 Gy Gammabestrahlung mit simultaner Inkubation metabolischer Inhibitoren. MW und SD aus drei unabhängigen Versuchen sind gezeigt. \* $p < 0,05$  Kombinationsbehandlung (Inhibitoren + 2 Gy) vs. nur mit 2 Gy bestrahlte Kontrollzellen.

Das klonogene Überleben der hoch-metabolischen OC316-Zellen konnte im Vergleich zu den niedrig-metabolischen IGROV-1-Zellen durch Zugabe aller getesteten Chemikalien in Kombination mit jeweils 2 Gy Gammastrahlung signifikant reduziert werden. Der größte strahlensensibilisierende Effekt bei beiden Ovarialkarzinomzelllinien bewirkte die Zugabe von 10 mM 2DG + 50 nM ROT in das Zellkulturmedium (Abbildung 42).

Das klonogene Überleben der SAS-Tumorzellen konnte durch Zugabe von 20 mM 2DG, 0,5 µM ROT und 10 mM 2DG + 0,1 µM ROT jeweils in Kombination mit 2 Gy Gammabestrahlung nicht signifikant gegenüber den nur mit 2 Gy bestrahlten Kontrollzellen reduziert werden (Abbildung 43). Lediglich FaDu-Tumorzellen wiesen eine signifikante Reduktion des klonogenen Überlebens nach Behandlung mit 2 Gy Gammabestrahlung und 20 mM 2DG gegenüber den mit 2 Gy bestrahlten Kontrollen auf.



**Abbildung 43: SF von SAS- und FaDu-Tumorzellen nach 2 Gy Gammabestrahlung in Kombination mit metabolischen Inhibitoren**

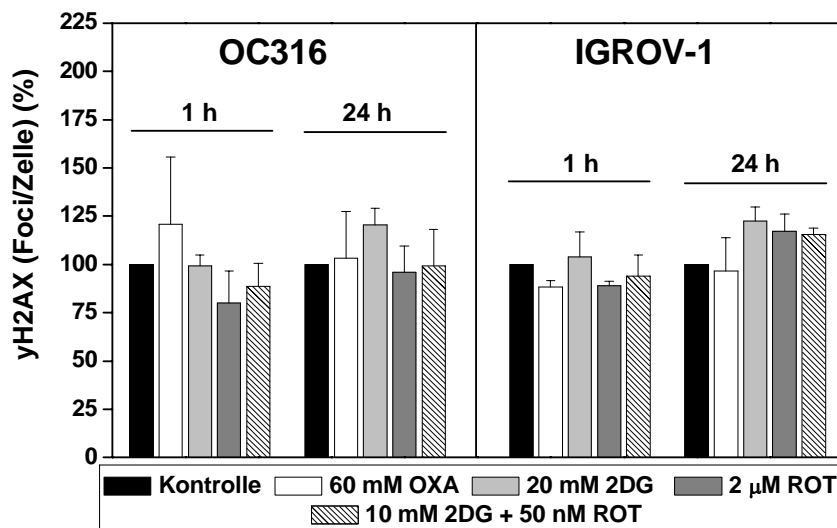
SF der Linien SAS und FaDu nach 2 Gy Gammabestrahlung mit simultaner Inkubation metabolischer Inhibitoren. MW und SD aus drei unabhängigen Versuchen sind gezeigt. \*p < 0,05 Kombinationsbehandlung (Inhibitoren + 2 Gy) vs. nur mit 2 Gy bestrahlte Kontrollzellen.

Die Plattenepithelkarzinomzelllinien in Abbildung 43 zeigten ein generell geringeres Ansprechen auf die Kombinationsbehandlung von 2 Gy Gammabestrahlung plus Stoffwechsellinhibitoren im Vergleich zu den nur mit 2 Gy bestrahlten Kontrollen.

### 3.3.8 Bildung von $\gamma$ H2AX-Foci unter Gammabestrahlung und dem Einfluss metabolischer Inhibitoren

Im Folgenden ist der Einfluss von 60 mM OXA, 20 mM 2DG, 2  $\mu$ M ROT sowie 10 mM 2DG + 50 nM ROT auf die Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-markierten DSBs in Ovarialkarzinomzelllinien ohne Bestrahlung zu sehen.

Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen führte kein Stoffwechsellinhibitor, nach einer Inkubationszeit von 2 h, per se zu einer signifikanten Erhöhung von DSBs, weder 1 h noch 24 h nach Behandlung. Die nicht inhibierten Kontrollzellen wurden auf 100 % gesetzt (Abbildung 44).



**Abbildung 44: Quantifizierung von DSBs mittels  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen unter dem Einfluss von Stoffwechselmanipulatoren ohne Bestrahlung**

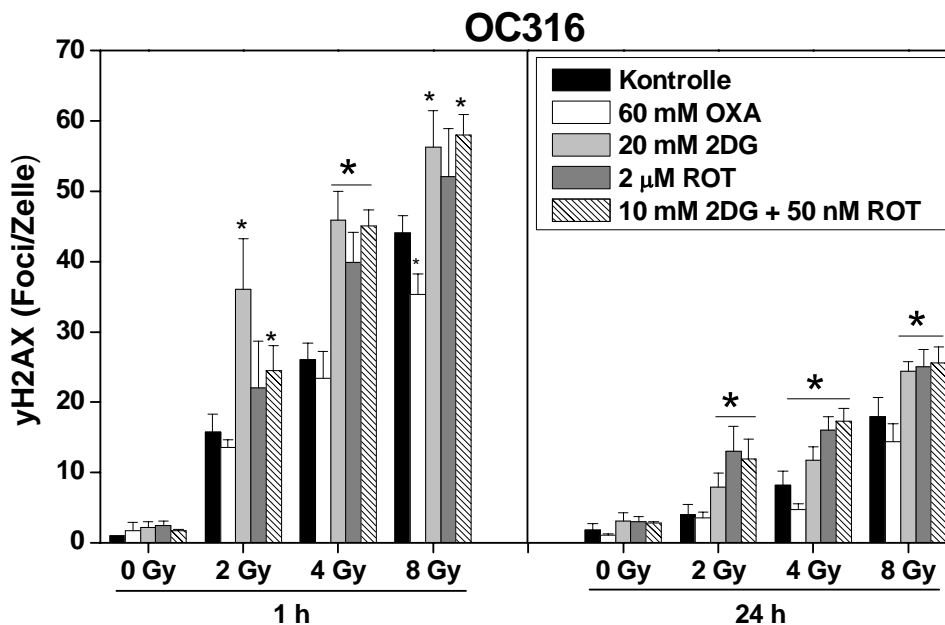
Dargestellt sind durch  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung markierte Foci/Zelle der Tumorzelllinien OC316 und IGROV-1 1 h und 24 h nach zweistündiger Behandlung mit 60 mM OXA, 20 mM 2DG, 2  $\mu$ M ROT oder 10 mM 2DG + 50 nM ROT. Die nicht inhibierten Kontrollzellen wurden auf 100 % gesetzt. Die gezeigten MW und SD basieren auf drei unabhängigen Versuchen, was einer Summe von circa 150 ausgewerteten Zellen pro Zelllinie, Behandlung und Zeitpunkt entspricht.

In weiterführenden Versuchen wurden die unter Abbildung 44 verwendeten metabolischen Inhibitoren mit Gammastrahlung in den Dosen 0-8 Gy kombiniert. Hierzu wurden die Zellen 1 h mit den Stoffwechselmanipulatoren inkubiert, bestrahlt, und für eine weitere Stunde inkubiert. Darauf folgte die Färbung 1 h bzw. 24 h nach Fortsetzung der Inkubation in Normalmedium.

In Abbildung 45 ist die Auswirkung einer kombinierten Strahlen- und Stoffwechselmanipulator-Behandlung auf die Tumorzelllinie OC316 dargestellt. Unabhängig der Zugabe von Manipulatoren ist eine positive Korrelation der  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle und der Strahlendosis 1 h und 24 h nach Behandlung zu erkennen.

Des Weiteren ist unabhängig von der Strahlendosis und der zugesetzten Chemikalie nach weiteren 24 h Inkubation eine drastische Reduktion der Foci/Zelle im Vergleich zur initialen Foci-Menge zu verzeichnen.

Die Zugabe von 60 mM OXA in Kombination mit Gammabestahlung führte zu keiner Erhöhung der  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle im Vergleich zu den lediglich bestrahlten Kontrollen. Partiiell konnte durch 60 mM OXA eine signifikante Reduktion der Foci detektiert werden. Die Behandlung mit 20 mM 2DG, 2  $\mu$ M ROT oder 10 mM 2DG + 50 nM ROT jeweils in Kombination mit Gammabestahlung führte zu einer Zunahme der  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle im Vergleich zu den mit gleicher Dosis bestrahlten, jedoch ohne zusätzliche Behandlung mit Stoffwechselmanipulatoren mitgeführten Kontrollen. Dieser Effekt konnte sowohl 1 h als auch 24 h nach Bestrahlung bestätigt werden.

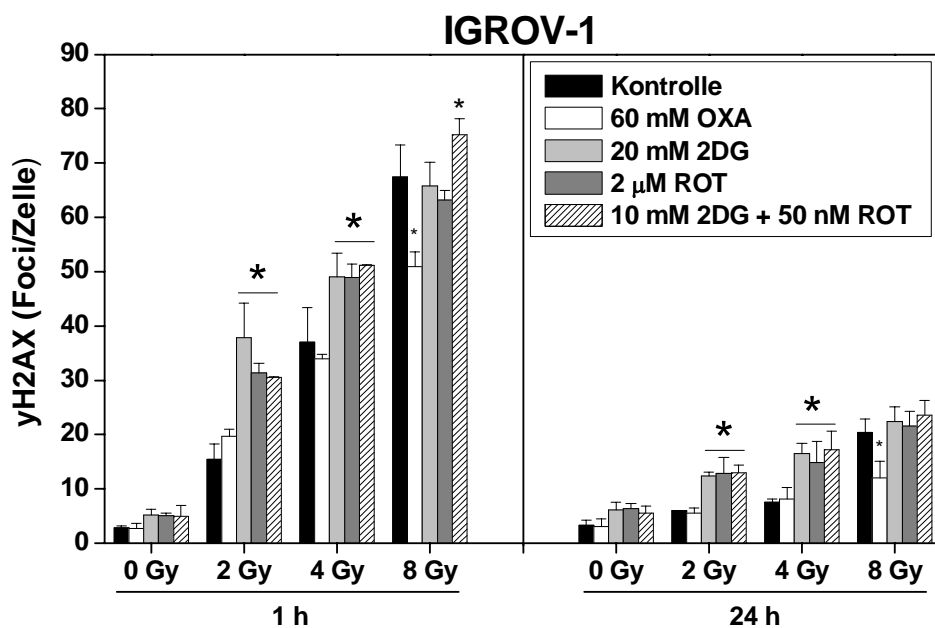


**Abbildung 45: Quantifizierung von DSBs mittels  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen in OC316-Zellen unter dem Einfluss von metabolischen Inhibitoren nach Gammabestahlung**

Gezeigt sind  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle bestrahlter und unbestrahlter OC316-Zellen unter dem Einfluss von 60 mM OXA, 20 mM 2DG, 2  $\mu$ M ROT oder 10 mM 2DG + 50 nM ROT im Vergleich zu nicht metabolisch manipulierten Zellen (Kontrolle) 1 h und 24 h nach 0-8 Gy Gammabestahlung. \* $p < 0,05$  mit Stoffwechselmanipulatoren und Gammabestahlung behandelte Zellen vs. Kontrollzellen nach gleicher Strahlendosis ohne Zugabe von Manipulatoren. Die gezeigten MW und SD basieren auf drei unabhängigen Versuchen, was einer Summe von circa 150 ausgewerteten Zellen pro Zelllinie, Behandlung und Zeitpunkt entspricht.

Die Auswirkungen von verschiedenen Stoffwechselmanipulatoren auf die durch Gammastrahlung induzierten  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle sind in Abbildung 46 für die Ovarialkarzinomzelllinie IGROV-1 gezeigt.

Die Strahlendosis korreliert positiv mit der Anzahl induzierter sowie residueller  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle. Der durch ablaufende Reparaturprozesse bedingte Rückgang initialer DSB ist 24 h nach Behandlung in Form einer reduzierten Foci-Anzahl pro Zelle erkenntlich, unabhängig von der verwendeten Strahlendosis und Zugabe von biochemischen Inhibitoren. Die Zugabe von 60 mM OXA führte zu keiner Steigerung der  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle, nach 8 Gy erfolgte eine signifikante Reduktion gegenüber den Kontrollzellen. Die Zugabe von 20 mM 2DG, 2  $\mu$ M ROT oder 10 mM 2DG + 50 nM ROT führte zu einer Erhöhung der durch Gammastrahlung induzierten Foci/Zelle, im Vergleich zu den bestrahlten aber nicht manipulierten Kontrollzellen, 1 h sowie 24 h nach Bestrahlung. Dieser Effekt relativierte sich unter Verwendung hoher Strahlendosen (8 Gy).



**Abbildung 46: Quantifizierung von DSBs mittels  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbungen in IGROV-1-Zellen unter dem Einfluss von metabolischen Inhibitoren nach Gammabestrahlung**  
Gezeigt sind  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle bestrahlter und unbestrahlter IGROV-1-Zellen unter dem Einfluss von 60 mM OXA, 20 mM 2DG, 2  $\mu$ M ROT oder 10 mM 2DG + 50 nM ROT im Vergleich zu nicht metabolisch manipulierten Zellen (Kontrolle) 1 h und 24 h nach 0-8 Gy Gammabestrahlung. \* $p < 0,05$  mit Stoffwechselmanipulatoren und Gammabestrahlung behandelte Zellen vs. Kontrollzellen nach gleicher Strahlendosis ohne Zugabe von Manipulatoren. Die gezeigten MW und SD basieren auf drei unabhängigen Versuchen, was einer Summe von circa 150 ausgewerteten Zellen pro Zelllinie, Behandlung und Zeitpunkt entspricht.

Für die beiden Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 führte eine Behandlung mit Stoffwechselmanipulatoren bei gleichzeitiger Gammabestrahlung zu einer signifikanten Änderung der induzierten sowie residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci/Zelle im Vergleich zu den bestrahlten aber nicht stoffwechselmanipulierten Kontrollzellen.



Die Injektion von 60 mM OXA führte nur partiell zu einer Reduktion der Foci/Zelle, wohingegen die Zugabe von 20 mM 2DG oder 10 mM 2DG + 50 nM ROT vorwiegend und dosisübergreifend zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der  $\gamma$ H2AX markierten DSBs führte (Abbildung 45 und Abbildung 46).

Auf Grund des geringen Ansprechens der Plattenepithelkarzinomzelllinien auf die Kombinationsbehandlung von 2 Gy Gammabestrahlung plus Stoffwechsellinhibitoren (Abbildung 43) wurde auf die  $\gamma$ H2AX-Färbung verzichtet.

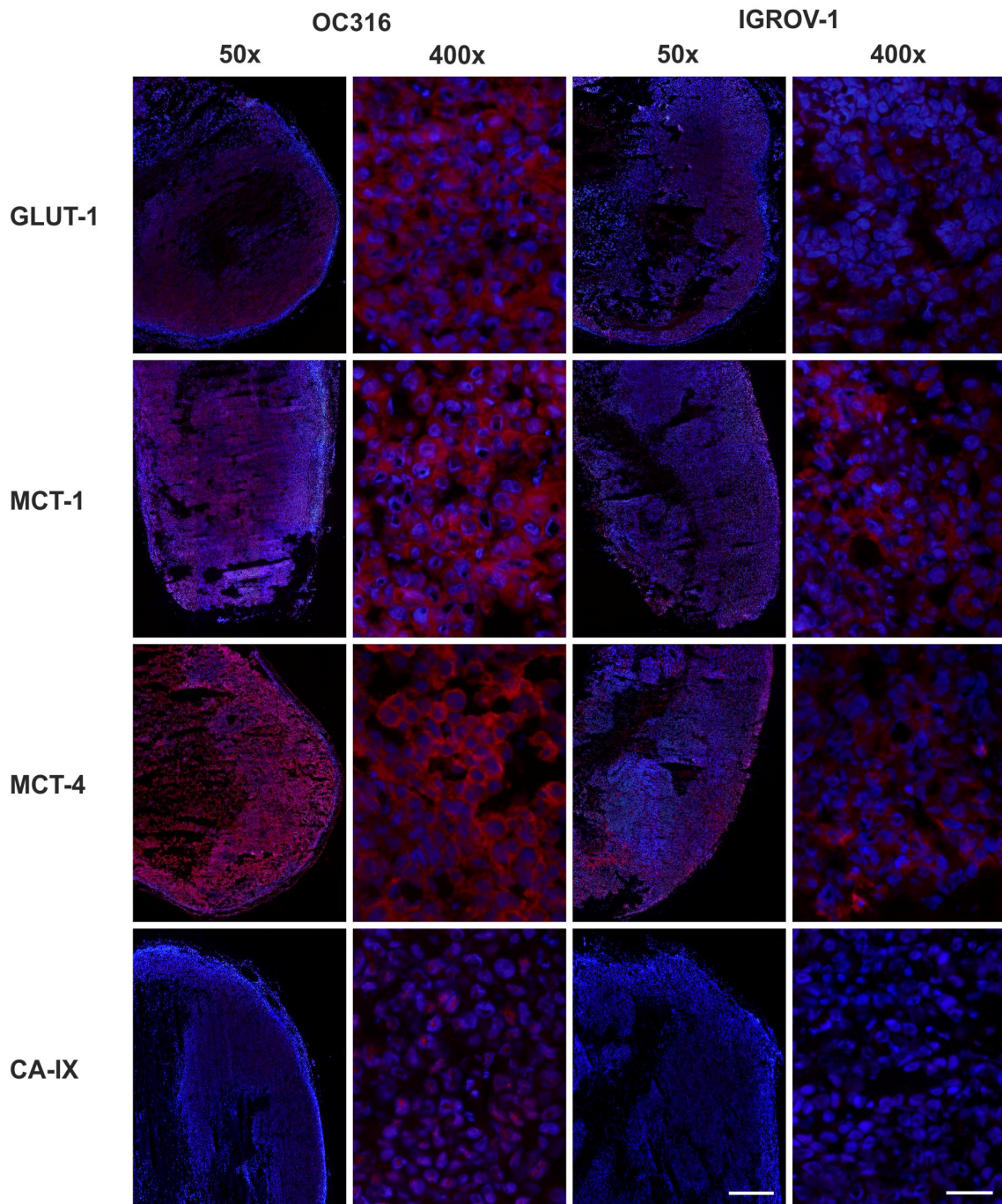
### **3.4 Charakterisierung von Experimentaltumoren**

#### **3.4.1 Immunfluoreszenzfärbungen stoffwechselrelevanter Proteine**

Die Untersuchungen der Proteinexpressionsmuster glykolytischer und energiestoffwechselrelevanter Proteine von humanen Experimentaltumoren erfolgten mittels immunhistologischer Fluoreszenzfärbung. Hierzu wurden 10  $\mu$ m dicke Kryoschnitte von Xenografts der Tumorklinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu mit spezifischen Antikörpern gerichtet gegen die Proteine GLUT-1, MCT-1, MCT-4, CA-IX, PDH-E1 $\beta$ , COX-IV, PK-M2 und LDH-A inkubiert und anschließend fluoreszenzmarkiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden bei 50 und 400facher Vergrößerung vorgenommen. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte sowohl optisch als auch computergestützt. Aufgrund des geringen Auflösungsvermögens bei 50facher Vergrößerung und damit einhergehendem Verlust der Detailgenauigkeit war eine computergestützte Quantifizierung auf die 400fache Vergrößerung beschränkt.

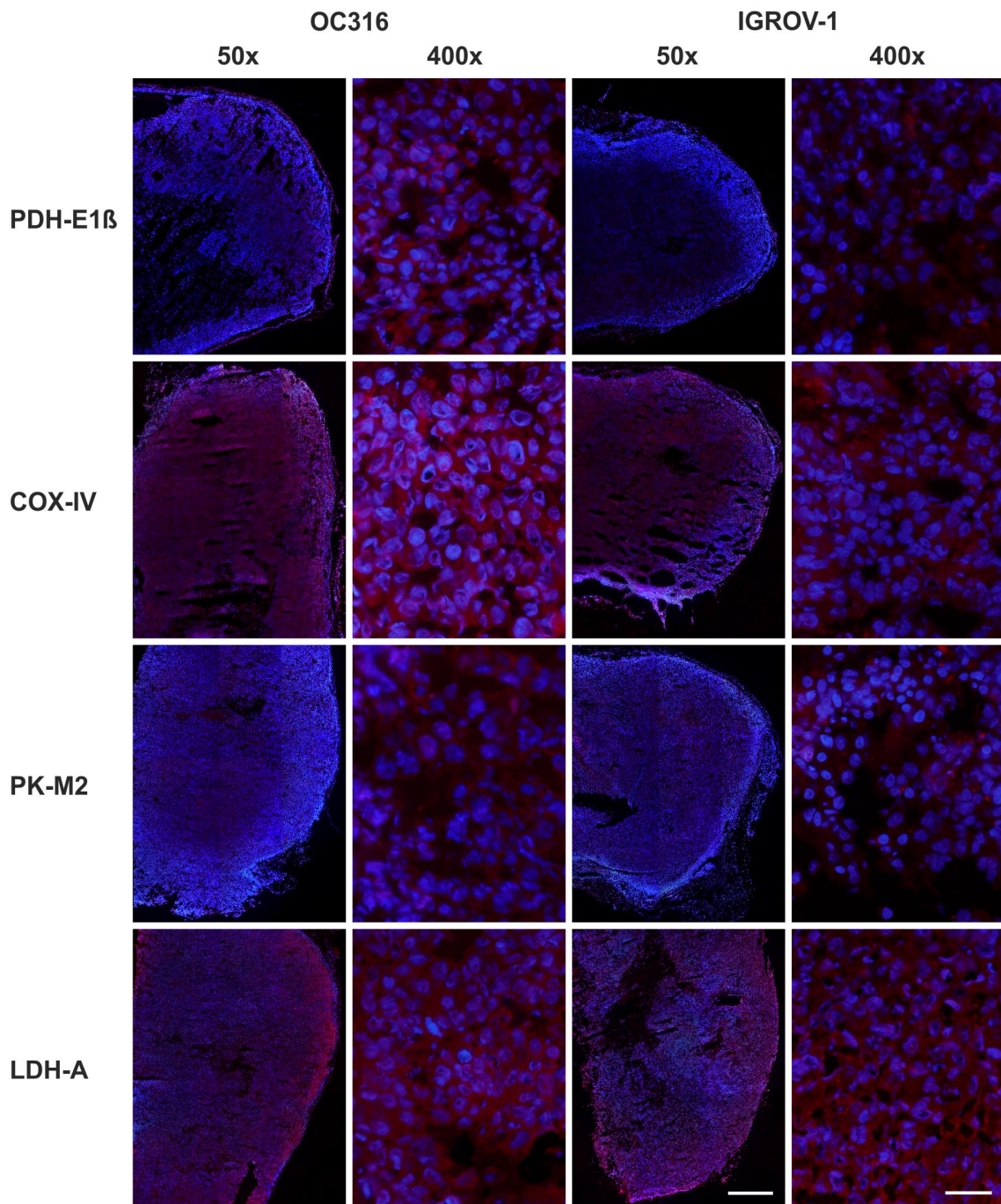
Abbildung 47 und Abbildung 48 zeigen repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen der beiden Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 bei 50 und 400facher Vergrößerung. Die Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Proteine sind bei OC316- im Vergleich zu IGROV-1-Tumoren höher oder ähnlich stark ausgeprägt.

Optisch ist dieser Unterschied bei den Proteinen GLUT-1, MCT-1, MCT-4 und CA-IX deutlich zu erkennen (Abbildung 47). Für PDH-E1 $\beta$ , COX-IV, PK-M2 und LDH-A konnte hingegen nur ein geringer oder kein optischer Unterschied wahrgenommen werden (Abbildung 48). Konsolidiert wird diese optische Beurteilung durch die computergestützte Auswertung der immunhistologischen Fluoreszenzfärbungen (Abbildung 49).



**Abbildung 47: Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine GLUT-1, MCT-1, MCT-4 und CA-IX an Schnitten von OC316- und IGROV-1-Experimentaltumoren**

Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine GLUT-1, MCT-1, MCT-4 und CA-IX von OC316- und IGROV-1-Experimentaltumoren in 50 und 400facher Vergrößerung. Die Färbungen wurden an 10 µm dicken Gefrierschnitten durchgeführt. Der Maßstab der 50fachen Vergrößerungen entspricht jeweils 300 µm, der der 400fachen Vergrößerungen jeweils 40 µm.

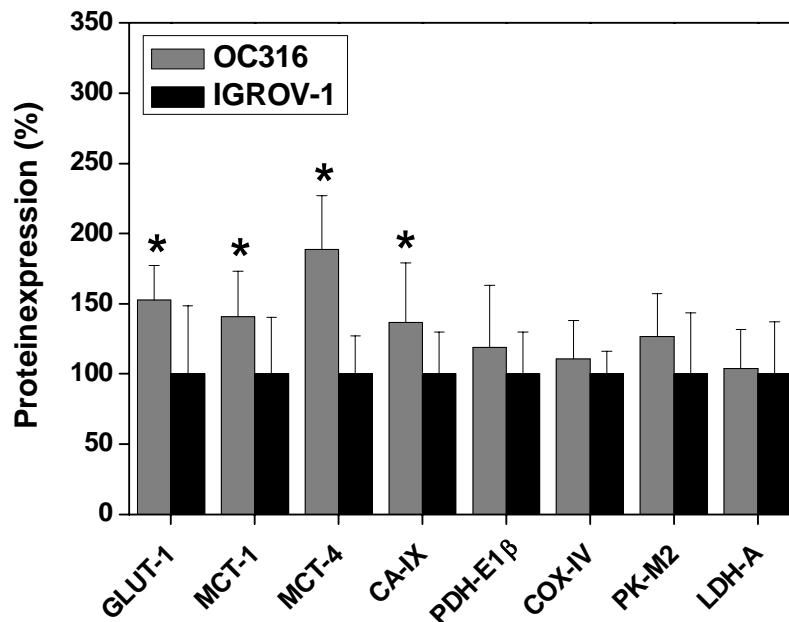


**Abbildung 48: Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine PDH-E1 $\beta$ , COX-IV, PK-M2 und LDH-A an Schnitten von OC316- und IGROV-1-Experimentaltumoren**

Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine PDH-E1 $\beta$ , COX-IV, PK-M2 und LDH-A von OC316- und IGROV-1-Experimentaltumoren in 50 und 400facher Vergrößerung. Die Färbungen wurden an 10  $\mu$ m dicken Gefrierschnitten durchgeführt. Der Maßstab der 50fachen Vergrößerungen entspricht jeweils 300  $\mu$ m, der der 400fachen Vergrößerungen jeweils 40  $\mu$ m.

Die computergestützte Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten ist für die Experimentaltumoren der humanen Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 in Abbildung 49 dargestellt. Die Menge des vom Zielprotein ausgehenden Fluoreszenzsignals wurde mittels einer DAPI-Kernfärbung auf die jeweilige Tumor-Zellkernfläche pro Kryoschnitt normalisiert. Pro Experimentaltumor wurde die Proteinexpression in fünf unterschiedlichen Sektoren ausgewertet und gemittelt. Gezeigt sind die MW und SD aus jeweils zehn OC316- und IGROV-1-Experimentaltumoren (N= 10 Tumoren; n= 50 Sektoren).

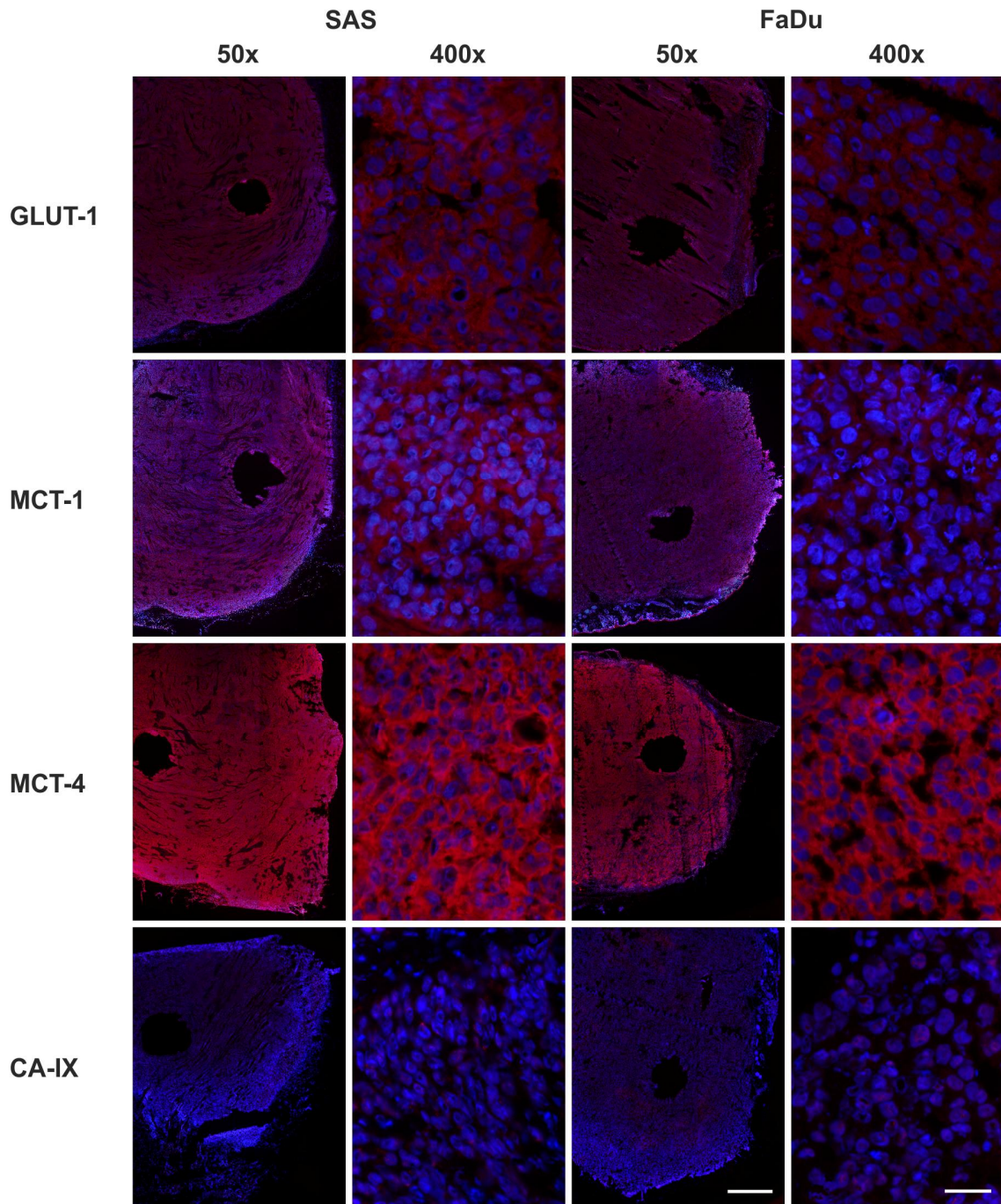
OC316-Tumoren zeigen bei allen untersuchten Proteinen ein höheres Proteinexpressionsmuster als IGROV-1-Tumoren. Statistisch signifikante Unterschiede konnten für die Proteine GLUT-1, MCT-1, MCT-4 und CA-IX detektiert werden. Hierbei ragte das Protein MCT-4 mit einer um den Faktor zwei erhöhten Proteinexpression gegenüber IGROV-1-Tumoren deutlich heraus.



**Abbildung 49: Relative Expression stoffwechselrelevanter Proteine von Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten aus OC316- und IGROV-1-Xenografts**

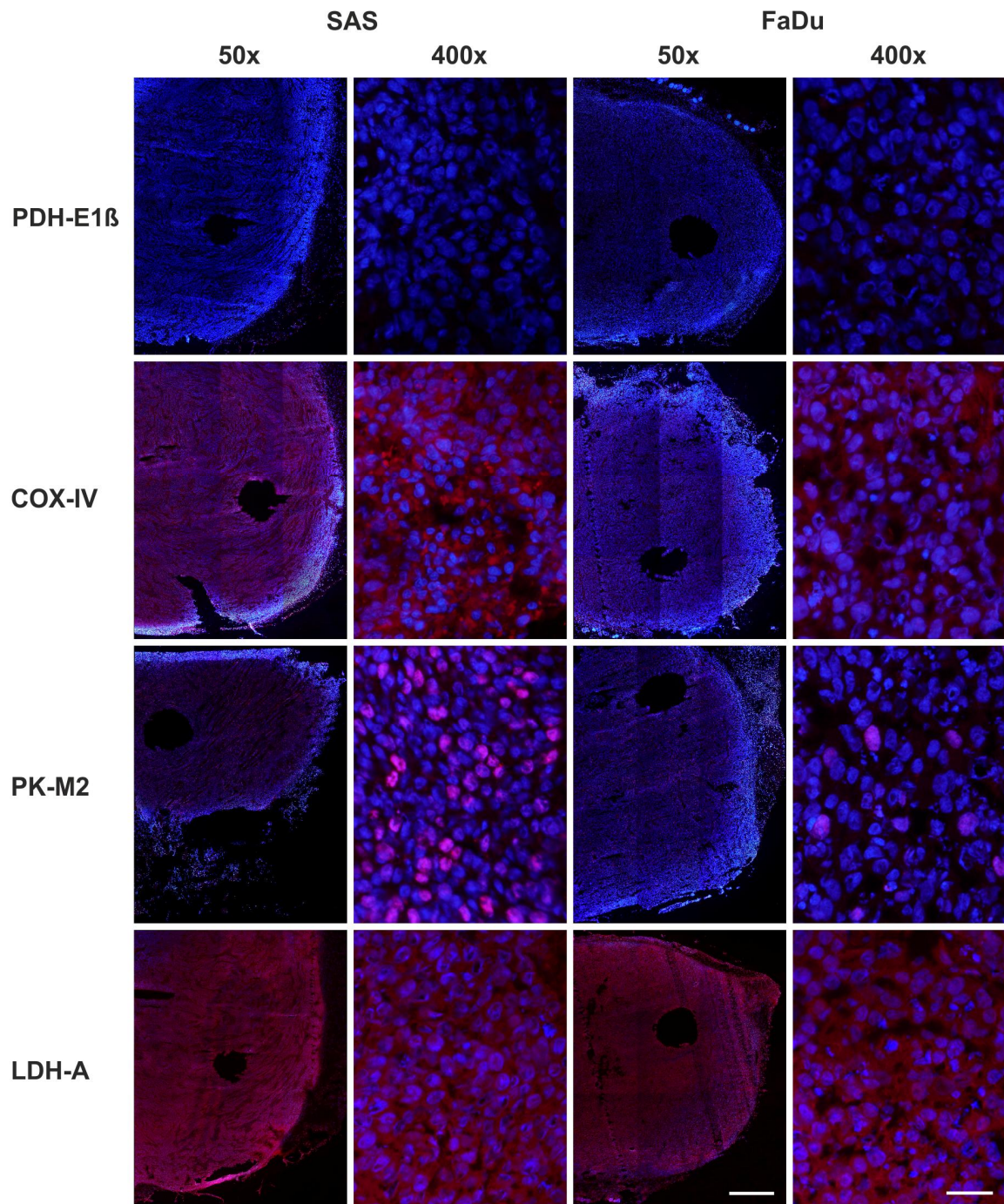
Die relative Proteinexpression des vom Zielprotein ausgehenden Fluoreszenzsignals wurde über zehn OC316- und IGROV-1-Experimentaltumoren (N= 10 Tumoren; n= 50 Sektoren) gemittelt, auf IGROV-1 (= 100 %) bezogen, und inklusive SD aufgetragen. \*p < 0,05 OC316 vs. IGROV-1.

Exemplarische Immunfluoreszenzfärbungen der beiden humanen Plattenepithelkarzinomzelllinien SAS und FaDu sind bei 50 und 400facher Vergrößerung in Abbildung 50 und Abbildung 51 gezeigt. Optisch detektierbare Unterschiede in der Fluoreszenzintensität beschränkten sich auf die Proteine COX-IV und PK-M2. Für alle weiteren untersuchten Proteine waren keine Unterschiede zwischen SAS- und FaDu-Tumoren wahrzunehmen. Die optische Beurteilung der mikroskopischen Aufnahmen wurde durch die computergestützte Quantifizierung (Abbildung 52) bestätigt.



**Abbildung 50: Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine GLUT-1, MCT-1, MCT-4 und CA-IX an Schnitten von SAS- und FaDu-Experimentaltumoren**

Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine GLUT-1, MCT-1, MCT-4 und CA-IX von SAS- und FaDu-Experimentaltumoren in 50 und 400facher Vergrößerung. Die Färbungen wurden an 10 µm dicken Gefrierschnitten durchgeführt. Der Maßstab der 50fachen Vergrößerungen entspricht 300 µm, der der 400fachen Vergrößerungen jeweils 40 µm.



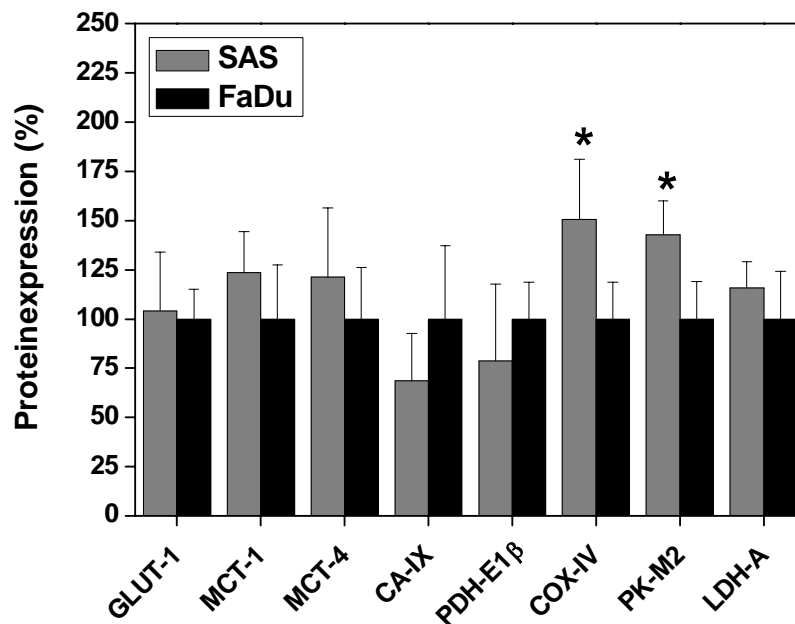
**Abbildung 51: Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine PDH-E1 $\beta$ , COX-IV, PK-M2 und LDH-A an Schnitten von SAS- und FaDu-Experimentaltumoren**

Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine PDH-E1 $\beta$ , COX-IV, PK-M2 und LDH-A von SAS- und FaDu-Experimentaltumoren in 50 und 400facher Vergrößerung. Die Färbungen wurden an 10  $\mu$ m dicken Gefrierschnitten durchgeführt. Der Maßstab der 50fachen Vergrößerungen entspricht jeweils 300  $\mu$ m, der der 400fachen Vergrößerungen jeweils 40  $\mu$ m.

Die computergestützte Auswertung der Proteinexpressionsmuster der beiden HNSCC-Experimentaltumorggruppen SAS und FaDu basiert auf dem MW und SD von jeweils fünf SAS- und fünf FaDu-Tumoren. Pro Tumor wurden fünf unterschiedliche Sektoren

ausgewertet und gemittelt (N= 5 Tumoren; n= 25 Sektoren). Des Weiteren wurde die Menge des vom Zielprotein ausgehenden Fluoreszenzsignals mittels einer DAPI-Kernfärbung auf die jeweilige Tumor-Zellkernfläche pro Kryoschnitt normalisiert.

Signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten von SAS-Tumoren konnten mit 43 % für PK-M2 sowie 50 % für CA-IX lediglich für zwei der acht untersuchten Proteine festgestellt werden. Jedoch war bei SAS-Tumoren ein Großteil der untersuchten Proteine, ausgenommen PDH-E1 $\beta$  und CA-IX, tendenziell stärker exprimiert, wenn auch statistisch nicht signifikant (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Relative Expression stoffwechselrelevanter Proteine von Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten aus SAS- und FaDu-Xenografts**

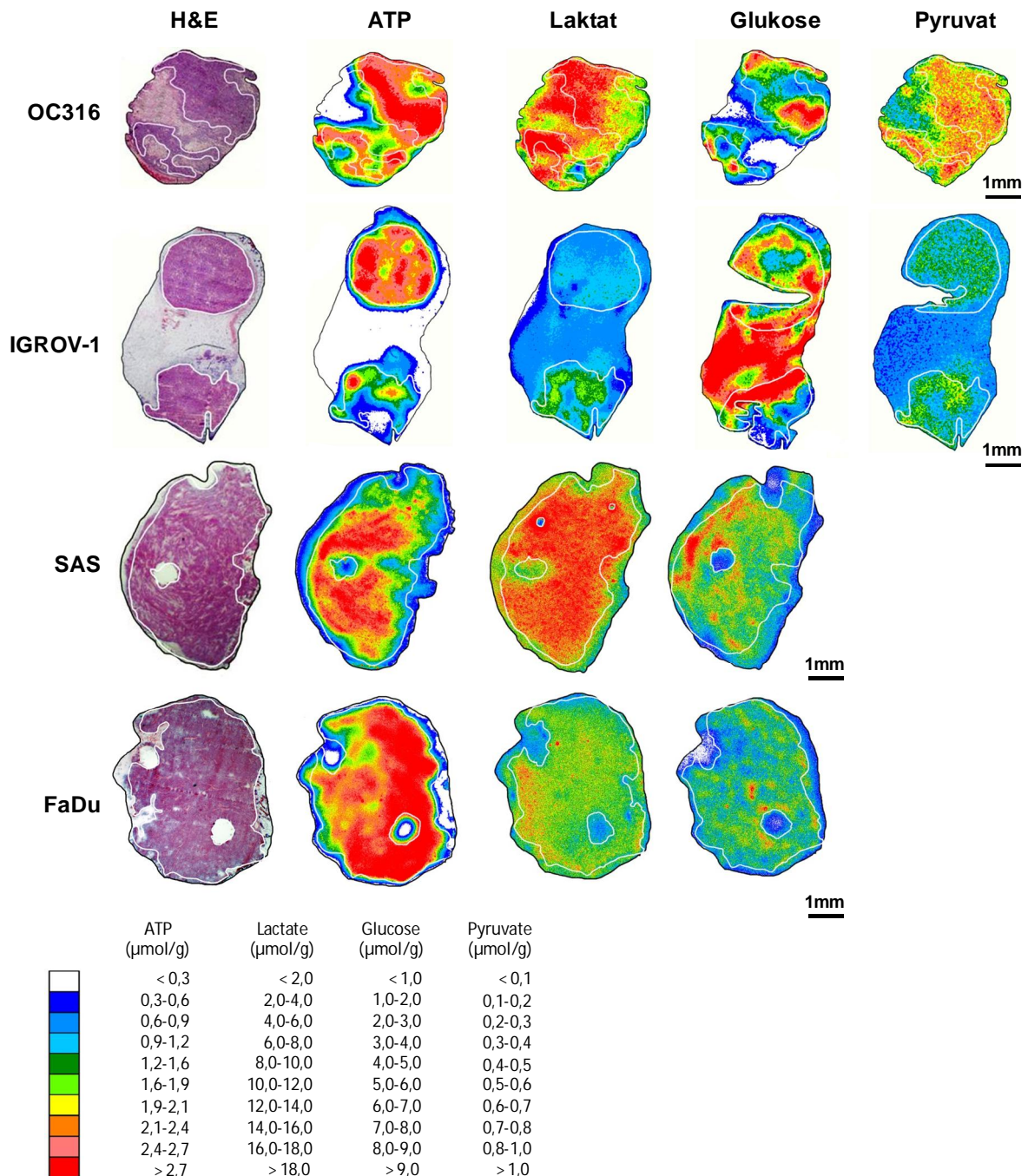
Die relative Proteinexpression des vom Zielprotein ausgehenden Fluoreszenzsignals wurde über fünf SAS- und FaDu-Experimentaltumoren (N= 5 Tumoren; n= 25 Sektoren) gemittelt, auf FaDu (= 100 %) bezogen, und inklusive SD aufgetragen. \*p < 0,05 SAS vs. FaDu.

### 3.4.2 Metabolische Charakterisierung mittels imBI

Experimentaltumoren der Zelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu wurden hinsichtlich ihres ATP-, Laktat-, Glukose- und Pyruvat-Gehalts analysiert. Hierzu diente die Methode des induced metabolic Bioluminescence Imagings (imBI). Sie ermöglicht die quantitative und regionale Bestimmung von verschiedenen Metaboliten in Gefrierschnitten.

Abbildung 53 zeigt repräsentative H&E-Färbungen sowie falschfarbenkalibrierte Biolumineszenzaufnahmen der Metabolite ATP, Laktat, Glukose und Pyruvat der OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Xenografts. Innerhalb der Biolumineszenzaufnahmen sind die untersuchten Metabolite ungleichmäßig verteilt. Außerdem unterscheiden sich die Metabolite drastisch zwischen den untersuchten Experimentaltumoren.

Die ATP Biolumineszenz-Intensität sowie die mitgeführte H&E-Färbung wurden als Indikatoren für vitales Tumorgewebe herangezogen, um nekrotische und bindegewebsartige Areale zu detektieren und die computergestützte Auswertung von Laktat, Glukose und Pyruvat exklusiv auf vitales Gewebe zu beschränken (weiße Linie).



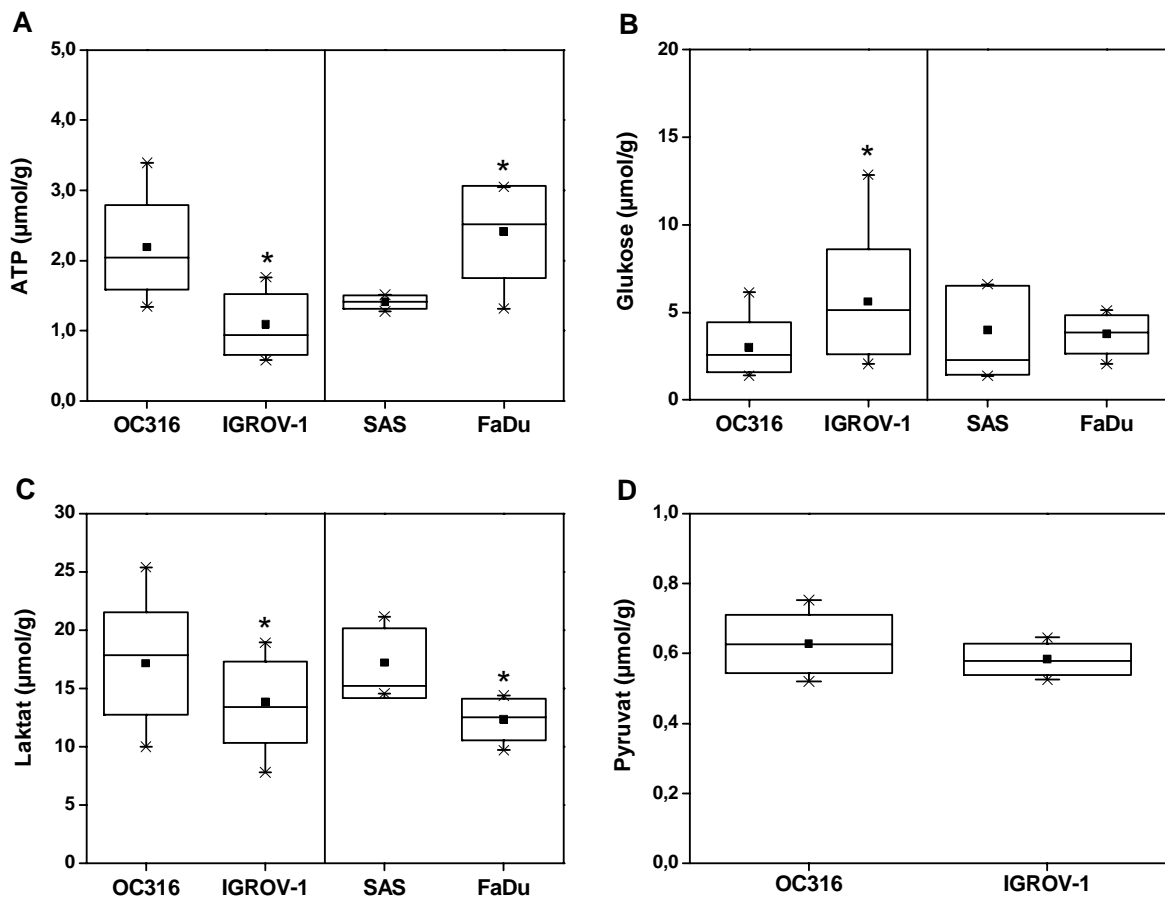
**Abbildung 53: H&E-Färbungen und falschfarbenkalibrierte Biolumineszenzaufnahmen von OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Xenografts**

Gezeigt sind repräsentative H&E-Färbungen und falschfarbenkalibrierte Biolumineszenzaufnahmen der Metabolite ATP, Laktat, Glukose und Pyruvat der OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Xenografts. Die im Rahmen der imBI ermittelte Metabolitverteilung im Tumorschnitt ( $\mu\text{mol/g}$ ) wurde farblich kodiert. Schwarze Linie: Umriss des gesamten Schnittes; weiße Linie: Umriss des vitalen Tumorgewebes.



Der von Abbildung 53 ausgehende optische Eindruck eines ungleichen Metabolitgehalts zwischen den vier Experimentaltumorgruppen wurde durch die computergestützte Auswertung des gesamten Tumorkollektivs von jeweils 15 Tumoren der Linien OC316 und IGROV-1 sowie fünf Tumoren der Linien SAS und FaDu bestätigt (Abbildung 54).

OC316-Tumoren wiesen einen signifikant höheren ATP- und Laktat-Gehalt als entsprechende IGROV-1-Tumoren auf (Abbildung 53 und Abbildung 54A+C). Entgegengesetzt war der Glukosegehalt in OC316-Tumoren signifikant niedriger (Abbildung 53 und Abbildung 54B). Die Pyruvatkonzentrationen waren in OC316- und IGROV-1-Tumoren ähnlich, was dafür spricht, dass Pyruvat als Durchflussmetabolit nicht im Tumorgewebe akkumuliert (Abbildung 53 und Abbildung 54D).



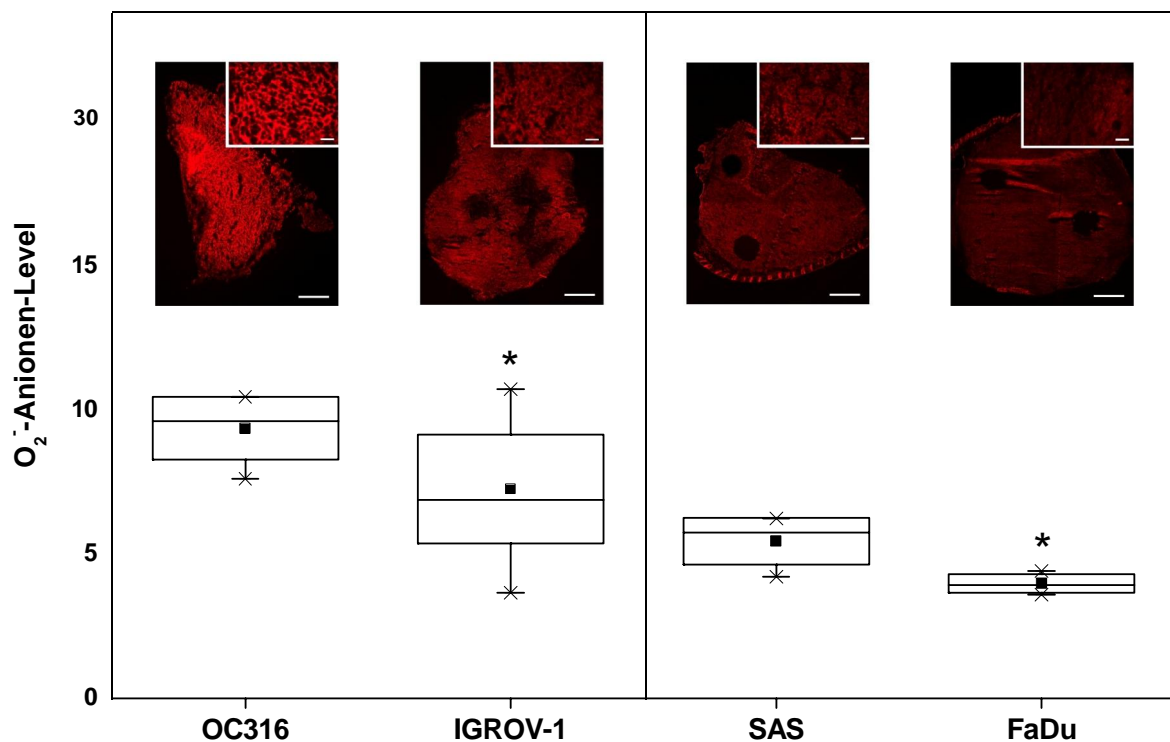
**Abbildung 54: Metabolitmessungen von OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Xenografts mittels imBI**

(A) ATP-, (B) Glukose-, (C) Laktat- und (D) Pyruvat-Gehalte von OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Xenografts. Die Auswertung der Metabolitmessungen erfolgte in jeweils drei Kryoschnitten pro Xenograft ausschließlich in vitalem Tumorgewebe. 15 Xenografts der Tumorklinen OC316 und IGROV-1 (N= 15 Tumoren; n= 45 Kryoschnitte) sowie fünf Tumoren der Linien SAS und FaDu (N= 5 Tumoren; n= 15 Kryoschnitte) wurden analysiert. Die durchgeführten Pyruvatmessungen beschränkten sich auf jeweils fünf OC316- und IGROV-1-Tumoren (N= 5 Tumoren; n= 15 Kryoschnitte). Gezeigt sind MW (Quadrat), Median (Strich), SD (Box) sowie Minimal- und Maximalwerte (Whisker). \*p < 0,05 OC316 vs. IGROV-1 und SAS vs. FaDu.

Die aus den HNSCC-Zelllinien SAS und FaDu generierten Tumoren unterschieden sich hinsichtlich ihres ATP- und Laktatgehalts. SAS-Tumoren zeigten im Vergleich zu FaDu-Tumoren einen niedrigeren ATP-, aber höheren Laktatgehalt (Abbildung 53 und Abbildung 54A+C). Der Glukosegehalt war in beiden Linien nicht unterschiedlich (Abbildung 53 und Abbildung 54B). Pyruvatmessungen wurden bei SAS- und FaDu-Tumoren nicht durchgeführt.

### 3.4.3 Nachweis von $O_2^-$ -Anionen

Die in humanen Experimentaltumoren vorhandene Konzentration an  $O_2^-$ -Anionen wurde durch die Chemikalie DHE visualisiert. In Abbildung 55 sind repräsentative DHE-Färbungen, Übersichts- und Detailaufnahmen von OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Experimentaltumoren sowie die Ergebnisse der computergestützten Auswertung des gesamten Tumorkollektivs dargestellt.



**Abbildung 55:  $O_2^-$ -Anionen-Level von OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Xenografts**

Gezeigt sind exemplarische Übersichts- und Detailaufnahmen von DHE-Färbungen an OC316-, IGROV-1-, SAS- und FaDu-Xenografts sowie MW und SD der computergestützten Quantifizierung des gesamten Tumorkollektivs. Pro Tumor wurde ein Schnitt erstellt und innerhalb dieses fünf unterschiedliche Sektoren ausgewertet. Untersucht wurden zehn OC316- und IGROV-1-Experimentaltumoren (N= 10 Tumoren; n= 50 Sektoren) sowie fünf SAS- und FaDu-Tumoren (N= 5 Tumoren; n= 25 Sektoren). Gezeigt sind MW (Quadrat), Median (Strich), SD (Box) sowie Minimal- und Maximalwerte (Whisker) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. \*p < 0,05 OC316 vs. IGROV-1 und SAS vs. FaDu. Maßstab der Übersichtsaufnahmen: 1 mm; Maßstab der Detailaufnahmen: 50  $\mu$ m.

Schon die rein visuelle Auswertung ergab deutliche Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen den vier Experimentaltumorgruppen. Die metabolisch hoch aktiven OC316-Xenografts sowie die Experimentaltumoren der Linie SAS zeigten im Vergleich zu IGROV-1- und FaDu-Tumoren einen höheren Gehalt an  $O_2^-$ -Anionen (Abbildung 55). Dieser optische Eindruck wurde durch die computergestützte Auswertung des gesamten Tumorkollektivs und die durchgeführten Signifikanztests bestätigt. Kryoschnitte von OC316- und SAS-Xenografts wiesen signifikant mehr intrazelluläre  $O_2^-$ -Anionen auf als IGROV-1 und FaDu. Die gezeigten MW und SD basieren auf jeweils zehn OC316- und IGROV-1-Xenografts (N= 10 Tumoren; n= 50 Sektoren) sowie auf fünf SAS- und FaDu-Xenografts (N= 5 Tumoren; n= 25 Sektoren). Die Menge des vom DHE ausgehenden Fluoreszenzsignals wurde mittels DAPI-Kernfärbung auf die jeweilige Tumorzellkernfläche pro Kryoschnitt normalisiert.

Die *in vivo* erzielten Ergebnisse sind bezüglich Tumormetabolismus, Proteinexpression und Redoxstatus größtenteils kongruent zu den *in vitro* gewonnenen Daten. Das etablierte Mausmodell dient somit als Grundlage für weiterführende Versuche unter Verwendung biochemischer Stoffwechselmanipulatoren *in vivo*.

## 4 DISKUSSION

Das durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderte Projekt der experimentellen Krebsforschung mit dem Titel „Untersuchungen zur Wechselbeziehung zwischen Proteom, Energiestoffwechsel, Redoxstatus und Radiosensibilität von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*“ (SA1749/3-1), ist Grundlage der vorliegenden naturwissenschaftlichen Doktorarbeit. Im Rahmen dieses Projektes wurde neben der Charakterisierung des Tumormikromilieus auf Zell- und Tumorebene die Hypothese überprüft, wonach eine hohe glykolytische Aktivität in Tumorzellen zu einer Anreicherung von antioxidativen Intermediaten und infolgedessen zu einer Beeinflussung der zellulären Strahlenantwort führt (Sattler et al., 2010b). Gezielte biochemische und gentechnische Manipulationen des Energiestoffwechsels wurden bezüglich ihrer metabolischen Wirkung auf Tumorzellen sowie hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die zelluläre Strahlenantwort nach Gammabestrahlung untersucht.

Strategisches Ziel der Arbeit war die Identifikation prädiktiver Parameter und neuer Ansätze des metabolischen Targetings in der Radioonkologie.

### 4.1 Energiestoffwechsel humaner Tumorzelllinien

Im Vergleich zu normalen Zellen weisen Tumorzellen einen veränderten Energiestoffwechsel auf. Sie beziehen einen Großteil ihrer Energie durch eine erhöhte glykolytische Umsatzrate. Dieser Prozess findet in Tumorzellen auch unter Anwesenheit von O<sub>2</sub> statt und wurde erstmals von Otto Warburg beobachtet und als Warburg Effekt bezeichnet (Gatenby und Gillies, 2004; Warburg, 1956). Die aerobe Glykolyse bedingt einen gesteigerten Glukoseverbrauch und erhöhte Bildung von Laktat.

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Müller-Klieser konnte eine klinisch diagnostische Relevanz des Metabolits Laktat nachgewiesen werden. Ein hoher Laktatgehalt in Primärtumoren korreliert mit einem verstärkten Risiko der Metastasierung in Karzinomen des Gebärmutterhalses und Rektums sowie des Kopf- und Halsbereiches. Dies geht mit einer verringerten Überlebensrate der Patienten einher (Brizel et al., 2001; Walenta et al., 2000; Walenta et al., 2003). Des Weiteren zeichnen sich Hochlaktattumoren durch eine stärkere Strahlenresistenz aus (Lin et al., 2003; Quennet et al., 2006; Sattler et al., 2010b). Diese Befunde stehen im Einklang mit anderen unabhängigen Studien, bei denen eine hohe glykolytische Aktivität in Tumorzellen mit einer ungünstigeren Patientenprognose verknüpft ist (Cuezva et al., 2002; Isidoro et al., 2005).

Im Folgenden wird der Tumorstoffwechsel der in dieser Arbeit untersuchten Ovarial- und Plattenepithelkarzinomzelllinien hinsichtlich des Expressionsmusters glykolytischer und

stoffwechselrelevanter Proteine, des Energiestoffwechsels und Redoxstatus charakterisiert. Ebenso wird der Einfluss des Tumormikromilieus auf die Wirksamkeit konventioneller Gammabestrahlung vor dem Hintergrund der vorliegenden Befunde diskutiert.

#### **4.1.1 Tumormikromilieu von Ovarialkarzinomzelllinien und Einfluss des Energiestoffwechsels auf die Wirksamkeit von Gammabestrahlung**

Die beiden Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 wurden unter identischen Bedingungen kultiviert und besaßen mit 19 h und 20,5 h ähnliche Zellzahlverdopplungszeiten (Abbildung 14). Proteinexpressionsanalysen stoffwechselrelevanter Proteine ergaben, dass der membranständige Transporter MCT-4 sowie die Enzyme CA-IX, PDH-E1 $\beta$ , COX-IV und PK-M2 bei OC316- im Vergleich zu IGROV-1-Zellen signifikant höher exprimiert waren (Abbildung 16). Außerdem besaßen OC316- eine um 20 % höhere LDH-Aktivität als IGROV-1-Zellen (Abbildung 17). Die in OC316 gezeigte Hochregulierung metabolischer Proteine begründet die um 53 %, 160 % und 43 % gesteigerte ECAR, OCR und CDER gegenüber IGROV-1-Tumorzellen (Abbildung 18). Weiterführende Untersuchungen des Energiestoffwechsels zeigten für die Zelllinie OC316 gegenüber IGROV-1 einen erhöhten Glukoseverbrauch, eine gesteigerte Laktatproduktionsrate sowie einen erhöhten intrazellulären ATP-Gehalt (Abbildung 19 und Abbildung 20).

Die gewonnenen *in vitro* Daten definieren die Tumorzelllinien OC316 und IGROV-1 als hoch- bzw. niedrig-metabolisches „Pärchen“ gleicher Tumorentität in Kombination mit identischen Kultivierungs- und Wachstumsbedingungen.

Die Charakterisierung des zellulären Redoxstatus ergab, dass die hoch-metabolische Ovarialkarzinomzelllinie OC316 einen signifikant höheren intrazellulären Gehalt an O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Anionen als IGROV-1 besaß (Abbildung 22). Die SOD-Aktivität war bei OC316- tendenziell gegenüber IGROV-1-Zellen gemindert (Abbildung 23), was zumindest teilweise einen Grund für den erhöhten O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Gehalt in OC316 darstellen könnte. Darüber hinaus weist die in OC316-Zellen erhöhte PDH-E1 $\beta$ - und COX-IV-Expression sowie der um 160 % und 43 % gesteigerte OCR und CDER auf eine vermehrte Nutzung der mitochondrialen Atmung gegenüber IGROV-1 hin. Die Atmungskette und insbesondere die Komplexe I und III gelten hierbei als Hauptquelle von radikalen O<sub>2</sub>-Verbindungen (Lenaz et al., 2006; Turrens, 1997). Somit ist das Gleichgewicht zwischen der antioxidativ wirkenden Glykolyse und der Radikalbildung zugunsten der ROS verschoben.

Bei einer Strahlendosis von 2 Gy zeigten beide Zelllinien ein ähnliches klonogenes Überleben, bei höheren Dosen (4 Gy und 8 Gy) überlebten die hoch-metabolischen OC316-Zellen signifikant schlechter (Abbildung 25). Grund hierfür könnte die durch Gammastrahlung hervorgerufene Radikalbildung sein, die den in OC316-Zellen basal erhöhten

O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Gehalt (Abbildung 22) intensiviert und in Kombination mit der geminderten SOD-Aktivität (Abbildung 23) die zelltoxische Wirkung der Gammastrahlung in OC316 gegenüber IGROV-1-Zellen verstärkt.

Ein weiterer Aspekt ist die strahlenbedingte Ausbildung und Reparatur von DNA-Schäden. Hierbei sind DSBs auf Grund ihrer Letalität von besonderer wissenschaftlicher Bedeutung und mittels immunhistologischer Methoden nachweisbar. DSBs führen zu einer Initiierung der Phosphorylierung der Histon-Untereinheit H2AX zu  $\gamma$ H2AX, wodurch dieses als Marker für DSBs gilt. Es konnte für OC316 und IGROV-1 eine dosisabhängige Zunahme der  $\gamma$ H2AX-gefärbten DSBs sowie eine durch Reparaturprozesse bedingte signifikante Reduktion der DSBs 24 h nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Die beiden Ovarialkarzinomzelllinien unterschieden sich nur in ihrem initialen Gehalt an DSBs, das heißt 1 h nach Bestrahlung und exklusiv bei höheren Dosen (4 Gy und 8 Gy). Hier zeigten IGROV-1-Zellen eine signifikant höhere Anzahl  $\gamma$ H2AX markierter DSBs, reduzierten diese jedoch nach 24 h auf das Niveau von OC316, was vermutlich für eine höhere Reparaturkapazität der IGROV-1- gegenüber OC316-Zellen bei hohen Strahlendosen spricht und somit das verbesserte klonogene Überleben bei 4 Gy und 8 Gy erklären könnte (Abbildung 27).

Auf der Basis der in OC316- gegenüber IGROV-1-Zellen gesteigerten glykolytischen Aktivität und Laktatproduktionsrate konnte die Hypothese der metabolisch bedingten Strahlenresistenz bei Hochlaktattumoren *in vitro* nicht bestätigt werden. Die erhöhte Laktatproduktion einer Tumorzelllinie *in vitro* ist möglicherweise ein geeigneter prognostischer Marker für die gesteigerte metabolische Aktivität. Die Wirkung von Laktat als Radikalfänger muss jedoch im Kontext vieler enzymatischer und nicht-enzymatischer antioxidativer Systeme betrachtet werden und ist per se kein prädiktiver Parameter für die Strahlenresistenz einer Tumorzelllinie. Neben der glykolytischen Aktivität beeinflusst gleichsam die mitochondriale Aktivität, die als Radikalbilder der antioxidativen Wirkung glykolytischer Intermediate entgegen wirkt, den Redoxstatus. Die zelluläre Strahlenantwort hängt somit von der Bilanz zwischen Radikalbildung und Radikalverbrauch ab. Zusätzlich ist zu bedenken, dass in einem Zellsystem *in vitro* keine Akkumulation von Laktat wie im Tumorgewebe erfolgt, sondern Laktat durch MCTs in das umgebende Medium ausgeschleust und stark verdünnt wird.

Obwohl für die beiden Ovarialkarzinomzelllinien OC316 und IGROV-1 kein direkter Zusammenhang zwischen glykolytischer Aktivität bzw. Laktatproduktion und der Strahlenresistenz nach Gammabestrahlung nachgewiesen werden konnte, bekräftigen die experimentellen Daten eine Wechselwirkung zwischen Energiestoffwechsel, Redoxstatus und ROS-erzeugender Tumortherapien, was im anschließenden Kapitel 4.2 ausführlich thematisiert wird.

#### 4.1.2 Tumormikromilieu von HNSCC-Zelllinien und Einfluss des Energiestoffwechsels auf die Wirksamkeit von Gammabestrahlung

Im Folgenden wird das Tumormikromilieu der beiden HNSCC-Zelllinien SAS und FaDu und dessen Einfluss auf die Wirksamkeit von Gammabestrahlung diskutiert.

Die Kultivierung der beiden HNSCC-Linien SAS und FaDu erfolgte im gleichen Medium und unter identischen Bedingungen. Mit 21,5 h und 23,5 h für SAS und FaDu besaßen die beiden Linien ähnliche Zellzahlverdopplungszeiten (Abbildung 15). Die Charakterisierung stoffwechselrelevanter Proteine mittels Proteinexpressionsanalysen ergab, dass CA-IX, COX-IV, HK-II und PK-M2 bei SAS tendenziell stärker als bei FaDu exprimiert vorlagen. Der membranständige Transporter MCT-1 sowie das Enzym LDH-A wurden bei FaDu-Zellen verstärkt nachgewiesen (Abbildung 16), die LDH-Aktivität war zwischen SAS und FaDu nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 17).

Die Charakterisierung des zellulären Energiestoffwechsels durch die Seahorse-Technologie ergab eine um 30 % höhere ECAR und 27 % höhere OCR in SAS gegenüber FaDu-Zellen, CDER war kongruent (Abbildung 18). Die gemessenen Laktatproduktionsraten betragen  $1,05 \pm 0,21$  pmol/Zelle/h für SAS und  $0,74 \pm 0,10$  pmol/Zelle/h für FaDu, einhergehend mit Glukoseverbrauchsraten von  $2,60 \pm 2,84$  pmol/Zelle/h für SAS und  $1,26 \pm 1,29$  pmol/Zelle/h für FaDu (Abbildung 19). Somit bestätigte die Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsraten die erhöhte ECAR in SAS-Zellen. Dies lässt in Verbindung mit der erhöhten HK-II- und PK-M2-Expression auf eine gesteigerte glykolytische Aktivität schließen. Die gegenüber FaDu gesteigerte COX-IV-Expression in Kombination mit der erhöhten OCR spricht für eine vermehrte Nutzung der mitochondrialen Atmung. Trotz der erhöhten glykolytischen und mitochondrialen Aktivität der Zelllinie SAS konnte gegenüber FaDu kein signifikanter Unterschied bezüglich der intrazellulären ATP-Konzentration detektiert werden (Abbildung 20).

Auf Grundlage der Energiestoffwechsel- und Proteinexpressionsanalysen ist SAS und FaDu bedingt als hoch- und niedrig-metabolisches „Pärchen“ gleicher Tumorentität bei identischen Kultivierungs- und Wachstumsbedingungen zu definieren.

Im Rahmen der Charakterisierung des Redoxstatus konnte kein signifikanter Unterschied im  $O_2^-$ -Anionen-Level (Abbildung 22) und lediglich eine tendenziell erhöhte SOD-Aktivität bei SAS-Zellen (Abbildung 23) gegenüber FaDu ermittelt werden.

Das klonogene Überleben der Linie SAS nach 2 Gy und 8 Gy Gammabestrahlung war hingegen im Vergleich zu FaDu signifikant besser (Abbildung 25). Für beide HNSCC-Linien konnte eine dosisabhängige Zunahme der initialen sowie residualen DSB durch  $\gamma$ H2AX-Markierung gezeigt werden. Signifikante Unterschiede zwischen SAS und FaDu beschränkten sich auf initiale Schäden; 24 h nach Bestrahlung glichen sich die Anzahl der DBSs einander an, was auf ein effektiveres DSB-Reparaturvermögen von SAS-Zellen

schließen lässt. Andererseits ist bei SAS ohne Bestrahlung ein höherer basaler Gehalt an DSBs zu verzeichnen, was die im Vergleich zu FaDu erhöhte strahleninduzierte Anzahl an DSB relativiert (Abbildung 29).

Zur Diskussion der Fragestellung, ob das Tumormikromilieu einen Einfluss auf die Strahlenresistenz hat, können die dargestellten Ergebnisse in folgende Zusammenhänge gebracht werden. Die Hochlaktatzelllinie SAS zeigte gegenüber der Niedriglaktatzelllinie FaDu eine gesteigerte Strahlenresistenz. Ein Grund hierfür könnte die gesteigerte Glykolyse mit einem höheren antioxidativen Potenzial sowie einer gesteigerten Abwehr gegenüber strahleninduzierten ROS sein. Ein zusätzlicher Einfluss der tendenziell erhöhten SOD-Aktivität bei SAS auf das zelluläre Überleben nach Gammabestrahlung ist jedoch nicht auszuschließen.

Obwohl die Hochlaktatlinie SAS eine stärkere Strahlenresistenz aufweist und die *in vitro* Daten somit im Einklang mit früheren Studien an xenotransplantierten Experimentaltumoren stehen, ist Laktat als prädiktiver Marker für die Radioonkologie kritisch zu betrachten. Energiestoffwechsel, Redoxstatus und Strahlenresistenz sind über zahlreiche Intermediate miteinander verknüpft, deren Gesamtbild möglicherweise besser prognostisch nutzbar wäre. Die Wechselwirkung zwischen Energiestoffwechsel, Redoxstatus und der zellulären Strahlenresistenz bei HNSCC-Zelllinien wird im Kapitel 4.2 anhand experimenteller Daten ausführlich diskutiert.

### **4.1.3 Laktat als prädiktiver Marker in der Tumortherapie**

Die Hypothese, dass Hochlaktattumoren eine stärkere Strahlenresistenz besitzen, konnte *in vitro* nur eingeschränkt bestätigt werden. Eine von Laktat und anderen glykolytischen Intermediaten ausgehende antioxidative Wirkung ist sehr wahrscheinlich nicht ausschließlich für die zelluläre Strahlenantwort verantwortlich, sondern Teil eines stark gekoppelten enzymatischen und nicht-enzymatischen Systems (Kapitel 1.4.1.2). Auf Grund des komplexen Zusammenspiels von Energiestoffwechsel, Redoxstatus und der Strahlenantwort einer Zelle ist die Aussagekraft eines einzelnen prognostischen Markers für die Strahlenresistenz eines Tumors prinzipiell eher als gering einzuschätzen. Andererseits konnte durch statistische Überlegungen gezeigt werden, dass Studien unter dem Einschluss mehrerer Parameter anfällig gegen zufallsbedingte Messwertanhäufungen sind. Dies kann zur Erfassung scheinbarer Korrelationen und entsprechenden Falschbefunden führen (Victor et al., 2010). In diesem Zusammenhang ist die Bestätigung korrelativer Befunde in mehreren unabhängigen Untersuchungen von grundlegender Bedeutung.



Vor diesem Hintergrund ist festzustellen, dass der Laktatgehalt solider Primärtumoren ein prädiktiver Parameter für das rezidivfreie Überleben, das Gesamtüberleben und die Metastasierungswahrscheinlichkeit darstellt. Dies wurde in mehreren unabhängigen Studien an mehreren Tumorentitäten reproduzierbar gezeigt (Brizel et al., 2001; Walenta et al., 2000; Walenta et al., 2003; Ziebart et al., 2011). Hinsichtlich der klinischen Verwendbarkeit von Laktat als prädiktiver Marker stellt sich die Frage, inwiefern der Tumor-Laktatgehalt am Patienten nicht invasiv gemessen werden kann.

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass die Signalstärke und die regionale Verteilung von Laktat, Pyruvat und Alanin im Mausmodell in unterschiedlichen Organen und Tumoren mittels 3D-MRT und hyperpolarisiertem  $^{13}\text{C}$ -Pyruvat nicht invasiv und hochauflösend darstellbar sind. Des Weiteren wurde bei Nieren-, Leber- und Prostata-Experimentaltumoren ein erhöhtes Laktatsignal im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe detektiert (Hu et al., 2010; Larson et al., 2011; Swisher et al., 2013).

Im Gegensatz dazu ist die Frage, inwiefern der Laktatgehalt im Tumorgewebe in erster Linie die Stoffwechselaktivität der einzelnen Krebszellen widerspiegelt, bisher nicht ausreichend untersucht.

Umfangreiche Studien an HNSCC-Experimentaltumoren führten zu keiner positiven Korrelation von Tumor-Laktatgehalt und der mRNA-Expression stoffwechselevanter Proteine. Zusätzlich konnte kein Zusammenhang zwischen den mittels imBI detektierten Laktatkonzentrationen *in vivo* und der Laktatproduktion entsprechender Tumorzelllinien *in vitro* nachgewiesen werden (Sattler et al., 2010b).

Weitere Untersuchungen an selbigen HNSCC-Tumorzelllinien zeigten auf, dass die Messung der zellulären Laktatproduktion, abhängig vom gewählten Zeitpunkt der Probenentnahme, stark variierte. Substraterschöpfung, Produkthemmung und Zellzahlverdopplungszeiten sind *in vitro* gewichtige Einflussgrößen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen (Mann, 2011). Sowohl die Publikation von Fabian et al. (2012) als auch die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigen, dass unter Berücksichtigung der genannten Aspekte die Laktatproduktionsrate *in vitro* mit dem Tumor-Laktatgehalt *in vivo* korreliert und dass die Überführung der untersuchten HNSCC- und Ovarialkarzinomzelllinien in das Mausmodell den Tumorstoffwechsel nicht drastisch beeinflusst. Des Weiteren konnte unabhängig der Tumorentität und des Tumormodells ein Zusammenhang zwischen der glykolytischen Umsatzrate, der Expression stoffwechselrelevanter Proteine und der mitochondrialen Aktivität belegt werden.

Auf Grund dessen ist aus wissenschaftlicher und klinischer Sicht eine Prüfung, inwiefern die in mehreren klinischen Studien gezeigte erhöhte Metastasierung und Malignität von Hochlaktattumoren möglicherweise auf einen gesteigerten Tumorstoffwechsel und nicht exklusiv auf den erhöhten Laktatgehalt zurückzuführen ist, von großem Interesse.

## **4.2 Gentechnische und biochemische Stoffwechselmanipulation von Tumorzellen**

Der deregulierte Tumorstoffwechsel ist ein typisches Charakteristikum der Tumorzelle, der sie vom Normalgewebe bis auf wenige Ausnahmen unterscheidet. Er bietet somit ein Angriffspunkt für therapeutische Interventionen (Hanahan und Weinberg, 2011; Sattler et al., 2010a). So kann beispielsweise durch die Nutzung biochemischer Stoffwechselmanipulatoren der tumoröse Energiestoffwechsel bei gleichzeitiger Schonung normaler Zellen gezielt manipuliert werden (Zhao et al., 2011). Dies ist ein Grund, warum der Tumorstoffwechsel und dessen gezielte Veränderung durch eine Monotherapie oder in Kombination mit etablierten Therapieformen immer stärker in den Fokus der Krebsforschung und zahlreicher klinischer Studien rückt (Tennant et al., 2010).

In den folgenden Kapiteln wird der Einfluss gentechnischer sowie biochemischer Stoffwechselmanipulation, auf den Energiestoffwechsel, Redoxstatus und die Strahlenresistenz von Tumorzellen diskutiert.

### **4.2.1 Stoffwechselmanipulation und Energiestoffwechsel**

Im Rahmen der Expressionsanalysen stoffwechselrelevanter Proteine wurde bei der hoch-metabolischen Ovarialkarzinomzelllinie OC316 gegenüber IGROV-1 eine doppelt so hohe Expression des membranlokalisierten Transporters MCT-4 detektiert (Abbildung 16). Dimmer et al. (2000) konnten zeigen, dass MCT-4 an den in hoch-glykolytischen Zellen gesteigerten Laktatexport adaptiert wird. Darüber hinaus wurde in einer klinischen Studie ein Zusammenhang zwischen der MCT-4-Expression der Tumorstadien-Einteilung, dem postoperativen Tumorrest sowie dem Vorhandensein von Aszites bei epithelialen Ovarialkarzinomen publiziert (Chen et al., 2010).

Auf Grund der Relevanz von MCT-4 für den Tumorstoffwechsel wurde im Rahmen eines gentechnischen Experiments, mittels Transduktion einer MCT-4 shRNA-kodierenden DNA-Sequenz in das Genom von OC316-Zellen, dessen Expression manipuliert. Im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzellen (OC316shRNA) konnte bei den OC316shMCT-4-Zellen eine signifikante Reduktion der MCT-4-Proteinexpression nachgewiesen werden (Abbildung 30 und Abbildung 31A). Die Verringerung des MCT-4 Proteingehalts hatte jedoch keinen messbaren Einfluss auf die ECAR und dementsprechend auf den Laktatexport der OC316shMCT-4-Zellen (Abbildung 31B). Vermutlich wirken andere MCTs einer durch die Herunterregulation von MCT-4 bedingten intrazellulären Anreicherung von Laktat entgegen. Le Floch et al. (2011) konnten zeigen, dass nur durch eine simultane Inhibition mehrerer MCTs (MCT-1, MCT-2 und MCT-4) eine

intrazelluläre Akkumulation von Laktat sowie eine Reduktion der Glykolyserate erreicht werden kann.

Die OCR war bei OC316shMCT-4 im Vergleich zu OC316shRNA-Zellen signifikant höher. Der Grund der Erhöhung ist jedoch weniger auf eine in den OC316shMCT-4-Zellen erfolgte OCR-Hochregulierung zurückzuführen, sondern vielmehr durch eine in den Kontrollzellen erfolgte Minderung der OCR begründbar (Abbildung 31B).

Abschließend ist festzuhalten, dass durch die Transduktion einer MCT-4 shRNA-kodierenden DNA-Sequenz die MCT-4-Proteinexpression signifikant verringert werden konnte, eine deutliche Manipulation des Tumorstoffwechsels blieb jedoch aus. Auf Grund dessen erfolgten keine weiterführenden Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der gentechnischen Manipulation auf den Redoxstatus und die zelluläre Strahlenresistenz.

Experimenten hinsichtlich des Einflusses von biochemischen Manipulatoren auf den Tumorstoffwechsel von Ovarial- und HNSCC-Zelllinien gingen Dosisfindungstests voraus, um zelltoxische Effekte auszuschließen bzw. zu minimieren (Abbildung 32 und Tabelle 8). Anschließend wurden die eruierten Konzentrationen bezüglich ihrer metabolischen Wirkung auf Tumorzellen mit Hilfe des Seahorse Analyzer XF 24/3 untersucht.

Sich akkumulierende OXA-Konzentrationen bewirkten in allen vier untersuchten Zelllinien einen drastischen Abfall der ECAR (Abbildung 33A und Abbildung 34A) sowie zeitgleich eine Zunahme der OCR (Abbildung 33B und Abbildung 34B). Durch die OXA-vermittelte kompetitive Hemmung der LDH kam es auf Grund einer geminderten Laktatbildung zu einer Reduktion der ECAR. Dieses Signal des Seahorse Analysators spiegelt in diesem Fall vorwiegend die zelluläre Sequestration von Milchsäure wieder. Des Weiteren beeindruckte die innerhalb von Minuten auftretende Hochregulierung der mitochondrialen Atmung, die sich durch eine simultan steigende OCR äußerte. Die verstärkte Oxidation von Pyruvat ist vermutlich durch die von OXA ausgehende Inhibition der LDH begründet. Tumorzellen wirken somit einer Akkumulation von Pyruvat entgegen.

Aus den experimentellen Daten ist zu schließen, dass OXA ein effektiver Inhibitor der LDH ist, und dass die Reduktion von Pyruvat zu Laktat im Rahmen der aeroben Glykolyse keine „Notlösung“, sondern von Tumorzellen priorisiert wird, obwohl eine weitere Oxidation von Pyruvat und Intensivierung der mitochondrialen Atmung möglich wäre. Auf Grund der starken Intervention in den Glukoseabbau und in den Glykolyse-basierten Tumorstoffwechsel ist OXA als potenzielles Tumorthapeutikum in den Fokus zahlreicher präklinischer Studien gerückt (Ramanathan et al., 2005; Zhou et al., 2010).

Das Glukoseanalogon 2DG hemmt nach seiner durch HK-II katalysierten Phosphorylierung zu 2DG-6-P kompetitiv die GPI und die weitere Glykolyse. Alle vier Tumorzelllinien reagierten auf die Zugabe ansteigender 2DG-Konzentrationen mit einer Reduktion der ECAR (Abbildung 33C und Abbildung 34C). Ähnlich der Injektion von OXA war eine dosisabhängige Intensivierung der OCR zu verzeichnen (Abbildung 33D und Abbildung 34D). Grund hierfür kann nicht wie bei OXA die zelltoxische Akkumulation von Pyruvat sein. Die Vermutung liegt nahe, dass Tumorzellen auf Grund der gehemmten Glykolyse das wenige Pyruvat nicht reduzieren, sondern gezielt im Rahmen der mitochondrialen Atmung weiter oxidieren, um den durch 2DG verursachten exogenen Eingriff in die glykolytische Energiegewinnung zu kompensieren. Tumorzellen wirken somit nicht nur einer Akkumulation toxischer Stoffwechselderivate entgegen, sondern reorganisieren innerhalb von Minuten ihren Energiestoffwechsel, um ausreichend ATP zu generieren. Studien an Experimentaltumoren zeigten, dass 2DG als Monotherapie trotz seiner drastischen Inhibition des tumorösen Glukosestoffwechsels zu keiner Reduktion des Tumorumens führte. Dies ist vermutlich auf den beschriebenen adaptiven Energiestoffwechsel und die Nutzung alternativer Stoffwechselwege zurückzuführen (Maschek et al., 2004; Zhao et al., 2011).

Die Inhibition des Komplexes I der Atmungskette mit ROT bewirkte bei allen vier Zelllinien einen signifikanten Abfall der OCR (Abbildung 33F und Abbildung 34F) und Anstieg der ECAR (Abbildung 33E und Abbildung 34E). Auch die Manipulation der Atmungskette bewirkt demzufolge innerhalb eines Messzyklusses eine metabolische Reorganisation des Tumorstoffwechsels, was in diesem mit einer erhöhten Laktatbildung beziehungsweise einer gesteigerten glykolytischen Aktivität einherging.

Die Gabe nicht zelltoxischer Konzentrationen OXA, 2DG und ROT veränderte signifikant den Energiestoffwechsel der vier untersuchten Tumorzelllinien, die jedoch auf sehr beeindruckende Weise und innerhalb von Minuten ihren Stoffwechsel an die modifizierten Bedingungen anpassten. Die Verwendung einzelner Stoffwechselmanipulatoren gegen Tumorerkrankungen in Form einer Monotherapie ist vermutlich ineffizient. Ihre Anwendbarkeit in Kombination und in Verbindung mit etablierten Therapieformen wird im Folgenden diskutiert (Kapitel 4.2.3).

Die mittels der Seahorse-Technologie erhobenen Daten wurden teilweise durch amperometrische Messungen des Glukose- und Laktatgehalts vor und nach Zugabe der Stoffwechselmanipulatoren OXA und 2DG überprüft. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die anfängliche Akkumulation von Laktat im Medienüberstand durch die Injektion von OXA

und 2DG bei allen vier untersuchten Zelllinien gehemmt wurde und die Glukosekonzentration nach Zugabe von OXA unverändert blieb (Abbildung 35 und Abbildung 36). Folglich wurde die zuvor beschriebene Manipulation des Glukosestoffwechsels durch OXA und 2DG bestätigt.

Abschließend wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt unter dem Einfluss von OXA, 2DG und ROT untersucht. Die Zugabe von OXA führte bei drei der vier untersuchten Zelllinien (außer IGROV-1) zu einer Reduktion des Energieträgers ATP (Abbildung 37). Ein Eingriff in die von Tumorzellen bevorzugt genutzte Glykolyse scheint durch die im Rahmen der Seahorse-Analyse beschriebene Hochregulation der mitochondrialen Atmung (Steigung der OCR, Abbildung 33B und Abbildung 34B) energetisch nicht kompensierbar zu sein.

Dieser Effekt tritt noch drastischer nach Zugabe des Glykolyse-Hemmers 2DG auf. Bei allen vier Tumorzelllinien führte die Zugabe von 20 mM 2DG zum Medienüberstand zu einem signifikanten Abfall von ATP (Abbildung 37). Auch hier führt der durch die Seahorse-Methode gemessene simultane Anstieg der OCR und die damit verbundene mitochondriale Atmung nach Zugabe von 2DG (Abbildung 33D und Abbildung 34D) zu keiner Kompensation der verminderten ATP-Produktion in der Glykolyse.

Fazit ist, dass die Inhibition bzw. Manipulation des Glukosestoffwechsels mit 2DG und OXA den zellulären ATP-Gehalt reduziert. Die im Rahmen von Seahorse-Messungen gezeigte simultane Erhöhung der OCR (Abbildung 33B+D und Abbildung 34B+D) kann die Reduktion des Glukosestoffwechsels energetisch nicht kompensieren. Untermuert wird diese Aussage durch die nach ROT-Injektion unbeeinflusste intrazelluläre ATP-Konzentration (Abbildung 37). 2DG + ROT bewirkt hingegen den schon durch alleinige Zugabe von 2DG beschriebenen Effekt (Abbildung 37).

Folglich ist die hochregulierte Glykolyse in Tumorzellen die Hauptquelle zur ATP-Generierung, was auch durch zahlreiche unabhängige Studien bestätigt wird (Pelicano et al., 2006). Dies wirft die Frage auf, warum Tumorzellen mitochondriale Atmung betreiben. Verhindert die nach OXA-Zugabe beobachtete Erhöhung der OCR (Abbildung 33B und Abbildung 34B) nur eine toxische Akkumulation von Pyruvat oder ist die in Tumorzellen oftmals gestörte Atmungskette Grund für die geringe oxidative ATP-Gewinnung? Im Rahmen mehrerer unabhängiger Studien konnte eine gesteigerte genomische Instabilität sowie defekte mtDNA in Tumorzellen nachgewiesen werden (He et al., 2010; Yu, 2012). Sie bedingen eine Störung der Atmungskette und führen zu einer gesteigerten ROS-Bildung sowie Beeinflussung des zellulären Redoxstatus (Chatterjee et al., 2011).

#### 4.2.2 Stoffwechselmanipulation und Redoxstatus

Stoffwechselmanipulatoren beeinflussen den zellulären Energiestoffwechsel und Redoxstatus. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Intensivierung der intrazellulären  $O_2^-$ -Anionen durch Erhöhung der 2DG- und ROT-Konzentration im Medienüberstand aller vier untersuchten Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 41). Folglich steigert die simultane Inhibition der Glykolyse und Atmungskette den intrazellulären  $O_2^-$ -Anionen-Gehalt und mindert die antioxidative Kapazität. Ein möglicher Grund hierfür ist zum einen die durch 2DG gezeigte Inhibition der Glykolyse einhergehend mit einer geminderten Pyruvat- und Laktatbildung, die beide als Radikalfänger fungieren (Groussard et al., 2000; Salahudeen et al., 1991). Zum anderen bewirkt 2DG eine Abnahme von NADPH, einem notwendigen Reduktionsmittel zum enzymatischen Abbau von ROS (Simons et al., 2007). Es ist davon auszugehen, dass die intrazelluläre Reduktion antioxidativ wirkender Substanzen zu der beobachteten Erhöhung von  $O_2^-$ -Anionen führt. ROT intensiviert hierbei durch seine beschriebene  $O_2^-$ -Anionen induzierende Wirkung den beschriebenen Effekt (Li et al., 2003).

Durch die Kombinationsbehandlung 2DG + ROT wird somit der zelluläre Redoxstatus durch eine Minderung des antioxidativen Potenzials sowie durch eine Erhöhung der mitochondrialen  $O_2^-$ -Anionen-Bildung aus zwei unterschiedlichen Wirkungsrichtungen manipuliert, was folglich zu einer Steigerung der intrazellulären  $O_2^-$ -Anionen führt.

Auf Grund der Tatsache, dass die Glykolyse ROS-Radikalfänger liefert und eine Manipulation der Atmungskette zu einer erhöhten Bildung von ROS führt, könnte die Stoffwechselmanipulation die Effektivität anderer ROS-erzeugender Therapien, wie beispielsweise die Strahlentherapie, erhöhen.

#### 4.2.3 Stoffwechselmanipulation und Strahlenresistenz

Die Kombination von Stoffwechselmanipulatoren, OXA, 2DG und ROT, und einer klinisch relevanten Gammastrahlendosis von 2 Gy verändert drastisch die Strahlenantwort der vier untersuchten Ovarial- und HNSCC-Zelllinien im Vergleich zu den ausschließlich bestrahlten Kontrollen.

Das klonogene Überleben der hoch-metabolischen Tumorzelllinien OC316 wurde durch die Kombinationsbehandlung 2 Gy Gammabestrahlung und Zugabe von OXA, 2DG, ROT sowie 2DG + ROT signifikant gegenüber den nur mit 2 Gy bestrahlten Kontrollzellen reduziert (Abbildung 42). Auf die niedrig-metabolische und strahlenresistentere Linie IGROV-1 wirkten hingegen nur 2DG, ROT sowie 2DG + ROT in Kombinationsbehandlung mit 2 Gy Gammastrahlung als tendenziell strahlensensibilisierende Maßnahmen im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen. Eine statistisch signifikante Sensibilisierung konnte

lediglich durch Zugabe von 2DG + ROT erzielt werden. OXA hingegen bewirkte bei IGROV-1 sowie bei OC316 in Kombination mit höheren Gammastrahlendosen (4 Gy und 8 Gy, nicht gezeigt) eine Zunahme der Radioresistenz (Abbildung 42).

Die Wirkung der Strahlentherapie basiert neben direkten, physikalischen Strahlenschäden auf so genannten indirekten, durch Radikale verursachten DNA-Schäden. Die durch 2DG und ROT hervorgerufene Minderung des antioxidativen Potenzials inklusive der erhöhten mitochondrialen  $O_2^-$ -Anionen-Bildung intensiviert folglich die Radikal-basierte Strahlenwirkung und reduziert möglicherweise durch einen Anstieg der DNA-Schäden das zelluläre Überleben nach Gammastrahlung.

Die Kombination von OXA und Gammabestrahlung führte nicht zu der erwarteten Zunahme der Radiosensitivität gegenüber ausschließlich bestrahlten Zellen. OXA reduziert zwar durch die kompetitive Inhibierung der LDH die Bildung des Radikalfängers Laktat, als Pyruvat Analogon ist OXA jedoch möglicherweise selbst antioxidativ wirksam. Dies und die Hypothese, dass die Reduktion der Strahlenresistenz nach Kombinationsbehandlung aus einer Erhöhung der DNA-schädigenden Wirkung resultiert, konnte durch eine Visualisierung von DNA-DSBs nach Kombinationsbehandlung im Vergleich zu nur bestrahlten Zellen belegt werden.

Gammabestrahlung mit einer klinisch relevanten Einzeldosis von 2 Gy inklusive Zugabe von 2DG, ROT sowie 2DG + ROT führte bei OC316 und IGROV-1 zu einer signifikanten Erhöhung der initialen sowie residualen DNA-DSBs im Vergleich zu ausschließlich bestrahlten Zellen (Abbildung 45 und Abbildung 46). Dies konnte ebenso für höhere Strahlendosen bestätigt werden. OXA hingegen zeigte bei 2 Gy keinen strahlensensibilisierenden Effekt und führte bei höheren Dosen (8 Gy) zu einer Erhöhung der Strahlenresistenz (Abbildung 45 und Abbildung 46). Dies bestätigt die Hypothese, dass OXA auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Pyruvat antioxidative Eigenschaften besitzt. OXA wurde folglich für Kombinationsbehandlungen an HNSCC-Linien nicht weiter verfolgt.

Das zelluläre Überleben der HNSCC-Linien SAS und FaDu konnte durch Zugabe von 2DG, ROT sowie 2DG + ROT nur eingeschränkt gegenüber den nur bestrahlten Kontrollen reduziert werden. Lediglich 2DG führte zu einer signifikanten Sensibilisierung gegenüber 2 Gy Gammabestrahlung in FaDu-Zellen (Abbildung 43). Auf Grund der geringen Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung auf HNSCC-Zelllinien wurde auf eine Quantifizierung der DNA-DSBs nach Kombinationsbehandlung verzichtet.

Die Ergebnisse bedingen die Annahme, dass die Tumorentität und die intrinsische metabolische Aktivität einen Einfluss auf das Zellüberleben nach Behandlung mit Stoffwechself inhibitoren und Gammabestrahlung haben könnten.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen von HNSCC- und Ovarialkarzinomzelllinien ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Wirkung der kompetitiven Stoffwechsellinhibitoren durch die doppelt so hohe Glukosekonzentration im HNSCC-Medium (4,5 g/l Glukose) im Vergleich zum Ovarialkarzinomzelllinien-Medium (2 g/l Glukose) gemindert wurde. Dies müsste durch weiterführende Experimente, bevorzugt *in vivo*, unter physiologischen Blutzuckerwerten (1,1 g/l Glukose) und identischen Versuchsbedingungen, erforscht werden.

Die für die beiden Ovarialkarzinomzelllinien gezeigte Reduktion des klonogenen Überlebens durch Stoffwechselmanipulatoren, die sich durch eine Erhöhung der DNA-Strahlenschäden äußert, verdeutlicht die Bedeutung des Energiestoffwechsels für die Strahlenantwort einer Tumorzelle und ermöglicht somit neue therapeutische Angriffspunkte innerhalb der Radioonkologie.

#### **4.2.4 Stoffwechselmanipulation - präklinische Forschung und klinische Anwendung**

Die Auswirkung von Stoffwechselmanipulatoren auf den Redoxstatus von Tumorzellen wurde in zahlreichen präklinischen Studien erforscht. Die Hypothese, dass Manipulatoren des Glukosestoffwechsels durch die Inhibierung antioxidativer Systeme die Zytotoxizität ROS-erzeugender Chemikalien (Chemotherapeutika) erhöht, konnte mehrfach bestätigt werden (Maschek et al., 2004; Scarbrough et al., 2012; Simons et al., 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine simultane Erhöhung des zellulären ROS-Status durch ROT das zelluläre Überleben und das Tumorwachstum in Kolonkarzinom-Zellen und -Experimentaltumoren verringert (Fath et al., 2009; Li et al., 2003).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigen die Hypothese, dass Manipulatoren des Energiestoffwechsels die Wirkung ROS-basierter Tumorthérapien erhöht. Die beiden Stoffwechselmanipulatoren 2DG + ROT wirken hierbei als Strahlensensibilisatoren. Dabei ist die Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung auf molekularer Ebene durch die Inhibierung antioxidativer Systeme und durch die simultane Erhöhung des zellulären ROS-Status bedingt. Hier ist nochmals darauf hinzuweisen, dass die Inhibitoren in der eingesetzten Konzentration per se keine zytotoxische Wirkung zeigten.

Die mehrfach publizierte Wirksamkeit von Stoffwechselmanipulatoren gegen Tumorzellen in präklinischen Forschungsprojekten drängt den Tumorstoffwechsel als therapeutischen Ansatzpunkt immer stärker in den Fokus der Krebsforschung und führt zu zahlreichen klinischen Studien.



Erste Behandlungen mit 2DG als Monotherapie sowie in Kombination mit Chemo- und Strahlentherapie befinden sich in klinischen Phase I und II Studien (NCT: 00633087, 00096707, 00247403) gegen zahlreiche Tumorerkrankungen (Tennant et al., 2010).

### 4.3 Übertragung von *in-vitro* Befunden ins Tiermodell

Ausgehend von den vier untersuchten humanen Tumorzelllinien OC316, IGROV-1, SAS und FaDu wurden Experimentaltumoren in immundefizienten Mäusen erzeugt und hinsichtlich ihres Proteoms, Energiestoffwechsels und Redoxstatus untersucht.

Alle acht untersuchten Proteine waren in OC316- höher exprimiert als in IGROV-1- Experimentaltumoren (Abbildung 49). Analog zu den *in vitro* Experimenten (Abbildung 16) ist MCT-4 in OC316-Tumoren annähernd doppelt so hoch exprimiert wie in IGROV-1-Tumoren (Abbildung 49). Das Proteinexpressionsmuster der untersuchten Ovarialkarzinome bildet die Grundlage für den gesteigerten metabolischen Umsatz der OC316 gegenüber den IGROV-1-Tumoren, der sich in einer in OC316-Xenografs erhöhten ATP- und Laktat-Konzentration sowie einem reduzierten Glukosegehalt widerspiegelt (Abbildung 54A+B+C). Die Pyruvatkonzentrationen waren in OC316- und IGROV-1-Tumoren sehr ähnlich, was dafür spricht, dass Pyruvat als Durchflussmetabolit nicht im Tumorgewebe akkumuliert, sondern effizient weiter metabolisiert wird (Abbildung 54D). Entsprechend der Charakterisierung der Tumorzelllinien zeigten die OC316-Tumoren einen erhöhten Gehalt an  $O_2^-$ -Anionen (Abbildung 55).

Die Charakterisierung des Tumormetabolismus, der Proteinexpression und des Redoxstatus der Ovarialkarzinom-Experimentaltumoren bedingt die Einstufung der OC316-Tumoren als hoch-metabolisch und der IGROV-1-Tumoren als niedrig-metabolisch und entspricht somit dem Tumormikromilieu der Ovarialkarzinomzelllinien *in vitro* (Fabian et al., 2012).

Innerhalb der HNSCC-Tumoren waren sechs der acht untersuchten Proteine in SAS-Tumoren stärker exprimiert als in FaDu (Abbildung 52). Die Metabolitmessungen ergaben einen signifikant höheren Laktat-, jedoch einen geringeren ATP- und identischen Glukosegehalt in SAS-Tumoren im Vergleich zu FaDu-Tumoren (Abbildung 54A+B+C). Der  $O_2^-$ -Anionen-Level war in SAS-Tumoren signifikant höher als in FaDu-Tumoren (Abbildung 55). Ähnlich der metabolischen Charakterisierung der HNSCC-Zelllinien ist auch *in vivo* eine absolute Trennung der SAS- und FaDu-Tumoren in hoch- und niedrig-metabolisch nicht allumfassend gültig. Mit Ausnahme des ATP-Gehalts ist SAS, bedingt durch die gesteigerte Expression stoffwechselrelevanter Proteine, den höheren Laktatgehalt und Gehalt an  $O_2^-$ -Anionen *in vivo*, die tendenziell metabolisch stärker aktive Tumorgruppe.

Die Überführung der Ovarial- und Plattenepithelkarzinomzelllinien in das Mausmodell hatte keinen grundsätzlichen Einfluss auf Proteom, Energiestoffwechsel und Redoxstatus und stellt somit eine wichtige Basis für weiterführende Versuche unter Verwendung biochemischer Stoffwechselmanipulatoren in Kombination mit ROS-basierten Tumortherapien *in vivo* dar.

### 4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden umfangreiche Experimente hinsichtlich der Expression stoffwechselrelevanter Proteine sowie des Tumorstoffwechsels und der Strahlenantwort von Tumorzellen *in vitro* durchgeführt. Des Weiteren wurde der Einfluss von Stoffwechselmanipulatoren auf den Energiestoffwechsel und das zelluläre Überleben nach Gammabestrahlung untersucht.

Der basale Redoxstatus sowie die Wirkung der verwendeten Stoffwechselmanipulatoren 2DG + ROT auf den Redoxstatus wurde ausschließlich durch die Bestimmung des  $O_2^-$ -Anionen-Gehalts und der SOD-Aktivität ermittelt. Durch weiterführende Untersuchungen hinsichtlich des GSH/GSSG, Trx(SH)<sub>2</sub>/Trx(S)<sub>2</sub> sowie des NADPH/NAD<sup>+</sup> Verhältnisses vor und nach Zugabe der Manipulatoren könnte die Charakterisierung des basalen Redoxstatus ausgeweitet und die Wechselwirkung zwischen Energie- und Redoxstatus exakter abgebildet werden. Kommerzielle Kits wurden zur Klärung dieser Fragestellung genutzt, lieferten jedoch keine verwendbaren Ergebnisse. Zur Klärung dieser Fragestellung müsste ein System etabliert werden, das direkt nach Injektion der Manipulatoren und idealerweise nicht invasiv die gewünschten Parameter detektiert, um die biochemische Wirkung der verwendeten Stoffwechselmanipulatoren auf das zelluläre Redoxsystem zu erforschen.

Zudem könnte durch eine simultan zu den Stoffwechselmanipulatoren erfolgende Injektion stark antioxidativ wirkender Chemikalien, beispielsweise Vitamin C, überprüft werden, ob die strahlensensibilisierende Wirkung der Stoffwechselmanipulatoren 2DG und ROT durch eine Veränderung des Redoxstatus hervorgerufen wird.

Eine Ausweitung der erfolgten Stoffwechselmanipulation in Kombination mit Gammabestrahlung auf das Tiermodell sowie auch die Kombination von Manipulatoren mit Chemotherapeutika ist auf Grund der im Rahmen dieser Arbeit erlangten Ergebnisse vielversprechend. Hierbei sollte geprüft werden, ob stoffwechselaktive Tumoren ein stärkeres Ansprechen auf Kombinationstherapien (Stoffwechselmanipulatoren + Gammabestrahlung oder Stoffwechselmanipulatoren + Chemotherapeutika) zeigen. Im Rahmen der *in vivo* Studien könnte simultan überprüft werden, ob das geringere Ansprechen der

Kombinationsbehandlung bei HNSCC-Zelllinien durch die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen *in vitro* verursacht wurde.

Darüber hinaus wäre eine Ausweitung der metabolischen Charakterisierung von Tumoren hinsichtlich der mitochondrialen Aktivität interessant. Hierdurch könnte der Frage nachgegangen werden, inwiefern Laktat als prädiktiver Marker für einen generell gesteigerten Tumorstoffwechsel *in vivo* fungiert.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Erforschung ursächlicher Unterschiede im Energiestoffwechsel von hoch- und niedrig-glykolytischen Tumorzelllinien. Darüber hinaus wurde die Hypothese überprüft, wonach eine hohe glykolytische Aktivität in Tumorzellen zu einer Anreicherung von antioxidativen Metaboliten führt und infolgedessen eine Therapieresistenz gegen Gammabestrahlung hervorruft. Abschließend sollte durch biochemische und gentechnische Manipulationen des Energie- bzw. Glukosestoffwechsels die Strahlenresistenz von Tumorzellen verändert und somit neue therapeutische Interventionen eröffnet werden.

Die zur Klärung dieser Fragestellung erforderlichen molekularbiologischen Experimente erfolgten an jeweils zwei Ovarialkarzinomzelllinien (OC316 und IGROV-1) und zwei Plattenepithelkarzinomzelllinien der Kopf- und Halsregion (SAS und FaDu) sowie den entsprechenden Experimentaltumoren.

Unabhängig von der Tumorentität und dem Tumormodell konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression Stoffwechsel-assoziiierter Proteine mit einem gesteigerten Energiestoffwechsel einhergeht. Der Transfer der Ovarial- und Plattenepithelkarzinomzelllinien in das Mausmodell führte zu keiner grundsätzlichen Änderung des Tumormikromilieus. So wies die hoch-metabolische Linie OC316 *in vitro* und *in vivo* eine stark erhöhte MCT-4 Expression auf, deren gentechnische Inhibition jedoch zu keiner Reduktion der Glykolyse-rate führte.

Die Hypothese, dass die Laktatproduktion als prädiktiver Marker für die Strahlenresistenz einer Tumorzelllinie fungiert, konnte nicht bestätigt werden. Jedoch führte die Manipulation der intrazellulären Laktatbildung und des Energiestoffwechsels mit nicht zelltoxischen Konzentrationen von 2-Deoxy-D-glukose (2DG) und Rotenon (ROT) bei den Ovarialkarzinomzelllinien zu einer Erhöhung der intrazellulären  $O_2^-$ -Anionen, einer Zunahme der Strahlenempfindlichkeit sowie zur Steigerung der initialen und residualen DNA-Doppelstrangbrüche nach Gammabestrahlung.

Hierbei wirken 2DG und ROT synergistisch durch die Inhibierung antioxidativer Systeme sowie durch die Erhöhung des zellulären Radikal-Status. Die Anwendung von Stoffwechselmanipulatoren zur Optimierung und Unterstützung vorhandener Radikal-erzeugender Therapieformen wird aktuell in klinischen Studien überprüft. Translational könnte die durch 2DG und ROT beschriebene Erhöhung der Strahlenempfindlichkeit bei Ovarialkarzinomzelllinien z. B. in Kombination mit intensitätsmodulierten Strahlentherapien neue Behandlungsmöglichkeiten eröffnen, was in weiterführenden *in vivo* Studien zu überprüfen ist.

## 6 ANHANG

### 6.1 Chemikalien und Reagenzien

#### 6.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Ort
Aceton	Roth	Karlsruhe
ATP	Roche	Mannheim
BSA	AppliChem	Darmstadt
CASY <sup>®</sup> ton	Roche	Mannheim
CoA	Sigma-Aldrich	Steinheim
DHE	Sigma-Aldrich	Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich	Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich	Steinheim
Eosin	Merck	Darmstadt
Eselserum	Dianova	Hamburg
FMN	AppliChem	Darmstadt
FMNH <sub>2</sub>	AppliChem	Darmstadt
G-6-PDH	Roche	Mannheim
Glukose	Merck	Darmstadt
Glutamat	Sigma-Aldrich	Steinheim
GPT	Roche	Mannheim
Hämtoxylin	Roth	Karlsruhe
HK	Roche	Mannheim
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	AppliChem	Darmstadt
Isopropanol	Roth	Karlsruhe
Janusgrün-B	Sigma-Aldrich	Steinheim
Laktat	AppliChem	Darmstadt
LDH	Roche	Mannheim
Luziferase	Roche	Mannheim
Luziferin (Feuerfliege)	Sigma-Aldrich	Steinheim
Matrigel	BD	Heidelberg
Methanol	Roth	Karlsruhe
Methylenblau	Merck	Darmstadt
NAD <sup>+</sup>	Roche	Mannheim
NADPH	Roche	Mannheim
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe
NFO	Roche	Mannheim
Oxamat (Natriumoxamat)	Sigma-Aldrich	Steinheim
PBS	AppliChem	Darmstadt
PDH	Sigma-Aldrich	Steinheim
PFA	Roth	Karlsruhe
Pyruvat (Natriumpyruvat)	AppliChem	Darmstadt
Rotiblock	Roth	Karlsruhe
Roti-Histokitt II	Roth	Karlsruhe
Salzsäure	Merck	Darmstadt
Tissue-Tek <sup>®</sup>	Sakura Finetek	Alphen, Niederlande
Tris	Roth	Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Steinheim
Trypsin/EDTA	PAA	Pasching, Österreich
Xylol	Roth	Karlsruhe

### 6.1.2 Medien und Zusätze

Produkt	Hersteller	Best.-Nr.	Ort
2DG	Sigma-Aldrich	D6134	Steinheim
D5030	Sigma-Aldrich	D5030	Steinheim
DMEM	PAA	E15-810	Pasching, Österreich
FCS GOLD	PAA	A15-151	Pasching, Österreich
HEPES	Roth	9105.3	Karlsruhe
Natriumoxamat	Sigma-Aldrich	O2751	Steinheim
Natriumpyruvat	AppliChem	A4859	Darmstadt
nicht essentielle Aminosäuren	PAA	M11-003	Pasching, Österreich
Puromycin	PAA	P11-019	Pasching, Österreich
Rotenon	Sigma-Aldrich	45656	Steinheim
RPMI	PAA	E15-840	Pasching, Österreich

### 6.1.3 Kommerzielle Kits

Produkt	Hersteller	Ort
CellTiter-Glo <sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay	Promega	Mannheim
ImmEdge Pen (Fettstift)	Vector	Wertheim
Immunoselect Antifading Mounting Medium	Dianova	Hamburg
Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit	BioVision	Milpitas, USA
Mycoplasma Detection Kit Myco Alert <sup>®</sup>	Lonza	Köln
Superoxide Dismutase Activity Assay Kit	BioVision	Milpitas, USA
TMB OptEIA Substrate Reagent Set	BD	Heidelberg

### 6.1.4 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	Best.-Nr.	Ort
α-Tubulin	Abcam	ab18251	Cambridge, UK
γH2AX	Millipore	05-636	Darmstadt
CA-IX	Santa Cruz	sc-17253	Heidelberg
COX-IV	Abcam	ab20393	Cambridge, UK
GLUT-1	US Biological	G3900	Swampscott, USA
HK-II	Abcam	ab104836	Cambridge, UK
LDH-A	Abcam	ab9002	Cambridge, UK
MCT-1	Santa Cruz	sc-50324	Heidelberg
MCT-4	Santa Cruz	sc-50329	Heidelberg
PDH-E1β	Abcam	ab55574	Cambridge, UK
PK-M2	Cell Signaling	3198	Danvers, USA

Sekundärantikörper	Hersteller	Best.-Nr.	Ort
donkey anti-goat DyLight	Dianova	705-516-147	Hamburg
donkey anti-mouse DyLight	Dianova	715-486-150	Hamburg
donkey anti-mouse HRP	Dianova	715-035-150	Hamburg
donkey anti-rabbit DyLight	Dianova	711-516-152	Hamburg
donkey anti-rabbit HRP	Dianova	711-035-152	Hamburg
donkey anti-sheep DyLight	Dianova	713-516-147	Hamburg
donkey anti-sheep HRP	Dianova	713-035-003	Hamburg
rabbit anti-goat HRP	Dianova	305-035-003	Hamburg

## 6.2 Materialien und Geräte

Produkt	Hersteller	Ort
-20 °C Kühltruhe	Privileg	Stuttgart
-80 °C Kühltruhe, Here Freeze	Thermo Fisher Scien.	Dreieich
Absauganlage, Vacusafe	Integra Biosciences	Fernwald
Autoklav, 5050 ELV	Tuttnauer	New York, USA
CASY® 1TT	Roche	Mannheim
Deckgläschen	Menzel-Gläser	Braunschweig
Digitalwaage	Sartorius	Göttingen
Einfrierbehälter	Thermo Fisher Scien.	Dreieich
Eismaschine AF 20	ScotsmanIce Systems	Vernon Hills, USA
EM-CCD Kamera, iXon IQ Du-888	Andor Technology	Belfast, UK
Feinwaage	Mettler-Toledo	Gießen
Fluoreszenzmikroskop, BZ 8000-K	Keyence	Neu-Isenburg
Gamacell 2000	Molsgard medical	Dänemark
Glasgefäße	Schott	Mainz
Glasobjektträger	Menzel-Gläser	Braunschweig
Heizplatte, H22 electronic	C. Gerhardt	Königswinter
Inkubator, HERAccl 240	Thermo Fisher Scien.	Dreieich
Kryotom	SLEE medical	Mainz
Lichtmikroskop, Axiophot	Zeiss	Oberkochen
Lichtmikroskop, IM	Olympus	Hamburg
Magnetrührer, IKAMAG®RH	IKA®-Werke	Staufen
Mikroplatten	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Mikroplatten-Lesegerät, DTX 880	Beckmann Coulter	Krefeld
Multiwellplatten	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser	Braunschweig
Orbitalschwenker, Polymax 1040	Heidolph Instruments	Schwabach
Petrischalen	Greiner Bio-One	Frickenhausen
pH-Meter CG 822	Schott	Mainz
Pipetten	VWR	Darmstadt
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Pipetus®	Hirschmann	Eberstadt
Polarisationsfilter	Keyence	Neu-Isenburg
quadriPERM	Sarstedt	Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Scanner; Perfection 2400	Epson	Japan
Schüttler, IKA-Vibrax-VXR	IKA-Werke	Staufen
Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3	Seahorse Bioscience	Billerica, USA
Seahorse Zellkulturplatte XF24 V7PS	Seahorse Bioscience	Billerica, USA
Seahorse XF24 Calibrant Solution	Seahorse Bioscience	Billerica, USA
Spiegelreflexkamera, D100	Nikon	Düsseldorf
Sterilbank, CA/REV 3	Clean Air Engineering	Palantine, USA
Sterilfilter, 0,22 µm	Roth	Karlsruhe
Stickstoffanlage	Air Liquide	Düsseldorf
Super GL2-Analysator	Dr. Müller Gerätebau	Freital
UV-Bestrahlungsgerät, Bio-Vision-3026	Vilber Lourmat	Eberhardzell
Vortexer, Vibrofix VF1	IKA®-Werke	Staufen
Wärmebad, Aqualine AL25	LAUDA	Königshofen
Wärmeschrank	Binder	Tuttlingen
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Zentrifuge Megafuge 1.0; Rotor: 022771	Thermo Fisher Scien.	Dreieich

### 6.3 Software und Plugins

<b>Software</b>	<b>Version</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Photoshop	CS3	Adobe Systems
Andor IQ	1.8	Andor Technology
BZ Image Analysis Application	3.60	Keyence
CorelDRAW	X4	Corel Corporation
ImageJ	1.44	National Institutes of Health
Microsoft Office	2007	Microsoft
Origin	8G	OriginLab Corporation
Reference Manager	11	Thomson Reuters

<b>Plugin</b>	<b>Program</b>	<b>Entwickler</b>
FociPicker3D 3D and 2D particle counter	ImageJ 1.44	Guanghua Du
Live Histogram	ImageJ 1.44	Wayne Rasband
Measure RGB	ImageJ 1.44	Wayne Rasband
Tumor Statistics	ImageJ 1.44	J. Osthof und E. Schöner



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Ahmad, IM; Aykin-Burns, N; Sim, JE; Walsh, SA; Higashikubo, R; Buettner, GR; Venkataraman, S; Mackey, MA; Flanagan, SW; Oberley, LW und Spitz, DR (2005). Mitochondrial  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *J Biol Chem* 280; 6:4254-4263.

Alama, A; Barbieri, F; Favre, A; Cagnoli, M; Noviello, E; Pedulla, F; Viale, M; Foglia, G und Ragni, N (1996). Establishment and characterization of three new cell lines derived from the ascites of human ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 62; 1:82-88.

Andringa, KK; Coleman, MC; Aykin-Burns, N; Hitchler, MJ; Walsh, SA; Domann, FE und Spitz, DR (2006). Inhibition of glutamate cysteine ligase activity sensitizes human breast cancer cells to the toxicity of 2-deoxy-D-glucose. *Cancer Res* 66; 3:1605-1610.

Benard, J; Da, SJ; De Blois, MC; Boyer, P; Duvillard, P; Chiric, E und Riou, G (1985). Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* 45; 10:4970-4979.

Benedet, JL; Bender, H; Jones, H, III; Ngan, HY und Pecorelli, S (2000). FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 70; 2:209-262.

Berg, JM; Tymoczko, JL und Stryer, L (2012). Stryer Biochemie. Elsevier GmbH, 7 Auflage ISBN 978-3-8274-2988-9.

Blot, WJ (1992). Alcohol and cancer. *Cancer Res* 52; 7 Suppl:2119s-2123s.

Blot, WJ; McLaughlin, JK; Winn, DM; Austin, DF; Greenberg, RS; Preston-Martin, S; Bernstein, L; Schoenberg, JB; Stemhagen, A und Fraumeni, JF, Jr. (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48; 11:3282-3287.

Brizel, DM; Schroeder, T; Scher, RL; Walenta, S; Clough, RW; Dewhirst, MW und Mueller-Klieser, W (2001). Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51; 2:349-353.

Chatterjee, A; Dasgupta, S und Sidransky, D (2011). Mitochondrial subversion in cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 4; 5:638-654.

Chen, H; Wang, L; Beretov, J; Hao, J; Xiao, W und Li, Y (2010). Co-expression of CD147/EMMPRIN with monocarboxylate transporters and multiple drug resistance proteins is associated with epithelial ovarian cancer progression. *Clin Exp Metastasis* 27; 8:557-569.

Cook, JA; Gius, D; Wink, DA; Krishna, MC; Russo, A und Mitchell, JB (2004). Oxidative stress, redox, and the tumor microenvironment. *Semin Radiat Oncol* 14; 3:259-266.

Cuezva, JM; Krajewska, M; de Heredia, ML; Krajewski, S; Santamaria, G; Kim, H; Zapata, JM; Marusawa, H; Chamorro, M und Reed, JC (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62; 22:6674-6681.

D'Agostino, DP; Putnam, RW und Dean, JB (2007). Superoxide ( $O_2^-$ ) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. *J Neurophysiol* 98; 2:1030-1041.

- DeBerardinis, RJ; Lum, JJ; Hatzivassiliou, G und Thompson, CB (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7; 1:11-20.
- Dimmer, KS; Friedrich, B; Lang, F; Deitmer, JW und Broer, S (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 350 Pt 1;219-227.
- Dohr, D; Engelhardt-Cabillic, R und Geriner, RH (2008). Strahlentherapie des Ovarialkarzinoms. *Der Onkologe* 14; 11:1151-1156.
- Dwarkanath, BS; Zolzer, F; Chandana, S; Bauch, T; Adhikari, JS; Muller, WU; Streffer, C und Jain, V (2001). Heterogeneity in 2-deoxy-D-glucose-induced modifications in energetics and radiation responses of human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50; 4:1051-1061.
- Eckert, AW; Kappler, M; Schubert, J und Taubert, H (2012). Correlation of expression of hypoxia-related proteins with prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Maxillofac Surg* 16; 2:189-196.
- Fabian, C; Koetz, L; Favaro, E; Indraccolo, S; Mueller-Klieser, W und Sattler, UG (2012). Protein profiles in human ovarian cancer cell lines correspond to their metabolic activity and to metabolic profiles of respective tumor xenografts. *FEBS J* 279; 5:882-891.
- Fath, MA; Diers, AR; Aykin-Burns, N; Simons, AL; Hua, L und Spitz, DR (2009). Mitochondrial electron transport chain blockers enhance 2-deoxy-D-glucose induced oxidative stress and cell killing in human colon carcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 8; 13:1228-1236.
- Feron, O (2009). Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol* 92; 3:329-333.
- Ferrick, DA; Neilson, A und Beeson, C (2008). Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug Discov Today* 13; 5-6:268-274.
- Gallagher, RP; Lee, TK; Bajdik, CD und Borugian, M (2010). Ultraviolet radiation. *Chronic Dis Can* 29 Suppl 1;51-68.
- Gatenby, RA und Gillies, RJ (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4; 11:891-899.
- Groussard, C; Morel, I; Chevanne, M; Monnier, M; Cillard, J und Delamarche, A (2000). Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an *in vitro* study. *J Appl Physiol* 89; 1:169-175.
- Hall, EJ und Giaccia, AJ (2006). Radiobiology for the Radiologist. Lippincott Williams & Wilkins, 6 Auflage ISBN 978-0-7817-4151-4.
- Hanahan, D und Weinberg, RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100; 1:57-70.
- Hanahan, D und Weinberg, RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144; 5:646-674.
- He, Y; Wu, J; Dressman, DC; Iacobuzio-Donahue, C; Markowitz, SD; Velculescu, VE; Diaz, LA, Jr.; Kinzler, KW; Vogelstein, B und Papadopoulos, N (2010). Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. *Nature* 464; 7288:610-614.

Helen-Ng, LC; Razak, IA; Ghani, WM; Marhazlinda, J; Norain, AT; Raja Jallaludin, RL; Rahman, ZA; Abdullah, N und Zain, RB (2012). Dietary pattern and oral cancer risk: a factor analysis study. *Community Dent Oral Epidemiol* 40; 6:560-566.

Hiddemann, W und Bartam, CR (2010). Die Onkologie. Springer Verlag, 2 Auflage ISBN 978-3-540-79724-1.

Hirsch, JM; Wallstrom, M; Carlsson, AP und Sand, L (2012). Oral cancer in Swedish snuff dippers. *Anticancer Res* 32; 8:3327-3330.

Hirschhaeuser, F; Sattler, UG und Mueller-Klieser, W (2011). Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res* 71; 22:6921-6925.

Hu, S; Lustig, M; Balakrishnan, A; Larson, PE; Bok, R; Kurhanewicz, J; Nelson, SJ; Goga, A; Pauly, JM und Vigneron, DB (2010). 3D compressed sensing for highly accelerated hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  MRSI with *in vivo* applications to transgenic mouse models of cancer. *Magn Reson Med* 63; 2:312-321.

Hunn, J und Rodriguez, GC (2012). Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol* 55; 1:3-23.

Isidoro, A; Casado, E; Redondo, A; Acebo, P; Espinosa, E; Alonso, AM; Cejas, P; Hardisson, D; Fresno Vara, JA; Belda-Iniesta, C; Gonzalez-Baron, M und Cuezva, JM (2005). Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26; 12:2095-2104.

Kinner, A; Wu, W; Staudt, C und Iliakis, G (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36; 17:5678-5694.

Kommoss, S; Rochon, J; Harter, P; Heitz, F; Grabowski, JP; Ewald-Riegler, N; Haberstroh, M; Neunhoeffer, T; Barinoff, J; Gomez, R; Traut, A und du, BA (2010). Prognostic impact of additional extended surgical procedures in advanced-stage primary ovarian cancer. *Ann Surg Oncol* 17; 1:279-286.

Kreimer, AR; Clifford, GM; Boyle, P und Franceschi, S (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14; 2:467-475.

Larson, PE; Hu, S; Lustig, M; Kerr, AB; Nelson, SJ; Kurhanewicz, J; Pauly, JM und Vigneron, DB (2011). Fast dynamic 3D MR spectroscopic imaging with compressed sensing and multiband excitation pulses for hyperpolarized  $^{13}\text{C}$  studies. *Magn Reson Med* 65; 3:610-619.

Le Floch R.; Chiche, J; Marchiq, I; Naiken, T; Ilc, K; Murray, CM; Critchlow, SE; Roux, D; Simon, MP und Pouyssegur, J (2011). CD147 subunit of lactate/H<sup>+</sup> symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108; 40:16663-16668.

Lemarie, A und Grimm, S (2011). Mitochondrial respiratory chain complexes: apoptosis sensors mutated in cancer? *Oncogene* 30; 38:3985-4003.

Lenaz, G; Fato, R; Genova, ML; Bergamini, C; Bianchi, C und Biondi, A (2006). Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim Biophys Acta* 1757; 9-10:1406-1420.

- Li, N; Ragheb, K; Lawler, G; Sturgis, J; Rajwa, B; Melendez, JA und Robinson, JP (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 278; 10:8516-8525.
- Lin, X; Zhang, F; Bradbury, CM; Kaushal, A; Li, L; Spitz, DR; Aft, RL und Gius, D (2003). 2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism. *Cancer Res* 63; 12:3413-3417.
- Madani, AH; Dikshit, M und Bhaduri, D (2012). Risk for oral cancer associated to smoking, smokeless and oral dip products. *Indian J Public Health* 56; 1:57-60.
- Mah, LJ; El-Osta, A und Karagiannis, TC (2010). gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24; 4:679-686.
- Mann, C (2011). Glykolytische Stoffwechselaktivität und Strahlenresistenz verschiedener Plattenepithel-Karzinomzelllinien *in vitro*. Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Maruccia, M; Onesti, MG; Parisi, P; Cigna, E; Troccola, A und Scuderi, N (2012). Lip cancer: a 10-year retrospective epidemiological study. *Anticancer Res* 32; 4:1543-1546.
- Maschek, G; Savaraj, N; Priebe, W; Braunschweiger, P; Hamilton, K; Tidmarsh, GF; De Young, LR und Lampidis, TJ (2004). 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers *in vivo*. *Cancer Res* 64; 1:31-34.
- Moreno-Sanchez, R; Rodriguez-Enriquez, S; Marin-Hernandez, A und Saavedra, E (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274; 6:1393-1418.
- Mueller-Klieser, W und Walenta, S (1993). Geographical mapping of metabolites in biological tissue with quantitative bioluminescence and single photon imaging. *Histochem J* 25; 6:407-420.
- Nath, KA; Ngo, EO; Hebbel, RP; Croatt, AJ; Zhou, B und Nutter, LM (1995). alpha-Ketoacids scavenge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* and *in vivo* and reduce menadione-induced DNA injury and cytotoxicity. *Am J Physiol* 268; 1 Pt 1:C227-C236.
- Nishigori, C; Hattori, Y und Toyokuni, S (2004). Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 6; 3:561-570.
- Overgaard, J (2007). Hypoxic radiosensitization: adored and ignored. *J Clin Oncol* 25; 26:4066-4074.
- Papandreou, I; Goliassova, T und Denko, NC (2011). Anticancer drugs that target metabolism: Is dichloroacetate the new paradigm? *Int J Cancer* 128; 5:1001-1008.
- Partridge, EE und Barnes, MN (1999). Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment. *CA Cancer J Clin* 49; 5:297-320.
- Paschen, W (1985). Regional quantitative determination of lactate in brain sections. A bioluminescent approach. *J Cereb Blood Flow Metab* 5; 4:609-612.
- Paschen, W; Mies, G; Kloiber, O und Hossmann, KA (1985). Regional quantitative determination of brain glucose in tissue sections: a bioluminescent approach. *J Cereb Blood Flow Metab* 5; 3:465-468.

- Paschen, W; Niebuhr, I und Hossmann, KA (1981). A bioluminescence method for the demonstration of regional glucose distribution in brain slices. *J Neurochem* 36; 2:513-517.
- Pelicano, H; Feng, L; Zhou, Y; Carew, JS; Hileman, EO; Plunkett, W; Keating, MJ und Huang, P (2003). Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem* 278; 39:37832-37839.
- Pelicano, H; Martin, DS; Xu, RH und Huang, P (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25; 34:4633-4646.
- Pfeifer, B; Preiß, J und Unger, C (2006). Onkologie integrativ. Elsevier, 1 Auflage ISBN 978-3-437-56420-8.
- Pinheiro, C; Longatto-Filho, A; zevedo-Silva, J; Casal, M; Schmitt, FC und Baltazar, F (2012). Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr* 44; 1:127-139.
- Quennet, V; Yaromina, A; Zips, D; Rosner, A; Walenta, S; Baumann, M und Mueller-Klieser, W (2006). Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother Oncol* 81; 2:130-135.
- Ramanathan, A; Wang, C und Schreiber, SL (2005). Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102; 17:5992-5997.
- Rangan, SR (1972). A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 29; 1:117-121.
- Raspotnig, G; Fauler, G; Jantscher, A; Windischhofer, W; Schachl, K und Leis, HJ (1999). Colorimetric determination of cell numbers by Janus green staining. *Anal Biochem* 275; 1:74-83.
- Reeves, GK; Pirie, K; Beral, V; Green, J; Spencer, E und Bull, D (2007). Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ* 335; 7630:1134-1145.
- Robert Koch-Institut (2003). Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Bundes-Gesundheitssurvey: Alkohol Konsumverhalten in Deutschland. ISBN 3-89606-142-9.
- Robert Koch-Institut (2006). Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Bundes-Gesundheitssurvey: Soziale Unterschiede im Rauchverhalten und in der Passivrauchbelastung in Deutschland. ISBN 3-89606-161-5.
- Robert Koch-Institut (2011). Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 52, Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede. ISBN 978-3-89606-211-6.
- Robert Koch-Institut (2012). Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Krebs in Deutschland 2007/2008. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 8 Ausgabe ISBN 978-3-89606-214-7.
- Salahudeen, AK; Clark, EC und Nath, KA (1991). Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 88; 6:1886-1893.

- Sattler, UG; Hirschhaeuser, F und Mueller-Klieser, W (2010a). Manipulation of glycolysis in malignant tumors: fantasy or therapy? *Curr Med Chem* 17; 2:96-108.
- Sattler, UG; Meyer, SS; Quennet, V; Hoerner, C; Knoerzer, H; Fabian, C; Yaromina, A; Zips, D; Walenta, S; Baumann, M und Mueller-Klieser, W (2010b). Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 94; 1:102-109.
- Sattler, UG und Mueller-Klieser, W (2009). The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis. *Int J Radiat Biol* 85; 11:963-971.
- Sattler, UG; Walenta, S und Mueller-Klieser, W (2007). A bioluminescence technique for quantitative and structure-associated imaging of pyruvate. *Lab Invest* 87; 1:84-92.
- Sauer, R (2010). Strahlentherapie und Onkologie. Elsevier GmbH, 5 Auflage ISBN 978-3-437-47501-6.
- Scarborough, PM; Mapuskar, KA; Mattson, DM; Gius, D; Watson, WH und Spitz, DR (2012). Simultaneous inhibition of glutathione- and thioredoxin-dependent metabolism is necessary to potentiate 17AAG-induced cancer cell killing via oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 52; 2:436-443.
- Simons, AL; Ahmad, IM; Mattson, DM; Dornfeld, KJ und Spitz, DR (2007). 2-Deoxy-D-glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. *Cancer Res* 67; 7:3364-3370.
- Smith, EM; Rubenstein, LM; Haugen, TH; Pawlita, M und Turek, LP (2012). Complex etiology underlies risk and survival in head and neck cancer human papillomavirus, tobacco, and alcohol: a case for multifactor disease. *J Oncol* 2012; 571862:doi:10.1155/2012/571862.
- Swisher, CL; Larson, PE; Kruttwig, K; Kerr, AB; Hu, S; Bok, RA; Goga, A; Pauly, JM; Nelson, SJ; Kurhanewicz, J und Vigneron, DB (2013). Quantitative measurement of cancer metabolism using stimulated echo hyperpolarized carbon-13 MRS. *Magn Reson Med*
- Takahashi, K; Kanazawa, H; Akiyama, Y; Tazaki, S; Takahara, M; Muto, T; Tanzawa, H und Sato, K (1989). Establishment and characterization of a cell line (SAS) from poorly differentiated human squamous cell carcinoma of the tongue. *Journal of The Japanese Stomatological Society* 38; 1:20-28.
- Tamada, M; Suematsu, M und Saya, H (2012). Pyruvate kinase M2: multiple faces for conferring benefits on cancer cells. *Clin Cancer Res* 18; 20:5554-5561.
- Tennant, DA; Duran, RV und Gottlieb, E (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 10; 4:267-277.
- Thoms, J und Bristow, RG (2010). DNA repair targeting and radiotherapy: a focus on the therapeutic ratio. *Semin Radiat Oncol* 20; 4:217-222.
- Turrens, JF (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17; 1:3-8.
- Uphoff, CC und Drexler, HG (2013). Detection of mycoplasma contaminations. *Methods Mol Biol* 946;1-13.

- Victor, A; Elsasser, A; Hommel, G und Blettner, M (2010). Judging a plethora of p-values: how to contend with the problem of multiple testing - part 10 of a series on evaluation of scientific publications. *Dtsch Arztebl Int* 107; 4:50-56.
- Walenta, S; Chau, TV; Schroeder, T; Lehr, HA; Kunz-Schughart, LA; Fuerst, A und Mueller-Klieser, W (2003). Metabolic classification of human rectal adenocarcinomas: a novel guideline for clinical oncologists? *J Cancer Res Clin Oncol* 129; 6:321-326.
- Walenta, S; Schroeder, T und Mueller-Klieser, W (2002). Metabolic mapping with bioluminescence: basic and clinical relevance. *Biomol Eng* 18; 6:249-262.
- Walenta, S; Schroeder, T und Mueller-Klieser, W (2004). Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem* 11; 16:2195-2204.
- Walenta, S; Wetterling, M; Lehrke, M; Schwickert, G; Sundfor, K; Rofstad, EK und Mueller-Klieser, W (2000). High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60; 4:916-921.
- Warburg, O (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123; 3191:309-314.
- Weber, A; Schmid, KW; Tannapfel, A und Wittekind, C (2010). Changes in the TNM classification of head and neck tumors. *Pathologe* 31; 5:339-343.
- Williams, E; Martin, S; Moss, R; Durrant, L und Deen, S (2012). Co-expression of VEGF and CA9 in ovarian high-grade serous carcinoma and relationship to survival. *Virchows Arch* 461; 1:33-39.
- Wittekind, C und Meyer, HJ (2010). TNM: Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-VCH Verlag, 7 ISBN 978-3-527-32759-1.
- Wu, M; Neilson, A; Swift, AL; Moran, R; Tamagnine, J; Parslow, D; Armistead, S; Lemire, K; Orrell, J; Teich, J; Chomicz, S und Ferrick, DA (2007). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292; 1:C125-C136.
- Yu, M (2012). Somatic mitochondrial DNA mutations in human cancers. *Adv Clin Chem* 57;99-138.
- Zhang, XD; Deslandes, E; Villedieu, M; Poulain, L; Duval, M; Gauduchon, P; Schwartz, L und Icard, P (2006). Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines *in vitro*. *Anticancer Res* 26; 5A:3561-3566.
- Zhao, Y; Liu, H; Liu, Z; Ding, Y; Ledoux, SP; Wilson, GL; Voellmy, R; Lin, Y; Lin, W; Nahta, R; Liu, B; Fodstad, O; Chen, J; Wu, Y; Price, JE und Tan, M (2011). Overcoming trastuzumab resistance in breast cancer by targeting dysregulated glucose metabolism. *Cancer Res* 71; 13:4585-4597.
- Zheng, TZ; Boyle, P; Hu, HF; Duan, J; Jian, PJ; Ma, DQ; Shui, LP; Niu, SR; Scully, C und MacMahon, B (1990). Dentition, oral hygiene, and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People's Republic of China. *Cancer Causes Control* 1; 3:235-241.

Zhou, M; Zhao, Y; Ding, Y; Liu, H; Liu, Z; Fodstad, O; Riker, AI; Kamarajugadda, S; Lu, J; Owen, LB; Ledoux, SP und Tan, M (2010). Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Mol Cancer* 9; 33:doi: 10.1186/1476-4598-9-33.

Ziebart, T; Walenta, S; Kunkel, M; Reichert, TE; Wagner, W und Mueller-Klieser, W (2011). Metabolic and proteomic differentials in head and neck squamous cell carcinomas and normal gingival tissue. *J Cancer Res Clin Oncol* 137; 2:193-199.



# LEBENS LAUF

---



## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Mainz, den 02.07.2013



---

Christian Fabian

