

Bedeutung des Glukosestoffwechsels für die Strahlenempfindlichkeit solider Tumoren

Dissertationsschrift zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Fachbereich Biologie

vorgelegt von

Verena Quennet

Mainz, im

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Die Krebserkrankung	7
1.2	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches	8
1.2.1	Häufigkeit und Lokalisation	8
1.2.2	Molekulare Veränderungen in Kopf-Hals-Tumoren.....	9
1.2.3	Therapiemöglichkeiten bei Kopf-Hals-Tumoren.....	9
1.3	Die Strahlentherapie.....	9
1.4	Pathophysiologie von Plattenepithelkarzinomen.....	10
1.4.1	Versorgungsstatus	11
1.4.2	Energiehaushalt.....	11
1.5	Das Forschungsprojekt.....	12
1.5.1	Hintergrund.....	12
1.5.2	Projekt	13
1.6	Carboanhydrase IX	14
1.7	Expressionsmuster maligner Tumoren	15
1.7.1	Beeinflussung der Expression glykolytischer Enzyme durch HIF-1	15
1.7.2	Laktatdehydrogenase (LDH)	16
1.7.3	Glukosetransporter GLUT1	17
1.7.4	Phosphofruktokinase (PFK)	17
2	Material und Methode.....	20
2.1	Tumormaterial	20
2.2	Herkunft und Entnahme der Tumorbiopsien.....	20
2.3	Strahlenbiologische Charakterisierung der Tumorlinien	22
2.3.1	Bestimmung der radiobiologisch hypoxischen Fraktion (rHF)	22
2.3.2	Bestimmung der hypoxischen Fraktion durch Pimonidazol-Färbung	22
2.3.3	Bestimmung der TCD ₅₀	23
2.4	Bearbeitung der Tumorproben	23
2.5	(Immun-) Histologie	25
2.5.1	Hämalaun-Eosin Färbung an Gefrierschnitten (H/E).....	25
2.5.2	Anti-Maus-Färbung (AM)	25
2.5.3	Anti-Carboanhydrase IX-Färbung (CA IX).....	26
2.6	Bildgebende Biolumineszenz: Messen der Metabolitkonzentrationen.....	26
2.6.1	Die Biolumineszenzreaktionen	26
2.6.2	Zusammensetzung der Enzymlösungen	27
2.6.3	Registrierung der Lichtemission	29
2.6.4	Kalibrierung der Biolumineszenzreaktionen	30
2.6.5	Messprotokoll	31
2.6.6	Biolumineszenz-Auswertung.....	32
2.7	Real Time RT-PCR: Messen der mRNA-Expression.....	32
2.7.1	Tumor-Lyse und RNA-Extraktion.....	32
2.7.2	RNA-Formaldehyd-Gel.....	34
2.7.3	Reverse Transkription (RT).....	34
2.7.4	PCR und Agarose-Ethidiumbromid-Gel	35
2.7.5	Konzentrationsbestimmung der cDNA	37
2.7.6	Real Time PCR	37
2.7.6.1	Relative Quantifizierung	38
2.7.6.2	Validierungsexperiment und vergleichende C _T -Methode ($\Delta\Delta C_T$).....	38
2.8	SDS-PAGE und Western Blot: Messen des Proteingehalts	39
2.9	Statistik.....	42

3 Ergebnisse	43
3.1 Metabolitkonzentrationen.....	43
3.1.1 Vergleich zwischen Xenografts und Humanbiopsien	45
3.1.2 Korrelationsanalysen der Metabolitkonzentrationen	47
3.1.3 Laktatwerte der Versuchstiere, denen nicht Pimonidazol und Hoechst 33342 injiziert wurde.....	48
3.2 Nachweis hypoxischer Gewebeareale.....	49
3.3 Expressionsanalysen mit der Real Time RT-PCR.....	52
3.3.1 Validierung der RNA-Extraktion und der Reversen Transkription	52
3.3.2 Validierung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode	53
3.3.3 Genexpression der Tumorlinien.....	54
3.3.5 Korrelationen zwischen den Metabolitkonzentrationen und der Genexpression ...	56
3.3.6 Korrelationen zwischen Hypoxie und der Genexpression	57
3.4 Western Blot.....	59
3.5 Strahlensensitivität: Die TCD ₅₀	61
4 Diskussion der Methoden	63
4.1 Tiermodelle in der Onkologie	63
4.2 Tumoren	63
4.3 (Immun-) Histologie	64
4.4 Bildgebende Biolumineszenz	65
4.4.1 Kalibrierung.....	65
4.5 Real-Time RT-PCR	66
4.5.1 RNA-Extraktion aus Gewebe	66
4.5.2 RNA-Formaldehyd-Gel und Reverse Transkription.....	66
4.5.3 Verfahren zur RNA-Analyse	67
4.5.4 Etablierung der Real Time RT-PCR	67
4.6 Western Blot.....	68
4.6.1 Proteinextraktion.....	68
4.6.2 Auswertung mit dem Odyssey-System	69
5 Diskussion der Ergebnisse	70
5.1 Metabolitkonzentrationen.....	70
5.2 Expression der Hypoxiemarker Carboanhydrase IX und Pimonidazol	71
5.3 Genexpression	73
5.3.1 Regulation der Glykolyse	73
5.3.2 Pathophysiologie des Tumorstoffwechsels	74
5.3.3 Expression der Laktatdehydrogenase A (ldh-a).....	75
5.3.4 Expression der Phosphofruktokinase L (pfk-l).....	76
5.3.5 Expression des Glukosetransporters 1 (glut1).....	77
5.3.6 Zusammenhang zwischen Hypoxie und Genexpression	77
5.4 Western Blot.....	78
5.5 Der Zusammenhang zwischen Laktatgehalt und Strahlenresistenz von Xenografts.....	78
5.6 Ausblick	81
6 Zusammenfassung	82
7 Literaturverzeichnis	84
8 Anhang.....	92
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	92
8.2 Tabellarische Auflistung der Einzeldaten der Biolumineszenz	94
8.3 Tabellarische Auflistung der real time RT-PCR Ergebnisse	101
8.4 Tabellarische Auflistung der Western Blot Daten.....	108
8.5 Verwendete Kits	108
8.6 Verwendete Puffer und Lösungen	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Organigramm des Projekts mit Darstellung der Aufgabenbereiche der einzelnen Verbundpartner und den Verknüpfungen miteinander.....	14
Abbildung 2.1: Die enzymatischen Reaktionen für den Nachweis von Glukose und Laktat..	27
Abbildung 2.2: Nachweisreaktion von ATP.....	27
Abbildung 2.3: Schema der Methode der bildgebenden Biolumineszenz.....	30
Abbildung 2.4: Vergleich der PCR Effizienzen zweier Gene	39
Abbildung 3.1: Parallelschnitte des Xenografts SAS0085_4	43
Abbildung 3.2: Den histologisch gefärbten Schnitten direkt angrenzende Parallelschnitte....	44
Abbildung 3.3: Das durch die Maske bestimmte, auszuwertende Areal des Laktatschnittes .	44
Abbildung 3.4: Laktatkonzentrationen ($\mu\text{mol/g}$) der xenotransplantierten Tumorlinien und von klinischen HNSCC-Tumorbiopsien.....	45
Abbildung 3.6: Glukosekonzentrationen ($\mu\text{mol/g}$) der xenotransplantierten Tumorlinien und von klinischen HNSCC-Tumorbiopsien.....	46
Abbildung 3.7: Die mittlere (\pm SD) Laktatkonzentration ($\mu\text{mol/g}$) ist als Funktion der mittleren (\pm SD) Glukosekonzentration ($\mu\text{mol/g}$) aufgetragen.....	48
Abbildung 3.8: Unterschied im Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) der Tumoren mit injizierten Markern (+ P und H) und ohne injizierten Markern.....	49
Abbildung 3.9: 3.9a zeigt einen CA IX-immunmarkierten Gesamtschnitt eines UT-SCC-14 Tumorxenografts	49
Abbildung 3.10: (a) CA IX positiver Flächenanteil (%) drei verschiedener Tumorzelllinien, (b) CA IX-Anteil (%) als Funktion von Laktat ($\mu\text{mol/g}$), (c) Pimonidazol positiver Flächenanteil (%) der drei Tumorzelllinien, (d) Vergleich der beiden Hypoxiemarker CA IX (%) und Pimonidazol (%).	50
Abbildung 3.11: pHF (%) als Funktion der Laktatkonzentration ($\mu\text{mol/g}$)	51
Abbildung 3.12: RNA-Gel von sechs Tumoren der Zelllinie SAS.....	52
Abbildung 3.13: DNA-Gel der Negativproben der Reversen Transkription.....	53
Abbildung 3.14: ΔCT -Werte der Zielgene als Funktion der logarithmisch dargestellten Verdünnung.....	53
Abbildung 3.15: glut1-Expression (rel. Einheit) der sieben Tumorlinien und von klinischen Biopsien humaner HNSCC-Tumoren.....	54
Abbildung 3.16: pfk-1-Expression (rel. Einheit) der sieben Tumorlinien und von klinischen Biopsien humaner HNSCC-Tumoren.....	55
Abbildung 3.17: ldh-a-Expression (rel. Einheit) der sieben Tumorlinien und von klinischen Biopsien humaner HNSCC-Tumoren.....	55
Abbildung 3.18: Koexpression der Gene glut1 und pfk-1	56
Abbildung 3.19: Laktat ($\mu\text{mol/g}$) als Funktion der glut1-mRNA	56
Abbildung 3.20: Laktat ($\mu\text{mol/g}$) als Funktion der pfk-1-mRNA	57
Abbildung 3.21: Laktat ($\mu\text{mol/g}$) als Funktion der ldh-a-mRNA.....	57
Abbildung 3.22: Die glut1-Expression (rel. Konzentration) als Funktion der pHF (%).....	58
Abbildung 3.23: Die ldh-a-Expression (rel. Konzentration) als Funktion der pHF (%).....	58
Abbildung 3.24: Die pfk-1-Expression (rel. Konzentration) als Funktion der pHF (%)	59
Abbildung 3.25: Fluoreszenzmarkierte Banden die den Proteingehalt (%) für Tubulin und LDH-A aller sieben Tumorlinien anzeigen	59
Abbildung 3.26: Laktat ($\mu\text{mol/g}$) als Funktion des relativen LDH-A Proteingehalts.....	60
Abbildung 3.27: ldh-a mRNA Gehalt (rel. Konzentration) als Funktion des relativen LDH-A Proteingehalts.....	61
Abbildung 3.28: Die TCD_{50} (Gy) als Funktion der Laktatkonzentration ($\mu\text{mol/g}$).....	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: TNM-Status der fünf in den PCR-Analysen verwendeten Humanbiopsien	20
Tabelle 2.2: Auflistung aller in dieser Arbeit bearbeiteten humanen Tumorlinien.....	21
Tabelle 2.3: Schnittprotokoll für die Aufarbeitung von Biopsien.....	24
Tabelle 2.4: Biochemikalien für den Laktatnachweis.....	28
Tabelle 2.5: Biochemikalien für den Glukosenachweis	29
Tabelle 2.6: Reagenzien für den Reaktionsansatz der Reversen Transkription.....	35
Tabelle 2.7: Reagenzien für den Reaktionsansatz für die semiquantitative RT-PCR	36
Tabelle 2.8: Zusammensetzung für ein SDS-Gel.....	40
Tabelle 2.9: Auflistung aller für den Western Blot verwendeten, polyklonalen Antikörper...	42
Tabelle 3.1: Statistische Daten der Metabolit-Konzentrationen aller untersuchten Xenografts und von Humanbiopsien einer anderen Studie	45
Tabelle 3.2: Der relative Variationskoeffizient (%) der drei Metabolitkonzentrationen als prozentualer Anteil am Gesamtwert	47
Tabelle 3.3: Mittelwert und Standardabweichung (\pm SD) der CA IX-Flächenwerte der drei untersuchten Zelllinien.	50
Tabelle 3.4: Mittelwerte und Standardabweichung (\pm SD) der Pimonidazol-Flächenwerte der sieben untersuchten Zelllinien.....	51
Tabelle 3.5: Statistische Daten der relativen Expressionsstärken	54
Tabelle 3.6: Mittelwerte (\pm SD) für den Proteingehalt an LDH-A, den Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) und den ldh-a m-RNA Gehalt (rel. Konz.) der sieben Tumorlinien	60
Tabelle 3.7: Statistische Daten über die TCD ₅₀	61
Tabelle 5.1: Vergleich von Metabolitkonzentrationen aus unterschiedlichen Studien	70

1 Einleitung

1.1 Die Krebserkrankung

Krebs ist nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern. In Deutschland erkranken etwa 395.000 Menschen jährlich an Krebs. Die derzeitige Heilungsrate bei allen Krebserkrankungen beträgt durchschnittlich 30 bis 40 Prozent. Als geheilt wird in der Onkologie ein Patient bezeichnet, der mindestens fünf Jahre lang ohne Rückfall (Rezidiv) überlebt. Diese Definition ist problematisch, weil viele der Rückfälle erst nach mehr als fünf Jahren erfolgen. Es fließen mithin viele Patienten in die Krebs-Erfolgsstatistik ein, die später an Krebs sterben.

Zur Behandlung stehen die klassischen Methoden Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie zur Verfügung. Darüber hinaus finden auch die Hormon- und die Immuntherapie immer häufiger Anwendung. Meistens erfolgen Kombinationsbehandlungen. Die Chirurgie dient der operativen Entfernung des Tumors; im Anschluss folgt oft die Strahlentherapie, um die verbliebenen Tumorrandbereiche oder nicht operable Regionen abzutöten. Sie kann aber auch vor einer Operation eingesetzt werden, um den Tumor zu verkleinern und dadurch eine Operation erst zu ermöglichen. Die Chemotherapie dient der Bekämpfung von Metastasen im Körper, sie wird aber auch eingesetzt um verbliebene Tumorzellen an einer Rezidivbildung oder der Metastasierung zu hindern. Dennoch können diese drei Disziplinen nicht immer eine sichere Methode zur Heilung anbieten, da der individuelle Verlauf der Tumorerkrankung der betroffenen Patienten sehr vielfältig sein kann.

Die Klassifikation der malignen Tumoren basiert auf ihrer Abstammung vom jeweiligen Muttergewebe, dem Grad ihrer Ausdehnung im Organismus (Staging) und dem histologisch ermittelten Malignitätsgrad (Grading). Den weitaus größten Teil aller Krebserkrankungen machen Karzinome aus, also Tumoren, die von Epithelien ausgehen. Diese werden nochmals differenziert in Plattenepithel- oder squamöse Karzinome, die sich von verhornter und unverhornter (Schleim-) Haut ableiten und Adenokarzinome, welche sich von Drüsenepithel ableiten und je nach Ursprung und Aufbau weiter differenziert werden. Tumoren, die sich aus mesenchymalem Gewebe entwickeln heißen Sarkome. Blastome sind im weitesten Sinne embryonale Tumoren. Präkanzerosen sind Neubildungen, die erfahrungsgemäß häufiger als normales Gewebe nach einiger Zeit zu malignen Tumoren entarten. Unterschieden werden fakultative und obligatorische Präkanzerosen.

1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

1.2.1 Häufigkeit und Lokalisation

Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches stammen laut UICC-Definitionen (Hermanek et al. 1998) aus den Bereichen Lippe, Mundhöhle einschließlich Zunge, Pharynx, Larynx, Große Speicheldrüse und Schilddrüse. Die meisten Tumoren des menschlichen Kopf-Hals-Bereiches sind plattenepithelialen Ursprungs, wobei je nach Ort des Primärtumors anteilige Unterschiede bestehen. Da besonders der Rachenbereich lymphatisch sehr gut versorgt ist, zeichnen sich Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches durch frühzeitige lymphogene Metastasierung aus. Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches machen ca. 7 % aller malignen Erkrankungen aus. In Europa sind 5 % aller malignen Tumoren Mundhöhlenkarzinome (Tumorzentrum Freiburg). Die Entstehung ist multifaktoriell bedingt. Auslösende Faktoren sind insbesondere Nikotin und Alkohol, daneben virale Infektionen, kanzerogene Chemikalien, UV- und radioaktive Strahlen. Histologisch entsprechen 95 % verhornenden Plattenepithelkarzinomen, die restlichen 5 % unterschiedlichen Histologien.

Beim Mundhöhlenkarzinom unterscheidet man die endophytisch (ca. 99 % der Fälle) von einer exophytisch wachsenden Form. Die endophytische Form erscheint als induriertes Ulkus die exophytische Form sieht vekkurös aus, wächst langsamer und metastasiert später. Der Mundboden ist in etwas 36 % der Fälle betroffen, gefolgt von der Zunge (ca. 22 %).

Der Anteil maligner Tumoren des Larynx an allen Kopf-Hals-Tumoren liegt bei etwa 30 %, sie sind mit 1-2 % aller malignen Tumoren die zweithäufigste Tumorart des HNO-Bereiches. Es sind fast ausschließlich Plattenepithelkarzinome. Entsprechend den drei Bezirken des Kehlkopfes werden drei Lokalisationstypen des Larynxkarzinoms unterschieden: Glottische (am häufigsten), supraglottische und (seltener) subglottische Tumoren.

Etwa die Hälfte aller Malignome des Kopf-Hals-Bereiches ist in der oberen Schluckstraße lokalisiert. Die Häufigkeit der Karzinome des Pharynx und der Mundhöhle liegen bei etwa 6 % aller malignen Tumoren, zwei Drittel dieser Tumoren sind im Oro- und Hypopharynx lokalisiert. Auch im Hypopharynx treten fast ausschließlich Plattenepithelkarzinome auf. Das Tumorstadium ist meist fortgeschrittener als bei Larynxtumoren insbesondere was den Lymphknotenstatus betrifft.

Das Nasopharynxkarzinom wird mit dem Epstein-Barr-Virus assoziiert. Dieser Tumortyp ist besonders häufig in Asien und Ostafrika und tritt sonst gehäuft bei Menschen chinesischer Abstammung auf, so dass auch ein genetischer Kofaktor anzunehmen ist.

1.2.2 Molekulare Veränderungen in Kopf-Hals-Tumoren

Karzinogene des Tabakrauchs, erhöhter Alkoholkonsum oder virale Transformation bei HPV-Infektionen durch das Humane-Papilloma-Virus lösen oftmals molekulare Veränderungen der Kopf-Hals-Karzinome aus. Die meisten Tumore der vorliegenden Arbeit sind Karzinome der Mundhöhle oder Zunge. In Mundhöhlenkarzinomen ist eine Amplifikation einiger Onkogene auf Chromosom 11q13 beobachtet worden. Zu nennen sind: c-ras, c-myc, c-hast und c-int. Ein frühes Ereignis bei der Tumorentstehung ist die Mutation bzw. Deaktivierung des Tumorsuppressorgens p53. Ein spätes Mutationsereignis stellt die Aktivierung von Cyclin D1 dar, das den Eintritt in die M-Phase der Mitose reguliert.

1.2.3 Therapiemöglichkeiten bei Kopf-Hals-Tumoren

Die Therapie der Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches erfolgt durch Operation, Strahlentherapie und zytostatische Chemotherapie, die für sich oder kombiniert eingesetzt werden können. Die Entscheidung welche Therapie vorzunehmen ist, erfolgt in Abhängigkeit von Tumorlokalisation und histologischer Diagnose. Generell wird bei Karzinomen (Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom etc.) eine Operation angestrebt, gegebenenfalls ergänzt durch eine adjuvante Strahlentherapie. Auch die primäre Bestrahlung oder eine kombinierte Radio-Chemotherapie können sehr wirksam sein, beschränken jedoch die Möglichkeit einer späteren Operation. Die zytostatische Chemotherapie allein wird überwiegend palliativ eingesetzt. Trotz großer Fortschritte in allen drei Therapiemöglichkeiten haben sich die Überlebensraten für Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches in den letzten Jahrzehnten nicht signifikant verbessert. Die Fünfjahres-Überlebensrate variiert je nach Lokalisation und Stadium von > 90 % (glottisches Larynxkarzinom) bis zu ca. 56 % (Mundhöhlenkarzinom).

1.3 Die Strahlentherapie

Neben der genetischen Instabilität maligner Zellen treten auch ausgeprägte Heterogenitäten des intratumoralen metabolischen Milieus auf. Der Oxygenierungssatus des Tumorgewebes ist hierbei von zentraler Bedeutung. Die Wirksamkeit einer Strahlentherapie wird von einem niedrigen Sauerstoffgehalt in den Tumorzellen stark beeinträchtigt, da dadurch weniger strahleninduzierte Radikale gebildet werden. Bei der angewandten Strahlentherapie wird unterschieden nach der Tiefe des Herdes und nach Strahlenart und Strahlenqualitäten. Bei den in der Strahlentherapie maligner Erkrankungen angewandten Strahlen handelt es sich entweder um Korpuskularstrahlen, d. h. um hoch beschleunigte Elektronen aus dem Linear- oder Kreisbeschleuniger, die direkt auf das zu bestrahlende Gewebe im Körper einwirken, indem

sie hier einen Ionisationsprozess auslösen; oder es handelt sich um Photonenstrahlen (elektromagnetische Wellen), entstanden in Röntgentherapiegeräten, in Linearbeschleunigern oder in Kreisbeschleunigern durch Aufprall von Elektronen auf ein Target, wobei Gammastrahlen erzeugt werden. Ionisierende Strahlen üben ihre Wirkung über die Ionisation und Anregung von Atomen bzw. Molekülen durch Energieübertragung aus. Im Gewebe entstehen als Ionisationsprodukte sowohl sehr reaktionsfreudige Radikale mit positiven oder negativen Ladungen als auch freie Elektronen. Durch Anwesenheit von Sauerstoff wird die Strahlenwirkung erhöht. Eine kurative Strahlentherapie kann durchgeführt werden, wenn die gesamte Tumorausdehnung einschließlich der befallenen angrenzenden Gewebsanteile und Lymphknotenstationen in einem Bestrahlungsvolumen erfasst werden kann.

Bei Kopf-Hals-Tumoren wird die Radiotherapie entweder als Monotherapie oder in Kombination mit operativen Maßnahmen entweder prä- oder postoperativ eingesetzt. Die primäre Bestrahlung wird bei fortgeschrittenen inoperablen Karzinomen und Sarkomen vorgenommen oder wenn die kurative Operation aufgrund des reduzierten Allgemeinzustandes des Patienten ausgeschlossen ist.

1.4 Pathophysiologie von Plattenepithelkarzinomen

Der Ausdruck Karzinom bezeichnet einen invasiv wachsenden Tumor epithelialen Ursprungs. Die Tumorzellen sind sowohl hinsichtlich des Genotyps als auch des Phänotyps sehr heterogen, was zu einer großen Variabilität und Unberechenbarkeit im Therapieverhalten und dem gesamten Krankheitsverlauf führt. Die maligne Entartung des Gewebes bringt neben intrinsisch-zellulären Vorgängen auch eine Reihe pathophysiologischer Veränderungen mit sich. Auf Grund unregulierter Proliferation und einer unphysiologischen Gefäßneubildung entsteht eine abnormale Versorgungssituation, die häufig durch Sauerstoffmangel, Azidose und Laktatanreicherung im Tumorgewebe gekennzeichnet ist (Hockel und Vaupel 2001b). Das besondere Mikromilieu übt auf Tumorzellen einen speziellen Selektionsdruck aus. Es kommt zu Veränderungen auf transkriptioneller Ebene, Beeinträchtigung der mRNA-Stabilität und posttranslationalen Modifikationen. Klonale Veränderungen sind bei einem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) unterhalb von 1 mmHg zu erwarten (Hockel und Vaupel 2001a). Klinische Studien belegen, dass mit einem hohen Laktatgehalt eine erhöhte Aggressivität und ein erhöhter Metastasierungsgrad von Tumoren einhergeht, was in einer schlechten Patientendiagnose resultiert (Walenta et al. 2000).

1.4.1 Versorgungsstatus

Die Entwicklung eines soliden plattenepithelialen Tumors führt schnell zur Entstehung unzureichend versorgter Tumorareale. Als Folge der verstärkten Proliferation der Tumorzellen wächst der Abstand zwischen den versorgenden Gefäßen, so dass die Diffusionsstrecken für Sauerstoff und andere Substrate immer größer werden. Bei einem Abfall des Sauerstoffpartialdrucks unter 10 mmHg sinkt die Strahlenempfindlichkeit von Tumoren, daher nimmt man diesen Wert als Grenze um von einer „radiobiologischen Hypoxie“ innerhalb des Gewebes zu sprechen. Unterversorgte und hypoxische Areale sind normalerweise heterogen im gesamten Tumor verteilt. Der schlechte Versorgungsstatus wird als Hauptursache für die Therapieresistenz von Plattenepithelkarzinomen angenommen. Die Hypoxie bietet einen gewissen Schutz für Tumorzellen vor der Wirkung ionisierender Strahlung. Die Wirksamkeit der Strahlentherapie beruht auf der physikalischen Interaktion von Röntgenstrahlen mit molekularem Sauerstoff. Hierbei entstehen Sauerstoffradikale, die zu einer Schädigung der DNA führen. Aus diesem Grund erweist sich ein Mangel an Sauerstoff als tumorprotektiv. Darüber hinaus benötigen wichtige Chemotherapeutika wie Cisplatin oder Doxorubicin Sauerstoff, um ihre toxische Wirkung zu entfalten. Die Selektionseffekte, die durch die Mangelversorgung hervorgerufen werden, fördern die Entwicklung eines aggressiven, therapieresistenten und somit hochmalignen Phänotyps.

1.4.2 Energiehaushalt

Zellen bestreiten im Normalfall unter normoxischen Bedingungen ihren Energiehaushalt über die Atmungskette und ATP-Synthese in den Mitochondrien. Das ATP wird bei der oxidativen Phosphorylierung gewonnen. Während die Glykolyse zwei Moleküle ATP pro Glukosemolekül liefert, gewinnt die Zelle über die Atmungskette für jedes Molekül Glukose 36 Moleküle ATP. Es ist daher als ökonomisch anzusehen, dass unter aeroben Bedingungen die Glykolyse gehemmt und der Energiebedarf über die Zellatmung gedeckt wird. Dieses Phänomen bezeichnet man als Pasteur-Effekt. Unter anaeroben Bedingungen schaltet die Zelle auf die „anaerobe“ Glykolyse um. Im Falle der Tumorzellen wird als Folge sehr viel Laktat angereichert, weil das Pyruvat nicht über den Pyruvatdehydrogenasekomplex abgebaut wird und entstehende Reduktionsäquivalente nicht in die Atmungskette überführt werden. Da maligne entartete Zellen die mitochondriale Aktivität beeinflussen und herunterfahren (Cuezva et al. 2002), ist die Glykolyse als ATP Lieferant essentiell und deshalb meist erhöht. Bei Untersuchungen an Leber-, Nieren- und Kolonkarzinomen wurde gezeigt, dass bioenergetische und strukturelle Komponenten der Mitochondrien vermindert exprimiert werden. So konnte ein deutlicher

Rückgang mitochondrialer Proteine, der mitochondrialen DNA und der Organellen selbst beobachtet werden. Gleichzeitig wurde mit der resultierenden Abnahme der oxidativen Phosphorylierung ein Anstieg des Gehalts des Glykolyseenzym GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) beobachtet (Cuezva et al. 2002). Die mitochondriale DNA (mtDNA) weist hohe Mutationsraten in Tumorzellen auf (Pelicano et al. 2006). Da die mtDNA 13 wichtige Proteinkomponenten für die Atmungskette kodiert und keine Introns besitzt sind Mutationseffekte gravierend (Xu et al. 2005b, Pelicano et al. 2006). Otto Warburg stellte bereits in den Dreißiger Jahren die These auf, dass in Tumorzellen die mitochondriale Funktion beeinträchtigt wird, und er fand außerdem heraus, dass solide Tumoren auch in Anwesenheit von Sauerstoff eine starke Laktatproduktion aufweisen (Warburg-Effekt). Demnach liegt diesem Phänomen vermutlich auch ein onkogen veränderter Stoffwechsel zu Grunde. Der Laktatgehalt dient als prognostischer Parameter hinsichtlich der Malignität eines Tumors und bezüglich des Überlebens von Patienten. Die gesteigerte Glykolyserate wird u.a. durch erhöhte Transkriptionsniveaus von Glykolyseenzymen aufrecht erhalten, worauf in Kapitel 1.7 noch genauer eingegangen wird.

1.5 Das Forschungsprojekt

1.5.1 Hintergrund

Klinische und experimentelle Untersuchungen belegen eine wesentliche prognostische Bedeutung der Hypoxie und weiterer Parameter des Mikromilieus für die Strahlentherapie solider Tumoren.

Solide, maligne Tumoren zeigen pathophysiologische und pathohistologische Unterschiede im Vergleich zu gesundem Normalgewebe. Eine abnorme Gefäßbildung führt zu einer veränderten Mikrozirkulation und einer mangelnden Versorgung mit Sauerstoff und Substraten. Neben der pathologischen Vaskulatur führen Anämie sowie der erhöhte Sauerstoffverbrauch des schnell proliferierenden Tumorgewebes zu Hypoxie (Vaupel et al. 2001a, Vaupel et al. 2001b, Hockel und Vaupel 2001c). Strahlenbiologische Untersuchungen zeigen, dass anoxische Zellen etwa um den Faktor 3 strahlenresistenter sind als gut oxygenierte Zellen (Gray 1953, Wright und Howard-Flanders 1957). Der Anteil anoxischer bzw. hypoxischer klonogener Zellen in soliden Tumoren und deren Potential zu reoxygenieren sind daher wichtige strahlenbiologische Parameter für das Ergebnis einer fraktionierten Strahlentherapie (Hockel et al. 1996). Kennzeichnend ist zudem eine hohe Glykolyserate, die mit einem gesteigerten Glukoseumsatz und einer Akkumulation von Laktat im Gewebe korreliert ist. Dieses Phänomen beruht zum Teil auf den ausgedehnten hypoxischen Arealen im Tumorgewebe, allerdings

ist die gesteigerte Glykolyserate auch Folge einer erhöhten Expression von membranständigen Glukosetransportern (z. B. GLUT1) und Enzymen der Glykolyse, insbesondere der Phosphofruktokinase-1 (PFK-1) und der Laktatdehydrogenase (LDH). Veränderungen der Genexpression, Translation und posttranslationaler Prozesse führen zur malignen Progression mit Zunahme der Aggressivität, der Therapieresistenz und des metastatischen Potentials. Der genaue Zusammenhang zwischen dem Glukosestoffwechsel und dem biologischen Strahlenverhalten dieser Tumoren ist nicht bekannt. Ein Hinweis darauf, dass der Laktatgehalt mit der Strahlenresistenz von Tumoren in Zusammenhang stehen könnte, liefern die Ergebnisse aus mehreren unabhängigen klinischen Studien an drei unterschiedlichen Tumorentitäten. Dabei handelte es sich um Patientenbiopsien, deren Laktatgehalt untersucht wurde. Die Daten zeigten eindeutig, dass ein hoher Laktatgehalt in der Primärläsion mit einer hochsignifikant verminderten Überlebensrate verbunden ist. Dies gilt sowohl für das allgemeine als auch für das rezidivfreie Überleben (Walenta et al. 2000). Da die meisten dieser Patienten einer Radiotherapie unterzogen worden sind, stellte sich die Frage, ob der Laktatgehalt einen Einfluss auf die Strahlentherapie bzw. auf das biologische Strahlenverhalten von Tumoren hat. So gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass ein erhöhter glykolytischer Flux mit einem intensivierten Antioxidationsschutz der Zelle einhergeht (Brand und Hermfisse 1997b). Es lässt sich somit die Hypothese aufstellen, dass ein hoher Glukoseumsatz mit einer hohen Strahlenresistenz gekoppelt sein könnte, da der wichtigste Mechanismus zur Zellschädigung durch ionisierende Strahlen über die Bildung von Sauerstoffradikalen gehemmt ist.

1.5.2 Projekt

Gegenstand des DFG-geförderten multiinstitutionellen Forschungsprojektes, der Universitäten, Dresden, München, Würzburg und Mainz, war die Darstellung und Quantifizierung der Hypoxie und des metabolischen Mikromilieus in Tumoren. Dazu sollten verschiedene humane Plattenepithelkarzinomzelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich, die als Xenografts auf Nacktmäusen etabliert sind, mittels unterschiedlicher experimenteller Methoden untersucht werden. Eine Besonderheit des Vorhabens bestand in der Bestrahlung der Tumoren nach einem klinischen Fraktionierungsschema, d. h. mit einer täglichen Dosis von 3 Gy über vier Wochen; damit ist die Situation einer radioonkologischen Therapie wesentlich besser angenähert, als in den meisten bisherigen experimentellen Strahlenuntersuchungen, die meist mit einer Einzeldosis oder einer geringen Zahl von Dosisfraktionen arbeiten. Im Rahmen des geschaffenen Netzwerkes zwischen den einzelnen Laboren wurden die Tumoren zentral vom Dresdner Labor (Technische Universität Dresden, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus) zur Verfügung gestellt, und auch der Austausch von Tumormaterial zwischen den Arbeits-

gruppen wurde von dort organisiert. Da alle beteiligten Labore die gleichen Tumormodelle bzw. histologische Folgeschnitte desselben Tumors mit unterschiedlichen Techniken untersuchten, war ein direkter Vergleich und eine räumliche Korrelation (Kokalisation) der Daten, die in eine gemeinsame Datenbank einfließen, möglich. Die Ergebnisse sollten insbesondere mit der radiobiologischen hypoxischen Fraktion (rHF) sowie mit der lokalen Tumorkontrolle nach einer klinisch relevanten fraktionierten Strahlentherapie korreliert werden. Abbildung 1.1 zeigt ein Organigramm mit den einzelnen Vernetzungen der Projektteilnehmer. Gemeinsames Endziel aller beteiligten Arbeitsgruppen war die Entwicklung eines individuellen prognostischen „Markersets“ für die Strahlentherapie solider maligner Tumoren des Menschen. Es ist jedoch noch nicht möglich, radiobiologische hypoxische und somit besonders strahlenresistente Tumorzellen für einen gezielten therapeutischen Eingriff zu identifizieren. Die radiobiologisch hypoxische Fraktion lässt sich derzeit nur in Experimentaltumoren bestimmen.

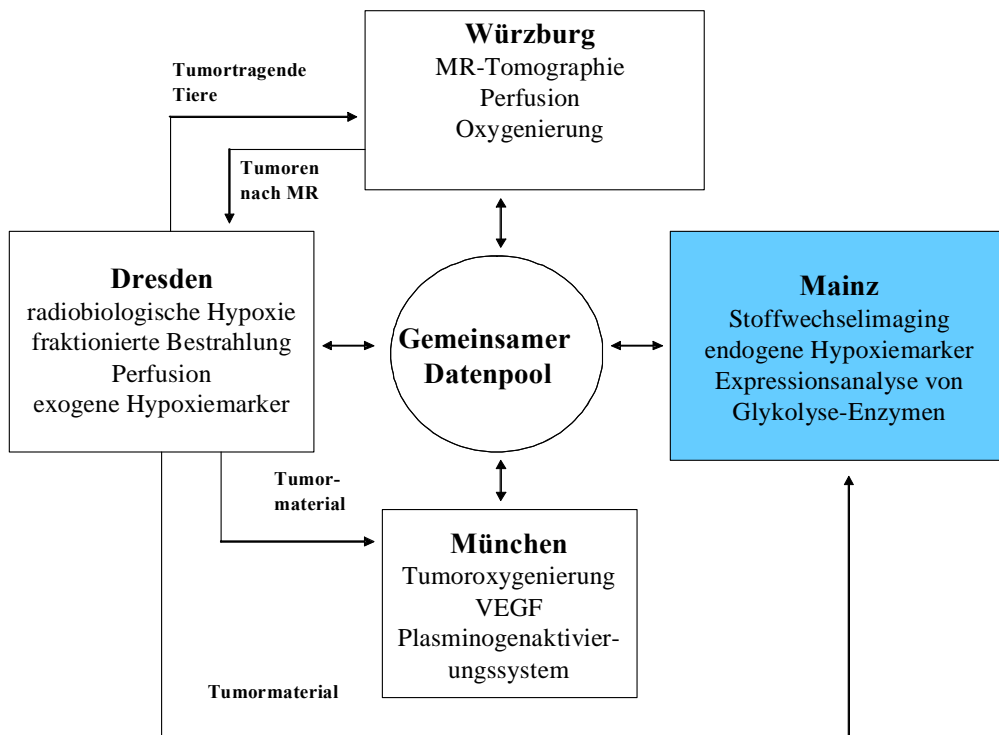


Abbildung 1.1: Organigramm des Projekts mit Darstellung der Aufgabenbereiche der einzelnen Verbundpartner und den Verknüpfungen miteinander

1.6 Carboanhydrase IX

Die Expression bestimmter Isoformen der Carboanhydrase wird durch Hypoxie beeinflusst. Von besonderem Interesse für die Onkologie ist dabei die Carboanhydrase IX (CA IX). Sie war das erste Isoenzym, das mit Tumoren assoziiert (Opavsky et al. 1996) und nachfolgend in

vielen unterschiedlichen Tumorarten gefunden wurde (Wykoff et al. 2000). Die vielen verschiedenen Isoformen membranständiger Carboanhydrasen lassen unterschiedliche, gewebe-spezifische Funktionen vermuten. Allen Carboanhydrasen gemeinsam ist die Umwandlung von Kohlenstoffdioxid (CO_2) und Wasser (H_2O) zu Kohlensäure (H_2CO_3), die in Hydrogenkarbonat (HCO_3^-) und Wasserstoff (H^+) dissoziiert. CA IX spielt eine wesentliche Rolle in der physiologischen pH-Regulation. Es wurde lange Zeit angenommen, dass das saure interstitielle Mikromilieu aufgrund erhöhter Glykolyseaktivität hauptsächlich durch die Akkumulation von Milchsäure, die zu Laktat $^-$ und H^+ dissoziiert, begründet ist. Das bei der Glykolyse entstehende Laktat-Anion wird zum größten Teil im Kotransport mit einem Proton aus der Zelle transportiert, was zur Ansäuerung des Mikromilieus führt (Manning Fox et al. 2000). Es zeigte sich aber, dass CA IX unter Hypoxie den extrazellulären pH-Wert stark beeinflussen kann. Die Hypoxie stimuliert sowohl die Expression als auch die Aktivität der CA IX, womit es zu einer Ansäuerung des Milieus kommt, welche wiederum die Zellproliferation und die Metastasierung fördert und somit von großer Bedeutung für die Tumorprogression ist (Svastova et al. 2004). Die Transkription des CA IX Gens wird über HIF-1 reguliert. Unter Hypoxie liegt HIF-1 vermehrt vor und verursacht einen Anstieg der CA IX-Expression. Eine erhöhte Expression des membranständigen CA IX deutet auf eine schlechte Prognose für Patienten hin (Thiry et al. 2006). CA IX gilt als Hypoxiemarker, dessen Expressionsmaximum in perinekrotischen und somit hypoxischen Arealen liegt (Potter und Harris 2003, Kim et al. 2004). Darüber hinaus wurde eine Kolo-kalisation von CA IX und dem exogenen Hypoxiemarker Pimonidazol gezeigt (Olive et al. 2001). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich die Hypothese ableiten, wonach tumorassoziierte Carboanhydrasen als endogene Hypoxiemarker und als Marker für die Laktatanreicherung und somit für den Grad der Tumormalignität dienen könnten.

1.7 Expressionsmuster maligner Tumoren

1.7.1 Beeinflussung der Expression glykolytischer Enzyme durch HIF-1

Die maligne Entartung von Zellen des Menschen geht u. a. mit einem gesteigerten glykolytischen Flux einher. Ursache hierfür ist die Überexpression von membranständigen Glukosetransportern und von verschiedenen Enzymen der Glykolyse als Folge der Aktivierung von Onkogenen bzw. der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Shim et al. 1997). Das Hochregulieren betrifft vor allem GLUT1, während die Überexpression von glykolytischen Enzymen besonders für die Phosphofruktokinase (PFK) und die Laktatdehydrogenase (LDH) gilt. Dies scheint den wichtigsten Einfluss auf die Laktatproduktion zu haben, da die Menge des

produzierten Laktats nicht dem Einfluss der lokalen O_2 -Konzentration unterliegt (Warburg-Effekt). Der „hypoxia-inducible factor“ (HIF) spielt eine wichtige Rolle bei der Überexpression von Enzymen der Glykolyse. Aus den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β zu HIF-1 zusammengesetzt, kann dieser unter bestimmten Bedingungen eine Vielzahl von Genen aktivieren, deren Produkte in der Regel auf eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung sowie Kompensation von Sauerstoffdefiziten durch angepasste Glykolyseaktivität hinwirken. Die Untereinheiten von Glykolyseenzymen stellen wichtige Angriffspunkte von HIF-1 dar. Enzyme der Glykolyse sind in der Regel Heteromere, deren Untereinheiten durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Die regulatorischen und katalytischen Eigenschaften hängen stark von der Zusammensetzung dieser Untereinheiten und somit vom Isoenzymmuster ab (Kopperschlager und Kirchberger 1996). HIF-1 ist ebenfalls in der Lage die Glukoseaufnahme in die Zelle zu regulieren und so die Menge des Ausgangsproduktes für die Glykolyse zu beeinflussen. Bei der Aufnahme ist maßgeblich der Insulin-unabhängige Glukose-Transporter 1 (GLUT1) beteiligt, dessen Expression ebenfalls von HIF-1 hochreguliert wird (Semenza 2002a, Semenza 2002b). Das Endprodukt der Glykolyse in Tumorzellen ist das Laktat, das mit einer schlechten Patientendiagnose verknüpft ist (Walenta et al. 2000). Aus diesem Grund ist in der vorliegenden Arbeit der Tumormetabolismus und die Hypoxie von Tumorzellen von großem Interesse, insbesondere im Hinblick auf Strahlenresistenzen, hervorgerufen durch Hypoxie und durch Glykolyseprodukte mit anti-oxidativer Wirkung wie Pyruvat und Laktat (O'Donnell-Tormey et al. 1987, Brand und Hermfisse 1997a, Groussard et al. 2000).

1.7.2 Laktatdehydrogenase (LDH)

Die Laktatdehydrogenase katalysiert die reversible $NADH+H^+$ -abhängige Hydrierung von Pyruvat zu Laktat. Neben der bekannten Lokalisation im Zytoplasma wird LDH an der Mitochondrienmembran, in der Matrix von Peroxisomen und im Zellkern gefunden.

LDH liegt als katalytisch aktives Enzym als Tetramer vor. Es setzt sich aus den Untereinheiten LDH-A und LDH-B zusammen, wobei sich fünf verschiedene Kombinationen und somit fünf verschiedene Isoenzyme ergeben, die z. T. gewebespezifisch zusammengesetzt sind. Jede der zwei Untereinheiten besitzt eine Molekülmasse von etwa 32 kDa. Die Biosynthese der Untereinheiten wird von unterschiedlichen Genen gesteuert. Das Isoenzym 5, welches aus vier LDH-A Untereinheiten besteht und hauptsächlich in Skelettmuskulatur auftritt, zeigt die größte Effizienz bezüglich der Umwandlung von Pyruvat zu Laktat. Das Isoenzym 1, bestehend aus vier LDH-B Untereinheiten und im Herzmuskel anzutreffen, favorisiert hingegen die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, welches in den Zitratzyklus eintritt. Eine dritte

Untereinheit, die LDH-C, tritt bei seminalen Zellen von männlichen Säugern auf (Bonny et al. 1998). In Tumorzellen wird häufig eine Überexpression der LDH-A festgestellt (Koukourakis et al. 2003, Unwin et al. 2003) und ein Isoenzymshift vermutet. Während LDH-A über HIF-1 reguliert wird, ist LDH-B von niedrigen Sauerstoffkonzentrationen und somit HIF unbeeinflusst.

1.7.3 Glukosetransporter GLUT1

Das Phänomen der erleichterten Diffusion von Glukose über die Zellmembran beruht auf der Funktion spezifischer, als Glukosetransporter dienender, Carrierproteine, da freie Glukose die Lipiddoppelschicht der Membranen nur in geringem Ausmaß passieren kann. Glukosetransporter bilden eine Familie von acht Mitgliedern. Sie bestehen jeweils aus einer einzigen ca. 500 Aminosäureresten langen Polypeptidkette. Das eigentliche Strukturmotiv bilden 12 Transmembransegmente. Sie weisen untereinander beträchtliche Ähnlichkeiten auf, werden gewebs- bzw. zellspezifisch exprimiert und zum Teil durch externe Stimuli reguliert. Der GLUT1-Transporter ist am weitesten verbreitet und stellt auf Grund seiner hohen Glukoseaffinität die Grundversorgung der Zellen mit Glukose sicher. Er kommt besonders in fetalen, aber auch in vielen adulten Säugerzellen vor. Maligne Zellen zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine erhöhte Glukoseaufnahme (Kurata et al. 1999, Rudlowski et al. 2003). In vielen Tumorgeweben wird eine erhöhte Expression des Glukosetransporters 1 gefunden. In unterschiedlichen Tumorentitäten wurde eine eindeutig schlechte Prognose für Patienten, sowie ein aggressiveres Verhalten von Tumoren mit erhöhter GLUT1 Expression nachgewiesen (Haber et al. 1998, Furudoi et al. 2001, Kawamura et al. 2001, Kang et al. 2002, Vordermark und Brown 2003, Macheda et al. 2005, Tohma et al. 2005). Da HIF-1 die Expression von GLUT1 hochreguliert, wird GLUT1 auch als Hypoxiemarker verwendet, aber es zeigt sich, dass GLUT1 nicht nur hypoxiespezifisch exprimiert wird. Das Protein kann auch unter Normoxie *in vitro* nachgewiesen werden (Vordermark und Brown 2003).

1.7.4 Phosphofruktokinase (PFK)

Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykolyse ist in allen Geweben die Phosphofruktokinase 1 (PFK-1). Sie katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von Fruktose-6-Phosphat zu Fruktose-1,6-Bisphosphat. Die Aktivität der PFK-1 wird stark durch den zellulären Energiemetabolismus rückgekoppelt und kontrolliert. Die PFK-1 unterliegt unterschiedlichen allosterischen Hemmungen wozu ATP und Zitrat zählen. Aktiviert wird die PFK-1 hingegen u. a. durch den Anstieg von AMP, worauf auch die gesteigerte Glykolyserate unter Hypoxie zurückzuführen ist. Wie die LDH und das GLUT1 wird auch die PFK, insbe-

sondere die PFK-L Untereinheit unter Hypoxie von HIF-1 hochreguliert (Gleadle und Ratcliffe 1998, Semenza 2002a). Es gibt mehrere Isoformen der PFK-1, zusammengesetzt aus drei verschiedenen Untereinheiten: PFK-L („Leber-Typ“), PFK-M („Muskel-Typ“) und PFK-C („Blutplättchen-Typ“). Die Gene der drei Untereinheiten sind auf drei unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Während im Gehirn alle drei Formen der PFK vorkommen trifft man auf die M-Untereinheit nur im Muskel und auf die L-Untereinheit vorwiegend in der Leber. In Tumorzellen werden hauptsächlich die C- und L-Untereinheiten angetroffen während die M-Untereinheit eher selten auftritt (Sanchez-Martinez und Aragon 1997). Die einzelnen Isoenzyme haben unterschiedliche Affinitäten zu Aktivatoren und allosterischen Hemmstoffen. Fruktose-2,6-Bisphosphat gilt als Aktivator der PFK-1, wobei die L-Untereinheit davon am stärksten betroffen ist (Oskam et al. 1985). Außerdem wird das Enzym durch diesen Aktivator vermehrt exprimiert (Vora et al. 1985). Fruktose-2,6-Bisphosphat wird daher als Regulator des glykolytischen Fluxes angesehen (Perez et al. 2000).

1.8 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte im Rahmen eines von der DFG geförderten, multiinstitutionellen Forschungsprojektes die Relevanz des Glukosestoffwechsels für die Radiosensitivität solider Tumoren untersucht werden. Zur Bestimmung des metabolischen Mikromilieus wurden mit der bildgebenden Biolumineszenz die Metabolite Glukose, ATP und Laktat gemessen. Der mittlere Laktatgehalt von Xenotransplantaten humaner Kopf-Hals-Tumoren sollte ermittelt und mit den in Dresden erhobenen strahlenbiologischen Daten, insbesondere der TCD_{50} , aber auch der durch Pimonidazol bestimmten hypoxischen Fraktion, in Bezug gesetzt werden. Die Tumoren wurden immunhistochemisch bezüglich des Anteils an Mäusgewebe charakterisiert, ebenfalls immunhistochemisch wurde der Hypoxiemarker Carboanhydrase IX nachgewiesen. Durch Korrelationsanalysen sollte weiterhin ein Zusammenhang zwischen dem Laktatgehalt und der mRNA Expression der Glykolyseenzyme PFK-1 und LDH, sowie dem Glukosetransporter GLUT1 erforscht werden. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem Expressionsgrad des Proteins LDH-A und der mittleren Laktatkonzentration bzw. dem *ldh-a* mRNA Transkriptionsniveau in den Tumorbiopsien besteht. Die Ergebnisse sollen einen Hinweis darauf geben, ob es Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern gibt, die diagnostisch und therapeutisch genutzt werden können.

2 Material und Methode

2.1 Tumormaterial

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche und Analysen wurden an rasch tiefgefrorenen (flüssiger Stickstoff) Schnittpräparaten aus humanen, xenotransplantierten Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region durchgeführt, die von der Technischen Universität Dresden (Arbeitsgruppe Professor Dr. Michael Baumann) zur Verfügung gestellt wurden.

Für die PCR-Analysen wurden rasch kryofixierte Humanbiopsien von HNSCC Tumoren aus der Klinik zum Vergleich mitgeführt. Die Daten für diese Proben finden sich in Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1: TNM-Status der fünf in den PCR-Analysen verwendeten Humanbiopsien

Probe	I	II	III	IV	V
T	1	4	2	4	2
N	0	2	2	2	0
M	0	0	0	0	0

2.2 Herkunft und Entnahme der Tumorbiopsien

Tumormodelle

Für die gesamte Versuchsreihe wurden 7 humane Plattenepithelkarzinomzelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich verwendet, die in Tabelle 2.2 aufgelistet sind.

Die UT-SCC-Linien wurden im Labor von Dr. Grénman direkt aus primärem Tumorgewebe in der Zellkultur etabliert. FaDu_{DD} ist eine in Dresden kultivierte Sublinie der Zelllinie FaDu (ATCC: HTB-43). Die weiteren Tumorlinien wurden käuflich erworben: XF354 vom Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg und SAS von der Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resources Bank.

Versuchstiere

Die 7-14 Wochen alten NMRI (nu/nu) Mäuse stammen aus der SPF-Zucht des Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät der TU Dresden. Sie wurden bei 26 °C, einem 12stündigem Tag-Nacht-Rhythmus sowie einer Luftfeuchtigkeit von 60 % gehalten. Die Tiere wurden 2 Tage vor Transplantation zur weiteren Immunsuppression mit 4 Gy (200 kV; 0,5 mm Cu; 1,3 Gy/min) ganzkörperbestrahlt. Für die Durchführung der Experimente lag eine Tierversuchsgenehmigung des Regierungspräsidiums Dresden vor.

Eine Stunde vor Tumorentnahme wurde den Tieren der Hypoxiemarker Pimonidazol, sowie der Perfusionsmarker Hoechst 33342 injiziert.

Transplantationsgenerationen

Die *in vivo*-Etablierung begann mit Injektionen von 10^7 suspendierten Zellen in die Achselhöhle von drei Tieren. Aus den entstehenden Tumoren wurde der Tumor mit der medianen Wachstumsgeschwindigkeit subkutan auf die Rücken von 15 weiteren Tieren transplantiert. Von diesen Tumoren wurden 3-4 mit mittlerer Wachstumsgeschwindigkeit als kleine Tumorstückchen in flüssigem Stickstoff eingefroren (Cryostock). Später wurde ein Teil der Tumorstückchen wieder aufgetaut und subkutan auf die Rücken von 5 weiteren Nacktmäusen transplantiert (Generation Cryo I). Daran schloss sich die subkutane Transplantation eines Cryo I-Tumors mittlerer Wachstumsgeschwindigkeit auf das Hinterbein von 10 weiteren Tieren (Generation Cryo II) an. Diese waren die Spendertiere für die Tumoren der Hypoxiestudien.

Tabelle 2.2: Auflistung aller in dieser Arbeit bearbeiteten humanen Tumorlinien, VDT = Volumenverdopplungszeit, DNA-Index: beschreibt G0/G1-Verhältnis und Aneuploidie, Exp. = Experimentbezeichnung

Tumor	Herkunft	Histologie	VDT (Tage)	DNA-Index	LDH-Isoenzymmuster	Exp.
FaDu	Hypopharynx Primärtumor	Grade IV	3,5 (2,7 – 5,3)	$1,6 \pm 0,1$	Human	N 77
UT-SCC-15	Zunge Primärtumor	Grade I	4,2 (3,1 – 7,2)	$1,9 \pm 0,1$	Human	N 78
UT-SCC-14	Zunge rekurrenter Primärtumor	Grade II	4,2 (3,1 – 7,2)	$1,6 \pm 0,1$	Human	N 82
XF354	Mundboden LK-Metastase	Grade I	8,5 (3,7 – 11,5)	$1,7 \pm 0,1$	Human	N 89
UT-SCC-5	Zunge Metastase	Grade II	6,9 (3,5 – 9,6)	$1,4 \pm 0,1$	Human	N 91
SAS	Zunge Primärtumor	Grade IV	3,7 (2,6 – 6,2)	$1,6 \pm 0,1$	Human	N 94
UT-SCC-45	Mundboden Persistierter Primärtumor	Grade II	6,6 (4,4 – 11,3)	$1,9 \pm 0,3$	Human	N 95

Entnahme

Direkt nach der zügigen chirurgischen Tumorentfernung wurde dieser in flüssigen Stickstoff überführt und dann durchweg bei weniger als -20 °C aufbewahrt. Der Versand des Probenmaterials erfolgte bei konstanten -70 °C auf Trockeneis.

2.3 Strahlenbiologische Charakterisierung der Tumorlinien

Die strahlenbiologische Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Tumorlinien erfolgte bei dem Kooperationspartner in Dresden.

Hierzu gehört die Bestimmung (1) der radiobiologisch hypoxischen Fraktion (rHF), (2) der über Pimonidazol-Markierung bestimmten hypoxischen Fraktion (pHF) und (3) die Tumor-Kontroll-Dosis-50 % (TCD₅₀: tumor control dose).

Alle Untersuchungen wurden im Labor von Professor Dr. Baumann durchgeführt.

2.3.1 Bestimmung der radiobiologisch hypoxischen Fraktion (rHF)

Die rHF gibt den relativen Anteil radiobiologisch hypoxischer und somit besonders radiore-sistenter klonogener Tumorzellen an der Gesamtzahl vitaler Zellen an. Die rHF ist der einzige verfügbare funktionelle Parameter zur Quantifizierung hypoxischer klonogener Tumorzellen. Zur Bestimmung der rHF wurden Tumoren bei einem Durchmesser von 7 mm zum einen unter ambientem und zum anderen bei abgeklemmtem Blutfluss bestrahlt (200 kV, 0,5 mm Cu, $\sim 1,1\text{ Gy/min}$). Das werktägliche Bestrahlen mit insgesamt 30 Fraktionen in sechs Wochen mit graduierten Gesamtdosen von 30-100 Gy unter ambienten Bedingungen diente der Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber einer fraktionierten Bestrahlung.

Experimenteller Endpunkt ist der Status der lokalen Tumorkontrolle 120 Tage nach letzter Bestrahlung. Die Auswertung erfolgte über ein Poisson-basiertes Modell nach MOULDER & ROCKWELL (1984).

2.3.2 Bestimmung der hypoxischen Fraktion durch Pimonidazol-Färbung

Pimonidazol ist ein Hypoxiemarker, der sich irreversibel bei pO_2 Werten $<10\text{ mm Hg}$ intrazellulär anreichert und immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Dabei wird in Tumoren meist die hypoxische Fraktion (Pimonidazol-HF, pHF) als der immunhistochemisch positive Flächenanteil (%) des Tumorschnittes bestimmt. Die Pimonidazol-Färbung und Auswertung mittels computergestützter Bildanalyse erfolgte nach einem standardisierten Protokoll und wurde von Frau Yaromina aus der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Baumann durchgeführt.

2.3.3 Bestimmung der TCD₅₀

Die TCD₅₀ wird definiert als die Strahlendosis, die notwendig ist um 50 % der bestrahlten Tumoren lokal zu entfernen. Die erfolgreiche therapeutische Entfernung eines Tumors wird als Tumorkontrolle bezeichnet. Die TCD₅₀ ergibt sich aus der intrinsischen Strahlenempfindlichkeit hypoxisch klonogener Zellen (D_0), der Gesamtzahl klonogener Zellen (N) und der rHF nach der folgenden Formel:

$$TCD_{50} = D_0 \times [\ln(N \times rHF) + 0,366] \text{ (Gy)}$$

Modellparameter wurden mittels Maximum Likelihood Analyse ermittelt. Die Bootstrap-Technik diente zur Bestimmung der 95 % Vertrauensbereiche. Alle Berechnungen erfolgten mit der STATA/SE 8.0 software (STATA Corporation, College Station, TX, USA).

2.4 Bearbeitung der Tumorproben

Alle Tumorproben wurden nach einem strikten Protokoll im Gefriermikrotom (HM 500 OM, Microm, Walldorf) bei -20 °C geschnitten. Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über ein solches Schnittprotokoll. Das Einbettmedium Tissue Tek (Hartenstein, Würzburg) diente zum Aufblocken der Tumoren. Unmittelbar vor dem Schneiden wurden mit Hilfe einer Biopsiegabel zwei kleine Löcher im Abstand von 2 mm in den Tumor gestochen. Diese Maßnahme erleichtert die spätere Auswertung der durchgeführten Färbungen und Metabolitnachweise an Parallelschnitten, bei denen digitale Bilder dieser Schnitte mit einer Software exakt überlagert werden müssen und durch die Doppellöcher besser zur Deckung gebracht werden können.

Von jeder Tumorlinie wurden 10 bis 12 Tumorproben geschnitten. Für PCR-Untersuchungen war es notwendig, die Tumorkappe abzutrennen und anschließend in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) bei -80 °C aufzubewahren. Jeder Tumor wurde in sieben bzw. fünf Segmente aufgeteilt und es folgte die Anfertigung von 16 Gefrierschnitten unterschiedlicher Dicke aus jedem Segment. Mainz erhielt aus jedem Segment sieben (aus dem letzten neun) Schnitte für unterschiedliche Anwendungen. Die übrigen Schnitte wurden von den Kooperationspartnern Dresden und München für weitere Versuche verwendet (s. Tabelle 2.3). Die Schnitte für die Biolumineszenz wurden auf Deckgläschen (60 x 24 mm) aufgenommen und bis auf den Schnitt für die Glukosemessung durch Auflegen auf eine Heizplatte (10 min, 100 °C) hitzefixiert.

Tabelle 2.3: Schnittprotokoll für die Aufarbeitung von Biopsien

Segmente 1-7 (bzw. 5)			
Nr.	Schnittdicke (µm)	Partner	Verwendung
1	10	Dresden	Pimonidazol-, CD31-, HOECHST-Färbung
2	10	München	
3	10	München	
4	10	München	
5	10	München	
6	10	München	
7	10		Reserveschnitt
8	10		Reserveschnitt
9	10		Reserveschnitt
10	10	Mainz	Anti-HIF-1 α -Färbung oder Anti-GLUT1 Färbung
11	10	Mainz	Carboanhydrase IX-Färbung
12	10	Mainz	Anti-Maus-Färbung
13	10	Mainz	H/E-Färbung
14	16	Mainz	Glukose-Messung
15	16	Mainz	ATP-Messung
16	16	Mainz	Laktat-Messung
Segment 8 (bzw. 6)			
1	10	Dresden	Pimonidazol-, CD31-, HOECHST-Färbung
2	10	Mainz	H/E-Färbung
3	20	Mainz	Pyruvat-Messung (durchgeführt von U. Sattler)

2.5 (Immun-) Histologie

Das Verfahren der bildgebenden Biolumineszenz erlaubt es, Gewebeschnitte regional auszuwerten. Von besonderem Interesse ist vitales, humanes Tumorgewebe. Nekrotische, keratinisierte, zystische oder anders geartete non-vitale Areale und jegliches Mausgewebe ist deshalb von der Auswertung auszuschließen. Um diese Bereiche zu erkennen und zu definieren, bedienen wir uns der Hämalaun-Eosin- und der Anti-Maus-Färbung.

2.5.1 Hämalaun-Eosin Färbung an Gefrierschnitten (H/E)

Aus jedem Segment eines jeden Tumors wurde ein Schnitt einer Hämalaun-Eosinfärbung unterzogen. Mayers saures Hämalaun (Roth, Karlsruhe) ist ein positiv geladener Farblack, der an die negativ geladenen Phosphatgruppen von DNA und RNA bindet und eine intensiv blaue Färbung hervorruft. Eosin (Merck, Darmstadt) hingegen verbindet sich mit Gewebeproteinen und bewirkt eine karmesin- bis scharlachrote Anfärbung des Cytoplasmas. Die Färbung begann mit der 5minütigen Fixierung der Schnitte in Aceton (Roth) und dem anschließenden Trocknen für etwa 10 Minuten. Nach einer Inkubation von 2,5 min in Hämalaun wurden die Schnitte 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Daran schloss sich das Eintauchen der Schnitte für 15 s in Eosin (1 %ig angesäuert mit Eisessig, Roth) an. Das Eosin musste in drei Portionen A. dest. abgespült werden, bevor die Schnitte in einer aufsteigenden Isopropanolreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %; Theo Seulberger, Karlsruhe) entwässert werden konnten. Danach wurden die Schnitte jeweils 5 min in 100 %iges Isopropanol und drei Portionen Xylol (Roth) getaucht. Das Eindecken mit Entellan (Merck) oder Roti-Histokitt (Roth) beendete die H/E-Färbung.

2.5.2 Anti-Maus-Färbung (AM)

Der dem H/E gefärbten Schnitt unmittelbar benachbarte Gefrierschnitt wurde einer Anti-Maus-Färbung unterzogen. Hierbei wird Mausgewebe, wie Haut, Stroma und auch in den Tumor eingewanderte Abwehrzellen spezifisch über eine direkte Antikörper-Färbung angezeigt. Die Schnitte mussten vor der Färbung 10 min in Aceton (Roth) fixiert werden. Danach wurden die Schnitte mit einem Fettstift (Dako, Hamburg) umrandet.

Die Färbung erfolgte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Eine Inkubation mit H₂O₂ (Sigma, Taufkirchen; 20 µl H₂O₂ 30 %ig + 600 µl PBS + 400 µl Methanol; Roth) für 20 min diente dem Blockieren endogener Peroxidasen. In drei Portionen PBS-Tween20 (0,1 %ig) wurde gespült, bevor die Inkubation mit dem Rabbit Anti-Maus IgG Antikörper (Sigma, 1:100 mit PBS und 1 % Magermilchpulver verdünnt) für 1 h erfolgte. Anschließend wurde in zwei frischen Portionen PBS-Tween20 gespült. Es folgte die Inkubation mit DAB+ (Dako)

für 5 min mit dem darauf folgenden Spülen in PBS, Leitungswasser und A. dest.. In Mayers saurem Hämalaun wurden die Schnitte für die Gegenfärbung 3 min eingetaucht und anschließend 5 min in fließendem Leitungswasser gebläut. Danach schloss sich die Entwässerung in einer aufsteigenden Isopropanolreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) und die Inkubation in 100 %igem Isopropanol und drei Portionen Xylol für jeweils 5 min an. Zum Eindecken der Schnitte wurde Entellan oder Roti-Histokitt verwendet.

2.5.3 Anti-Carboanhydrase IX-Färbung (CA IX)

Die immunhistologische Detektion der Carboanhydrase IX wurde von Herrn Dr. Arnulf Mayer und Frau Beate Köhler aus der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Peter Vaupel (Universität Mainz) durchgeführt. Der erste Schritt bestand darin, die getrockneten Schnitte für 10 min in -20 °C-kaltem Aceton zu fixieren. Daran schloss sich die Inkubation mit dem Primärantikörper Rabbit anti CA IX (Abcam, UK) in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS für 1 h und 37 °C an. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Goat anti rabbit (Vector, USA) in einer Verdünnung von 1:300 in PBS für 1 h und 37 °C. Die Entwicklung erfolgte mit DAB+, anschließend wurde in einer aufsteigenden Isopropanolreihe entwässert und mit Eukitt (Fluka, Taufkirchen) eingedeckt.

2.6 Bildgebende Biolumineszenz: Messen der Metabolitkonzentrationen

2.6.1 Die Biolumineszenzreaktionen

Das Prinzip der Messung von Stoffkonzentrationen durch die Biolumineszenz beruht auf der chemischen Reaktion von lichterzeugenden Enzymen, so genannten Luziferasen. Diese Enzyme emittieren Photonen, sobald sie mit dem entsprechenden Intermediat in Kontakt geraten. Die Intensität der Lichtemission ist dabei innerhalb eines bestimmten Reaktionsabschnittes proportional zu der Konzentration des nachzuweisenden Intermediates.

In unserem Fall wurden Laktat, Glukose und ATP nachgewiesen. Um Glukose und Laktat nachzuweisen, sind mehrere Enzyme notwendig. Die Luziferase (Roche) und die zugehörige Oxidoreduktase (Roche) stammen bei diesem Nachweis aus dem Meeresbakterium *Photobacterium fischeri*. Die Reaktionen sind in Abbildung 2.1 dargestellt. Die Oxidoreduktase katalysiert einen Elektronentransfer von $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ auf FMN. Die Luziferase katalysiert die Oxidation von FMNH_2 und einem langkettige Aldehyd unter Aussenden von Licht.

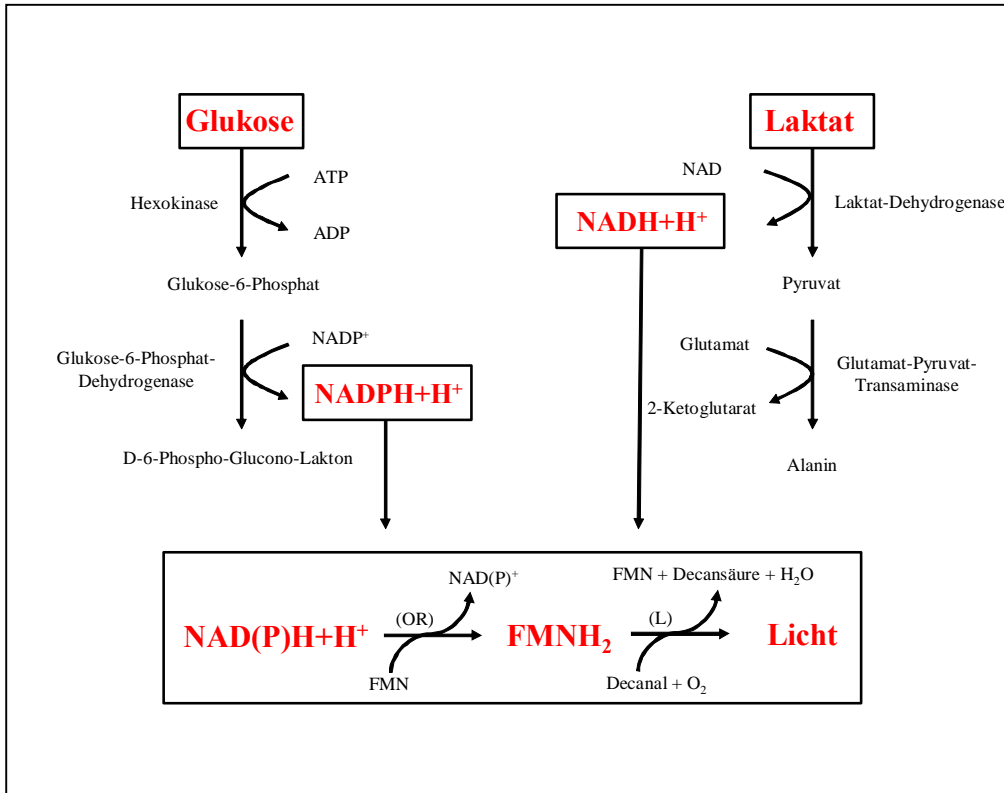


Abbildung 2.1: Die enzymatischen Reaktionen für den Nachweis von Glukose und Laktat. Es werden die Koenzyme NADPH aus Glukose und NADH aus Laktat erzeugt, die als Substrate für die eigentliche Lumineszenzreaktion dienen. OR = Oxidoreduktase, L = Luziferase

Für den Nachweis von ATP verwendet man die Luziferase (Roche, Mannheim) aus der amerikanischen Leuchtkäferart *Photinus pyralis*, die ATP unter Beteiligung von Luziferin direkt in eine Lichtreaktion umsetzt. Abbildung 2.2 zeigt die Photonenemission nach folgendem Prinzip:

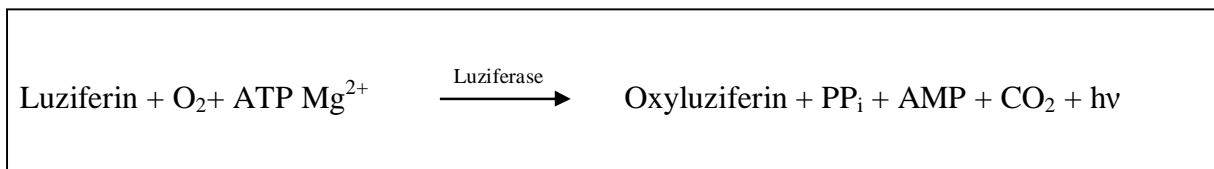


Abbildung 2.2: Nachweisreaktion von ATP

2.6.2 Zusammensetzung der Enzymlösungen

Das Ansetzen der einzelnen Enzymlösungen erfolgte auf Eis. Darüber hinaus ist zügiges Arbeiten empfohlen, damit die zugefügten Enzyme so wenig Aktivität wie möglich verlieren.

Nachweis von ATP

In einem Handmörser wurden 5 g gefriergetrocknete Leuchtkäferabdomen (Sigma) zu einem feinen Puder zerrieben und in 100 ml Puffer (0,2 M Hepes, Roth; 0,1 M Natriumarsenat, pH 7,6) aufgenommen. Unter Eiskühlung folgte das Zermahlen der Suspension im Gewebemogenisator (B. Braun Melsungen) und das Zentrifugieren für 10 min bei 4 °C und 2000 U/min (Megafuge 1,0 R, Heraeus, Rotornr. 2252). Dem abgenommenen Überstand wurden dann 200 µl einer 1molaren MgCl₂-Lösung zugesetzt. Die fertige Lösung musste aliquotiert und bei -70 °C gelagert werden. Vor Gebrauch ist ein erneutes Zentrifugieren von 30 s bei Maximalgeschwindigkeit (Zentrifuge 3200, Eppendorf) notwendig.

Nachweis von Laktat

Die Zusammensetzung der Enzymlösung ist in Tabelle 2.4 aufgeführt. Es ist erforderlich zunächst einen „Mini-Ansatz“ zum Testen der Qualität der Enzymlösung anzusetzen. Dazu wurde das Gesamtvolumen der Lösung angesetzt, ohne die Enzyme für die Lichtreaktion zuzugeben. In 1/8 dieses Volumens wurde die entsprechende Menge der Enzyme Luziferase und Oxidoreduktase gegeben (entspricht je einer Verpackungseinheit). Eine Testmessung erfolgte mit einem Standardschnitt. Ist die Lichtemission zufriedenstellend, werden die restlichen Enzyme und der Testansatz zur Grundlösung gegeben. Die fertige Lösung wird daraufhin aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Tabelle 2.4: Biochemikalien für den Laktatnachweis. Der Ansatz erfolgte in 0,1 M Phosphatpuffer mit 50 mM Glutamat bei pH 7,0

Substanz	Endkonzentration
NAD	160 mM
DTT (1,4-Dithiotreitol-Lösung)	0,5 mM
FMN	0,4 mM
Decanal in Methanol	0,5 mM
Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)	67 U/ml
Laktat-Dehydrogenase (LDH)	460 U/ml
Luziferase	15 mU/ml
NADP-FMN-Oxidoreduktase	8 U/ml

Nachweis von Glukose

Die Zusammensetzung der Enzymlösung ist in Tabelle 2.5 aufgeführt. Auch für die Glukose-Enzymlösung diente das Ansetzen eines „Mini-Ansatzes“ zum Testen. Nach erfolgreichem Test wurde die Lösung fertig gestellt, aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Tabelle 2.5: Biochemikalien für den Glukosenachweis. Der Ansatz erfolgte in 0,3 M Phosphatpuffer bei pH 7,0

Substanz	Enkonzentration
ATP	100 mM
NADP	75 mM
MgCl ₂	8 mM
DTT (1,4-Dithiotreitol-Lösung)	0,5 mM
FMN-Lösung	0,4 mM
Decanal in Methanol	0,5 mM
Hexokinase (HK)	44 U/ml
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)	55 U/ml
Luziferase	13 mU/ml
NADP-FMN-Oxidoreduktase	8 U/ml

2.6.3 Registrierung der Lichtemission

Abbildung 2.3 zeigt schematisch die Methode der bildgebenden Biolumineszenz. Kryoschnitte aus Tumorbiopsien werden auf ein Deckglas überführt. Der Gewebeschnitt wird in eine Enzymlösung getaucht, die sich in einer Vertiefung einer Messform befindet (1). Das so entstandene „Sandwich“ überführt man anschließend in eine thermostatisierte Kammer, die auf dem Objektisch eines Mikroskops befestigt ist (2). Die einsetzende Lichtemission wird über ein Mikroskop mit einer hochempfindlichen Videokamera aufgenommen. Das Videosystem ist in der Lage, einzelne Photonen mit hoher Ortsauflösung zu registrieren. Als Ergebnis (3) wird die flächenhafte Verteilung der Metabolitkonzentration im Gewebeschnitt erhalten.

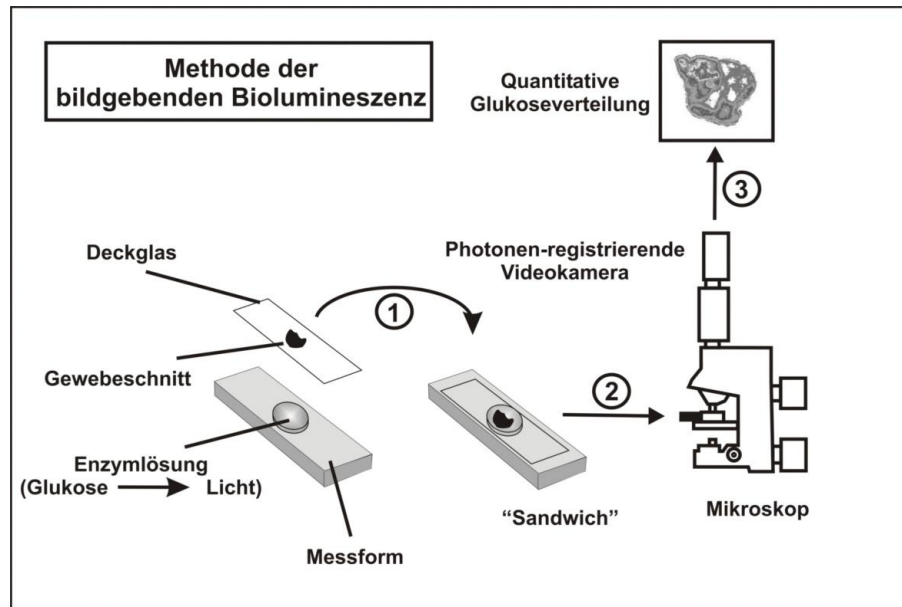


Abbildung 2.3: Schema der Methode der bildgebenden Biolumineszenz, (Schritte 1,2 und drei, siehe Text)

2.6.4 Kalibrierung der Biolumineszenzreaktionen

Die Intensität der Lichtemission aus den Gewebeschnitten ist unmittelbar abhängig von der lokalen Metabolitkonzentration. Die gewonnenen Bilder der Intensitätsverteilungen lassen sich unter Verwendung von Gewebestandards mit definierter Konzentration kalibrieren. Von ATP, Laktat und Glukose mussten dazu 4fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt werden. Dazu sollten dieselben Pufferlösungen verwendet werden, die bereits der Anfertigung der Enzymlösungen dienten. Die Stammlösungen wurden in einem Mischungsverhältnis von 1:3 mit dem Einbettmedium (Tissue Tek) gründlich vermengt. Das bei Raumtemperatur zähflüssige Einbettmedium erhärtet bei -20 °C. Das Anfertigen von Gefrierschnitten, die die gleiche Dicke haben müssen wie die Gewebeschnitte (16 µm), konnte nach dem Aufblocken und Erhitzen des Standards bei -20 °C erfolgen. Mit dem Enzymgemisch für den jeweiligen Metaboliten wurden diese Schnitte gemessen, und das entsprechende Biolumineszenzbild wurde densitometrisch ausgewertet, so dass Standardkurven erstellt werden konnten. Dazu wurden die mittleren Leuchtintensitäten der Standardschnitte als Funktion der Standardkonzentration graphisch aufgetragen und aus einer Regressionsanalyse der Datenpunkte eine mathematische Anpassungskurve berechnet. Dabei kam die Box-Lucas-Funktion ($y = a(1-b^x)$) zur Anwendung. Die Darstellung und Berechnung erfolgte mit der Graphik- und Statistiksoftware ORIGIN (Origin 7G). Mit Hilfe der genannten Funktion wurden nachfolgend die Intensitätsverteilungen der Schnitte der Tumorbiopsien in Konzentrationseinheiten umgerechnet

($\mu\text{mol/g}$). Es empfiehlt sich beim Messen der Tissue-Tek-Standards, mit der höchsten Konzentration zu beginnen, damit man die Kamerasensitivität festlegen kann. Diese schaltet sich nämlich bei maximaler Sensitivität bei zu hohen Leuchtintensitäten automatisch aus.

Eine Voraussetzung für eine exakte Kalibrierung der Intensitätsverteilung ist das Einhalten eines definierten Zeitschemas, da die Lichtemission einer bestimmten Kinetik folgt. Die Kinetik lässt sich mit der Steuersoftware für die Videoeinheit (Wasabi, Hamamatsu) erfassen. Dies wird mit jeder frisch hergestellten Enzymlösung an einem Standardschnitt durchgeführt. Aus dem resultierenden Profil lässt sich der beste Zeitpunkt für den Beginn der Messung (i. d. R. 30 s nach Kontakt von Schnitt und Lösung) und die Messdauer, abhängig von der Aktivität der aktuellen Enzymlösung, (i. d. R. weitere 60 -120 s) festlegen. Diese Zeiten werden für die nachfolgenden Messungen der Standards und der Tumorbiopsien genau eingehalten.

2.6.5 Messprotokoll

Die Biolumineszenzmessung läuft für alle drei Metabolite nach dem gleichen Protokoll ab: Nach Entnahme des Deckgläschens mit dem aufgenommenen Gefrierschnitt aus dem Kühlgerät (Slee, Mainz) wurde es für 2 s auf eine Heizplatte (IKA-Labortechnik, Staufen) von 100 °C gelegt. Das Deckgläschen wurde dann mit dem Gewebeschnitt nach unten auf die Reaktionskammer gelegt, so dass der Schnitt im Zentrum der Reaktionsmulde lag. An einer schmalen Kante wurde das Deckgläschen auf der Reaktionskammer mit einem Lochringverstärker aufgeklebt. Dadurch ist gewährleistet, dass sich das Deckgläschen zwar um die Klebestelle auf- und abwärts klappen lässt, dabei aber beim Aufliegen auf der Reaktionskammer seine exakte Position immer wieder findet. Die Kammer wurde in die Probenschublade gelegt, die in eine durch ein Wasserbad thermostatisierte (20 °C) Messkammer einzuschieben war. In diese Messkammer ragt das Objektiv (1,25x) des Mikroskops (Carl Zeiss AG, Oberkochen) hinein. Nach der Justierung der Kammer ins Zentrum des Objektivs folgte die Anfertigung einer Durchlichtaufnahme des Gewebeschnittes (Bild 1). Anschließend wurde die Probenschublade wieder entnommen, ohne die Messkammer zu verschieben, und das Deckgläschen wurde hochgeklappt. Von der jeweiligen Reaktionslösung gab man 60 μl in die Messmulde. Dann konnte das Deckgläschen vorsichtig heruntergelassen werden, so dass der Schnitt Kontakt mit der Enzymlösung bekam, ohne dass sich Luftblasen bildeten. Daraufhin wurde die Schublade zügig zurück in die Messkammer geschoben. Sobald der Schnitt in die Lösung tauchte, setzte die Zeitmessung ein. Nach der vorgegebenen Inkubationszeit wurde die Messung durchgeführt, die zum Intensitätsbild der Metabolitverteilung führt (Bild 2). Im Anschluss daran fertigte man ein weiteres Durchlichtbild (Bild 3) an. Die Bilder 1 und 3 dienen der nachfolgenden Zuordnung der Gewebestruktur zur Metabolitverteilung.

2.6.6 Biolumineszenz-Auswertung

Für die Analyse der Intensitätsverteilungen wurden die H/E- und Anti-Maus-gefärbten Parallelschnitte benötigt. Eine an das Mikroskop angeschlossene Digitalkamera (Nikon D100, Düsseldorf) ermöglichte das Fotografieren dieser Schnitte. Nachfolgend wurden die Bilder der Schnitte in der Software Photoshop (Adobe V 6,0) durch drehen und stauchen bzw. strecken so verändert, dass ihre Konturen mit der des Durchlichtbildes, welches vor der Biolumineszenzmessung aufgenommen worden war (Bild 1), übereinstimmten. Daraufhin war es möglich, eine digitale Maske anzufertigen, die lediglich das auszuwertende vitale Tumorgewebe umschloss. Da es sich bei den Kryoschnitten für die einzelnen Metabolitmessungen um Parallelschnitte handelte, reichte das Erstellen einer Maske für die Auswertung von allen drei Metabolitbildern. In dem Shareware Programm ImageJ musste man diese Maske umfahren, um sie auf das Biolumineszenzbild übertragen zu können. Diese Software berechnete aus den innerhalb der Maske liegenden Pixelwerten eine Häufigkeitsverteilung der Intensitätswerte für jedes Bild. Für jeden Metaboliten wurden die aus den sieben (bzw. fünf) Segmenten stammenden Intensitätsverteilungen schließlich zu einer Verteilung zusammengefasst („Summenhistogramm“). Aus diesem Histogramm wurden mit der Software MS Excel (Microsoft) unter Berücksichtigung der Kalibrierung die mittlere und mediane Konzentration ($\mu\text{mol/g}$), sowie als Streuungsparameter die Standardabweichung (SD), die 10 %- und 90 % Perzentile und die Minimal- und Maximalwerte errechnet.

2.7 Real Time RT-PCR: Messen der mRNA-Expression

Um die Expression bestimmter Gene zu quantifizieren, wurde das Verfahren der real time RT-PCR eingesetzt.

Die RT-PCR unterscheidet sich von der konventionellen PCR dadurch, dass das transkriptionelle Niveau quantitativ untersucht wird. Nach Abbau genomischer DNA durch DNase (RNase-Free DNase Set; Qiagen, Hilden) und anschließender RNA-Extraktion wird von der RNA eine komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Daran schließt sich die eigentliche PCR an. Um die RNA vor ubiquitär vorkommenden RNAsen zu schützen, wurden alle benötigten Puffer und Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser (Sigma) angesetzt.

2.7.1 Tumor-Lyse und RNA-Extraktion

Um die RNA aus Tumorgewebe zu extrahieren, wurde ein tiefgefrorenes Gewebestückchen mit einem Plastikstößel in einem Reaktionsgefäß unter permanenter Stickstoffkühlung zu einem feinen Pulver zerrieben. Nachdem der Stickstoff verdampft war, bestand der zweite

Schritt darin, sofort 300 µl des zuvor mit β-Mercaptoethanol (Sigma) 1:100 versetzten Lyse-puffers des RNeasy-Mini-Kits (Qiagen) hinzu zu geben. Das Lysat ruhte dann jeweils für ca. 10 min bei Raumtemperatur, um zum Homogenisieren mehrmals durch eine 23 G-Kanüle (B. Braun) gezogen zu werden. Anschließend überführte man das Homogenat auf eine Qiashredder-Säule (Qiagen), die man 15 s bei 13.000 U/min zentrifugierte (alle Zentrifugationsschritte in der Biofuge 15, Heraeus). Nach Versetzen des Filtrats mit 300 µl 70 %igem Ethanol (Roth) und mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde es auf eine Silica-Membran (mini-Säule) gebracht und 15 s bei 13.000 U/min zentrifugiert. Dabei bindet die RNA spezifisch an diese Membran. Auf das Verwerfen des Eluats folgte ein Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer und eine Zentrifugation von 15 s bei 13.000 U/min. Das Eluat wurde erneut verworfen. 10 µl DNase I wurden mit 70 µl RDD Puffer vorsichtig vermischt (Bestandteile des RNase-Free DNase Sets von Qiagen) und direkt auf die Membran gegeben. Es folgte die Inkubation der Membran mit der DNase für 15 min. Anschließend folgte ein erneuter Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer. Danach wurde die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und es wurden zwei aufeinander folgende Waschschriffe mit jeweils 500 µl RPE-Puffer und anschließender Zentrifugation von 15 s bei 13.000 U/min durchgeführt. Das Zentrifugieren für 2 min bei Maximalgeschwindigkeit (15.000 U/min) dient dazu, die Membran zu trocknen. Das Eluat wurde jeweils verworfen. Die Mini-Säule wurde daraufhin in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 50 µl RNase freies Wasser für 1 min auf der Säule inkubiert. Es schloss sich eine erneute Zentrifugation für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit an. Dieser Schritt wiederholte sich noch einmal mit dem zuvor gewonnenen Eluat.

Die aromatischen Ringe der RNA-Basen haben ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 255-260 nm. Daher kann die gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ gemessene Absorption (OD) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz zur Bestimmung der Gesamt-RNA-Konzentration genutzt werden. Für die photometrische Messung (Perkin Elmer, Burladingen) wurde die Probe 1:50 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ verdünnt und eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Umrechnung erfolgte mit dem Mittelwert und dem Umrechnungsfaktor für RNA (40); (Sambrook et al. 1989). Die Berechnung der Konzentration lautet demnach:

$$\text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA } (\mu\text{g/ml})$$

Die Reinheit der RNA wird durch das Verhältnis $\text{OD}_{260/280}$ bestimmt. Dieses sollte bei ca. 1,8 liegen.

2.7.2 RNA-Formaldehyd-Gel

Um sicherzugehen, dass die RNA intakt und nicht durch RNAsen partiell abgebaut vorliegt, wurden die RNA-Lösungen auf einem 1 %igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Formaldehyd reagiert kovalent mit den Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin und verhindert so die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die zu einem veränderten Wanderungsverhalten im Gel führen können. Zwei diskrete Banden für die 28S und 18S rRNA in einem Intensitätsverhältnis von ca. 2:1 weisen auf eine intakte RNA hin. Die Banden werden durch den der Probe zugesetzten Interkalator Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Für die Herstellung eines 1 %igen Gels wurden 0,5 g Agarose (Roth) in 36 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ und 5 ml 10x MOPS-Puffer (Sigma) aufgenommen. Daraufhin folgte ein Aufkochen in der Mikrowelle. Nachdem die Lösung auf 60 °C abgekühlt war, gab man zügig 9 ml Formaldehyd (Fluka) dazu und goss die Mischung anschließend in eine Plastikgelkammer (Roth). Nach Erstarren wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer (Roth) eingesetzt.

Pro Geltasche wurden 2 µg RNA in 35 µl Gesamtvolumen aufgetragen. Das entsprechende RNA-Volumen wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ auf 7 µl aufgefüllt. Dann kamen 15 µl Formamid (Fluka), 5 µl Formaldehyd und 3 µl 10x MOPS-Puffer dazu. Es folgte die Denaturierung des Ansatzes für 15 min bei 65 °C im Thermocycler (Biometra, Göttingen), um etwaige Sekundärstrukturen aufzulösen. Um die Primärstruktur der RNA zu erhalten mussten die Proben danach sofort auf Eis gestellt werden. Die Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid (Roth) in einer Konzentration von 0,05 µg/ml schloss sich an, und nach 2 min Inkubation auf Eis fügte man 3 µl 10x RNA-Ladepuffer zu. Die gesamte Probe wurde vorsichtig in die Geltasche pipettiert. Zuvor füllte man die Elektrophoresekammer mit 1x MOPS Puffer, bis das Gel bedeckt war. Die Auftrennung folgte für ca. 90 min bei 60 V. Bei intakter RNA schließt sich die reverse Transkription (RT) an.

2.7.3 Reverse Transkription (RT)

Die reverse Transkription wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl unter Verwendung eines Synthesekits von ABGene im Thermocycler durchgeführt. Details dazu finden sich in Tabelle 2.6.

Tabelle 2.6: Reagenzien für den Reaktionsansatz der Reversen Transkription

Reagenz	Probenansatz	Negativkontrolle	Endkonzentration
RNA	2 µl	2 µl	200ng
Oligo dT	1 µl	1 µl	500 ng
H ₂ O _{DEPC}	9 µl	9 µl	
Gemisch für 5 min auf 70 °C erhitzen, danach sofort auf Eis stellen			
5x Puffer	4 µl	4 µl	
dNTP Mix	2 µl	2 µl	
<i>Reverse-iT</i> TM RTase Blend	1 µl	-	
DTT	1µl	1µl	
H ₂ O _{DEPC}	-	1µl	
Gemisch für 50 min bei 47 °C inkubieren, anschließend für 10 min auf 75 °C erhitzen, um die <i>Reverse-iT</i> TM RTase Blend zu inaktivieren			

Um sicherzugehen, dass die Lyse der DNA durch die DNase während der RNA-Extraktion vollständig erfolgt ist, wurde von jeder Probe zunächst eine Negativkontrolle angesetzt. Dieser Ansatz ist identisch mit dem Probenansatz, mit der Ausnahme, dass an Stelle des Enzyms H₂O_{DEPC} Wasser eingesetzt wird.

Nach dem Transkriptionsprogramm wurde anschließend zur Kontrolle ein semiquantitativer PCR-Ansatz mit geeigneten, getesteten Primern (Sigma) angesetzt, bei dem die Negativkontrolle als „Template“ diente, um zu überprüfen, ob Amplifikate, die von genomischer DNA oder anderen Kontaminationen herrühren können, während der PCR produziert wurden. Die Untersuchung erfolgte mittels eines Kontrollgels.

2.7.4 PCR und Agarose-Ethidiumbromid-Gel

Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Details dazu finden sich in Tabelle 2.7. Jede Negativprobe wurde in der PCR auf eine Teilsequenz von LDH-A getestet. Die PCR begann mit dem Erhitzen des Ansatzes in einem Thermocycler für 1 min auf 70 °C, um die Doppelbindung der eventuell vorhandenen DNA-Sequenzen zu lösen. Diese Phase bezeichnet man als Denaturierung. Bei dem so genannten Annealing, der Anlagerungsphase der Primer, wurde die Temperatur für 30 s auf 57,5 °C gesenkt (die Temperatur ist abhängig von den jeweiligen Primern und wird durch deren G/C-Gehalt bestimmt). Die Elongation, bei der die Taq-Polymerase (Promega, Mannheim) die einzelnen Basen komplementär

an die Einzelstränge knüpft, erfolgte für 60 s bei 72 °C. Diese drei Zyklen wiederholten sich 25 Mal. Anschließend wurde das PCR Produkt auf Eis aufbewahrt.

Tabelle 2.7: Reagenzien für den Reaktionsansatz für die semiquantitative RT-PCR

Reagenz	Probenansatz (1 x)	Konzentration
RT-Produkt (Template)	1 µl	
MgCl ₂	2,5 µl	25 mM
10x PCR-Puffer	2,5 µl	10x
Taq Polymerase	0,25 µl	
dNTPs	0,5 µl	10 mM
sense Primer (ldh-a)	1 µl	10 pM
antisense Primer (ldh-a)	1 µl	10 pM
H ₂ O	ad 25 µl	

Die verwendeten Primer wurden im Vorfeld ausgetestet und die entstandenen Amplifikate zur Sequenzierung gegeben, die bestätigte, dass es sich um die gewählte ldh-a Sequenz handelte.

Primersequenzen in 5' - 3' Richtung:

sense Primer: acaagcaggtggtgagag

antisense Primer: aaggttattgggggttttag

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Für ein 1,2 %iges Agarose-Ethidiumbromid-Gel wurden 600 mg Agarose in 50 ml 0,5x TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Wenn die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt ist, gibt man Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) hinzu. Das Gel wird in eine Plastikgelkammer gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit 0,5x TBE-Laufpuffer bedeckt. In jede Geltasche wurde 1 µl PCR-Produkt und 5 µl 6x Ladepuffer pipettiert. Eine separate Tasche belud man mit einem Größenstandard (Roth). Die Elektrophorese lief für ca. 20 min bei 160 V. Unter UV-Licht konnte anschließend überprüft werden, ob sich Banden zeigen. Ist das Ergebnis negativ, kann die reverse Transkription der eigentlichen Proben beginnen. Da für die Transkription Oligo dTs verwendet werden, die komplementär an die Poly(A)-Sequenz der mRNA binden, wird die im Anschluss gemessene cDNA Konzentration der mRNA Konzentration gleichgesetzt.

2.7.5 Konzentrationsbestimmung der cDNA

Die Konzentrationsbestimmung der cDNA erfolgte mit dem Interkalator Pico Green. Pico Green, das sich zwischen die Basenpaare doppelsträngiger DNA lagert, wird bei einer Wellenlänge von 502 nm angeregt und fluoresziert daraufhin bei einer Wellenlänge von 523 nm. Damit der Fluoreszenzintensität eine entsprechende Konzentration zugeordnet werden kann, muss man immer eine Standardreihe mitführen. Es wurden fünf Standardlösungen definierter Konzentration aus Kalbsthymus-DNA (Sigma) und 1x TE-Puffer hergestellt. Die cDNA wurde ebenfalls mit 1x TE-Puffer 1:75 bzw. 1:100 verdünnt. Jede Probe wurde auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht und in eine schwarze Mikrotiterplatte (Nunc) gegeben. Es folgt das Verdünnen der Pico Green Stammlösung (Invitrogen, Karlsruhe) mit 1x TE-Puffer auf 1:200. Zu jeder Probe in der Messplatte wurden zügig 100 µl Pico Green gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min können die Proben in einem geeigneten Fluorometer gemessen werden und die Konzentration anhand der Standardkurve ausgerechnet werden. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und anschließend mit dem Mittelwert gerechnet.

2.7.6 Real Time PCR

Um das Transkriptionsniveau ausgewählter Enzyme quantitativ zu bestimmen, bedient man sich der so genannten „Echt-Zeit-PCR“, der Real-Time-PCR. Wir haben uns für die hochspezifische TaqMan[®] Technologie entschieden. Das Funktionsprinzip besteht darin, dass zwischen die beiden Primer eine fluorogene Sonde eingefügt wird. Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszeinderivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher Farbstoff (Rhodamit-Derivat) trägt. Wird die Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter Farbstoffs wegen des Quenchers durch Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde gemeinsam mit den Primern an den Matrizenstrang. In der Elongationsphase trifft die DNA Taq Polymerase auf die Sonde. Die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase schneidet den Reporter Farbstoff von der Sonde und durch die so erfolgte räumliche Trennung zum Quencher kann nun ein Signal aufgezeichnet werden. Das Signal ist strikt sequenzspezifisch, da nicht 100 %ig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden, bevor die Exonukleaseaktivität der Polymerase aktiviert wird.

Für die zu amplifizierenden Gene wurden kommerziell erhältliche Sonden-Primer-Gemische (Assays on demand) und fertige TaqMan[®] Mastermixe (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Der so genannte Mastermix enthält alle Komponenten, die für eine PCR erforder-

lich sind. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, sowie eine Negativkontrolle für jedes Gen. Das Probenansatzvolumen betrug 25 μ l. Für die Auswertung bedienen wir uns der relativen Quantifizierung und wählten die $\Delta\Delta C_T$ Methode. Als endogene Kontrolle (Haushaltsgen) diente das konstitutiv exprimierte hmbs (Hydroxy-Methyl-Bilane-Synthase), als Kalibrator eine cDNA aus FaDu-Zellen.

2.7.6.1 Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung beschreibt die Expressionsänderung des Zielgens relativ zu einem Kalibrator. Der Kalibrator ist eine Basisprobe für vergleichende Ergebnisse und läuft mit den Zielgenprimern. Die relative Quantifizierung kann auf zweierlei Wegen berechnet werden:

1. Relative Standardkurven-Methode:

Für diese Methode muss eine cDNA-Standardkurve definierter Konzentrationen angefertigt werden, anhand der dann die Ausgangskonzentration berechnet werden kann

2. Vergleichende C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$):

Diese ist nur möglich, wenn zuvor nachgewiesen wurde, dass Zielgen und endogene Kontrolle (HMBS) die gleiche Amplifikationseffizienz aufweisen. Dies wurde für alle drei Zielgene ausgetestet und bestätigt.

Wir haben uns für die vergleichende C_T -Methode entschieden, da durch den Verzicht auf eine Standardkurve Pipettierfehler vermieden werden, Probenmaterial gespart wird und mehr Proben in einem PCR-Lauf getestet werden können.

2.7.6.2 Validierungsexperiment und vergleichende C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$)

Der Test verläuft für alle drei Zielgene gleichermaßen:

Zunächst musste von der cDNA für die Zielgene, und für die der endogenen Kontrolle eine Verdünnungsreihe über 5-6 Zehnerpotenzen erstellt werden. Für jede Verdünnungsstufe der Proben und für den Kalibrator wurden jeweils der mittlere C_T -Wert sowie deren mittlerer ΔC_T -Wert berechnet. Die Formel für Letzteres lautet:

$$\Delta C_T = C_T\text{-Wert Zielgen} - C_T\text{-Wert endogene Kontrolle}$$

Um die Effizienzen der Gene zu vergleichen, wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe gegen den C_T -Wert aufgetragen. Die Geradensteigung ist ein Maß für die Effi-

izienz der PCR. Berechnet man für jeden Punkt der beiden Geraden den ΔC_T -Wert, so bleibt dieser konstant. Dies resultiert aus der Parallelität der Geraden, bedingt durch die gleich hohe PCR-Effizienz. Abbildung 2.4a verdeutlicht diesen Zusammenhang. In Abbildung 2.4b erkennt man, dass bei unterschiedlicher Steigung und somit unterschiedlicher PCR-Effizienz der beiden Gene der ΔC_T -Wert nicht konstant bleibt und in diesem Fall die vergleichende C_T -Methode nicht angewendet werden kann.

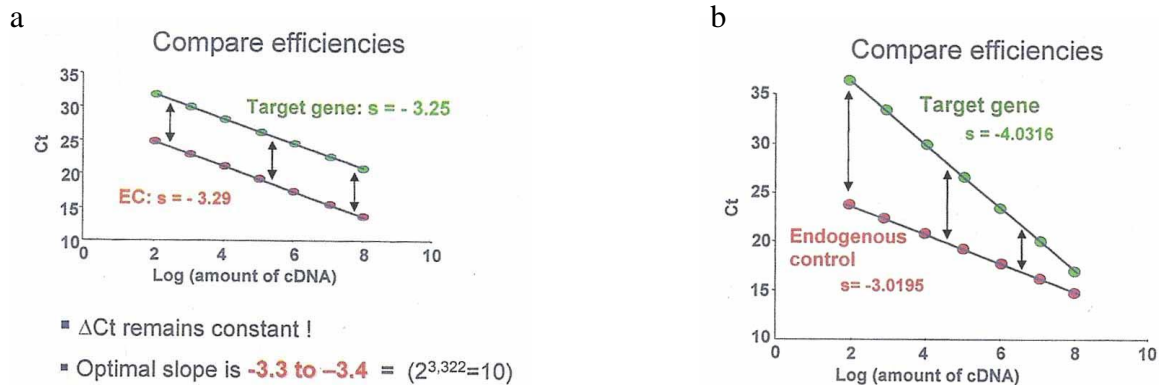


Abbildung 2.4: Vergleich der PCR Effizienzen zweier Gene. Die vergleichende C_T -Methode kann angewendet werden, wenn die Geraden beider Gene parallel und die PCR-Effizienz somit gleich hoch ist (Quelle: Handbuch des Basic Real-Time PCR Training Course von Applied Biosystems).

Im Falle gleich starker PCR-Effizienzen trägt man nun für die $\Delta\Delta C_T$ -Methode den dekadischen Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den errechneten ΔC_T -Wert auf. Die Steigung der resultierenden Kurve muss zwischen 0,1 und -0,1 liegen, damit diese Methode angewendet werden kann. Bei einer Steigung innerhalb dieser Größenordnung ist gewährleistet, dass die Effizienzen der Ziel- und Haushaltsgenamplifikationen nahezu gleich sind.

Für den $\Delta\Delta C_T$ -Wert zieht man nun von dem ΔC_T -Wert des Zielgens den ΔC_T -Wert des Kalibrators ab. Dieser Wert wird in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt. Man erhält eine Aussage über das Verhältnis von der mRNA des Zielgens relativ zum Kalibrator.

2.8 SDS-PAGE und Western Blot: Messen des Proteingehalts

Will man aus einem Gewebehomogenat den Gehalt eines zellulären Proteins messen und anschließend verschiedene Proben miteinander vergleichen, ist es notwendig die Proben bezüglich der Zellzahl anzugleichen, die je nach Probenausgangsmenge sehr unterschiedlich sein kann. Als Marker für Schwankungen in der Zellzahl und zum Normalisieren der Proben wurde als Ladekontrolle das Haushaltsgen Tubulin gewählt, das konstitutiv exprimiert wird. Mit dem Ziel sowohl bezüglich des Zellanteils als auch unter verschiedenen Gelläufen eine Ver-

gleichbarkeit unter den Proben zu gewährleisten, wurde des weiteren bei jedem Gellauf zusätzlich ein Kalibrator, ein Proteinlysate aus FaDu-Zellen eingesetzt.

Wir bedienen uns des Multi-Blot Systems von Odyssey (Li-Cor, Bad Homburg), das es uns erlaubt, zwei unterschiedliche Proteine gleichzeitig auf einem Blot nachzuweisen. Dabei werden zwei Primärantikörper (anti-LDH-A und anti-Tubulin), die aus unterschiedlichen Ursprungsorganismen stammen, eingesetzt. Die Sekundärantikörper sollten aus demselben Organismus stammen, sich aber in ihrem gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff unterscheiden.

Die Probengewinnung aus Gewebebiopsien, sowie die Konzentrationsbestimmungen der Proteinlysate wurden von Dr. Christine Bayer der Münchner Arbeitsgruppe (Professor Dr. Molls) durchgeführt, die sie auf Trockeneis nach Mainz schickte.

Protokoll aus München: Die Probengewinnung begann mit dem Zermörsern eines gefrorenen Tumorstückchens und der Zugabe von 1 ml PBS-T zu dem entstandenen Pulver. Die Suspension wurde für 16 h bei 4 °C im Automaten geschüttelt und anschließend bei 10.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -70 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben erfolgte mit dem BCA™ Protein Assay Kit der Firma PIERCE nach Anleitung des Herstellers.

Durch die Gelelektrophorese werden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Proteine werden durch SDS negativ geladen und wandern so im elektrischen Feld zur Anode. Die Proteine wandern durch ein weitporiges Sammelgel (5 %) und anschließend durch ein 10 %iges Trenngel. Tabelle 2.8 gibt Informationen über den Gelansatz.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung für ein SDS-Gel

Reagenz	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
A. dest	2,1 ml	1,9 ml
Rotiphoresegel 30	0,5 ml	1,7 ml
1,5 M Tris-Cl (pH 8,8)	-	1,3 ml
1 M Tris-Cl (pH 6,8)	380 µl	-
10 % SDS	30 µl	50 µl
10 % Ammoniumpersulfat	30 µl	50 µl
Temed	3 µl	2 µl

Für die Elektrophorese wurden 2,5 µg Protein in einem Endvolumen von 10 µl inklusive 5 µl Ladepuffer (Laemmli) zunächst bei 95 °C im Thermocycler denaturiert und anschließend mit einer Hamiltonspritze (Hamilton, Martinsried) in die Geltaschen pipettiert. Zum Größenvergleich wurden 3 µl eines Proteinmarkers (PeqLab, Erlangen) ebenfalls in eine Geltasche gegeben. Die Elektrophorese erfolgte mittels des Mini Protean II™ Systems (Biorad, München) in 1x Gellaufpuffer für 45 min bei einer Spannung von 200 V und 120 mA.

Beim Western Blot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld gelöst und auf eine Membran transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten.

Vor dem Transfer wurden das Gel und die PVDF-Membran (Polyvinylidene difluoride microporous membrane; Millipore, Schwalbach) für 15-20 min in Transferpuffer äquilibriert, und zwei Whatman Filter-Papiere (VWR, Darmstadt) wurden mit Transferpuffer getränkt. Nun schloss sich das nacheinander folgende Auflegen eines Whatman Filters, der Membran, des Gels und des zweiten Whatman-Filters luftblasenfrei übereinander auf die Anode der Blotkammer (Biorad) an. Nach Schließen der Kammer mit dem Kathodendeckel erfolgte der Transfer der Proteine und des Markers für 20 min bei 15 V und 275 mA.

Nach dem Transfer müssen zunächst die freien Bindungsstellen der Membran blockiert werden. Dazu wurde die Membran für 1 h in 40 ml eines Blocking Reagenz (Rockland, USA), nach dessen 1:3-Verdünnung mit PBS, eingelegt. Daraufhin erfolgte für 1 h die Inkubation der Membran mit den beiden Primärantikörpern (1:1000 in Blocking Reagenz + PBS-T (0,1 %) verdünnt), eingeschweißt in einer Plastikfolie. Danach musste die Membran 3x für 5 min in 1x PBS-T (1x PBS mit 0,1 % Tween) gewaschen werden, bevor die Inkubation der Sekundärantikörper (1:10.000 in Blocking Reagenz + PBS-T + 0.01 % SDS verdünnt) folgen konnte. Details zu den Antikörpern finden sich in Tabelle 2.9. Die Inkubation erfolgte in einem verschließbaren lichtundurchlässigen Behälter für 30 min auf einem Schüttler (Janke & Kunkel, Stauffen) in einem Volumen von 40 ml. Da die Sekundärantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, musste die Inkubation in einem lichtgeschützten Behältnis ablaufen. Auch die anschließenden Waschschrte (4x für 5 min in 1x PBS-T) mussten in diesen Behältern erfolgen. Die Membran kann bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4 °C in PBS aufbewahrt werden.

Tabelle 2.9: Auflistung aller für den Western Blot verwendeten, polyklonalen Antikörper

Firma	Herkunft	Gekoppelt mit	Primär/sekundär	Antigen	Fragmentgröße
Abcam	Schaf		primär	LDH M4	34 kDa
Invitrogen	Esel	Alexa 680	sekundär	Schaf IgG	
Abcam	Kaninchen		primär	Tubulin	ca. 51 kDa
Rockland	Esel	IRDye 800	sekundär	Kaninchen IgG	

Für die Auswertung dient das Infrarot-Analysesystem von Odyssey (Li-Cor). Durch zwei verschiedene Diodenlaser werden die Fluoreszenzfarbstoffe der Sekundärantikörper getrennt angeregt. Durch zwei Detektoren kann das jeweilige Fluoreszenzsignal von dem Gerät registriert und gescannt werden. Die beiden unabhängigen Detektionskanäle erlauben die gleichzeitige Aufzeichnung zwei verschiedener Proteinbanden auf derselben Membran.

Wird die Membran weiterhin vor Licht geschützt, bleiben die Fluoreszenzfarbstoffe bis zu einem Jahr stabil. Durch die Ladekontrolle Tubulin werden die Proben angeglichen und durch den Standard miteinander verrechnet. Dazu werden alle Intensitätswerte zunächst integriert, wobei das Hintergrundleuchten abgezogen wird. Dann werden alle Banden-Intensitätswerte, auch die des Kalibrators, durch den jeweiligen Intensitätswert von Tubulin dividiert und anschließend durch den Wert des Kalibrators. Die Formel lautet demnach folgendermaßen:

$$cP = ((IW_p - HG_p) / (IW_T - HG_T)) / (IW_K - HG_K)$$

wobei: cP: relative Proteinkonzentration, IW: Intensitätswert, HG: Hintergrund, P: Probe, K: Kalibrator, T: Tubulin

2.9 Statistik

Für die statistischen Datenanalysen kamen die Programme Excel (Microsoft Excel 2003, Microsoft Corporation, USA) und Origin (Origin 7G, Origin Lab Corporation, Northampton, USA) zum Einsatz. Mit Excel wurden die Daten der deskriptiven Statistik berechnet (Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimalwerte und Maximalwerte) sowie der t-Test. In Origin erfolgten die Regressionsanalysen und die Signifikanztests. Zur Beurteilung möglicher Korrelationen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman ermittelt. Ein Korrelationskoeffizient von über 0,7 wurde als Indiz für eine Korrelation angesehen, ein p-Wert von unter 0,05 wurde als signifikant betrachtet. Zur Bewertung der intra- und intertumoralen Heterogenität wurde der relative Variationskoeffizient berechnet, ebenfalls mit dem Softwareprogramm Excel. Alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beruhen auf Mehrfachbestimmungen.

3 Ergebnisse

3.1 Metabolitkonzentrationen

Die Methode der bildgebenden Biolumineszenz ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Metaboliten. Als Resultat erhält man ein digitales Abbild der Metabolitverteilung innerhalb eines Gewebeschnitts, wodurch eine direkte Zuordnung der Messwerte zu histologischen Gewebestrukturen ermöglicht wird. Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch Bilder zweier histologischer Schnitte, die zum einen einer Anti-Maus-Färbung und zum anderen einer HE-Färbung unterzogen worden sind. Die rote Auswertemaske der Anti-Maus-Färbung wird in einem Bildverarbeitungsprogramm mit der grünen Auswertemaske der HE-Färbung kombiniert. Das sich aus der Überlappung ergebende Areal dient als Maske für die Auswertung der Bilder der Biolumineszenzmessung. In Abbildung 3.2 sind exemplarisch mit Falschfarben kodierte Biolumineszenzbilder der Metabolite Glukose, ATP und Laktat dargestellt. Der letztlich auszuwertende Gewebebereich ist in Abbildung 3.3 am Beispiel des Laktatschnittes gezeigt. Jeder Farbe kann ein bestimmter Konzentrationsbereich ($\mu\text{mol/g}$) zugeordnet werden, die Tabelle dazu ist ebenfalls in Abbildung 3.3 gezeigt.

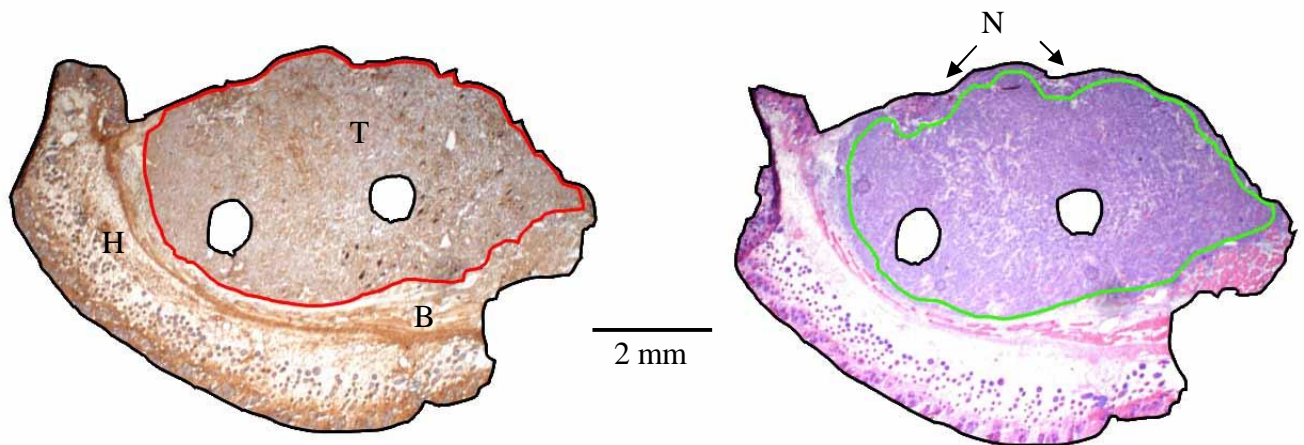


Abbildung 3.1: Parallelschnitte des Xenografts SAS0085_4. Die Anti-Maus-Färbung (linkes Bild) dient der Identifizierung von Mausgewebe, welches braun angefärbt ist. Man erkennt Tumor (T), Maushaut (H) und Maus-Bindegewebe (B); die beiden letzteren werden von der nachfolgenden Auswertung ausgeschlossen. Kleinere Bereiche von Mausgewebe innerhalb des Tumorgewebes können vernachlässigt werden. Damit ist es möglich eine Maske um das Tumorgewebe zu zeichnen (rot). Die H/E-Färbung (rechtes Bild) lässt Nekrosen (N) erkennen und erlaubt es eine Maske um das vitale Tumorgewebe zu legen (grün). Die Löcher stammen von einer Biopsiegabel, die vor dem Schneiden in das Gewebe gestochen wurde.

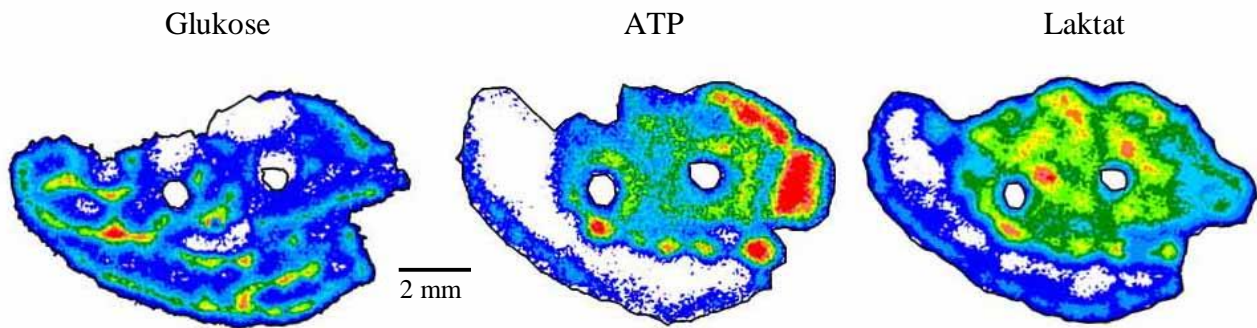


Abbildung 3.2: Den histologisch gefärbten Schnitten direkt angrenzende Parallelschnitte, die mit der Biolumineszenzmethode für Glukose, ATP und Laktat (von links nach rechts) aufgearbeitet wurden. Durch Falschfarben werden die jeweiligen Konzentrationsbereiche dargestellt.

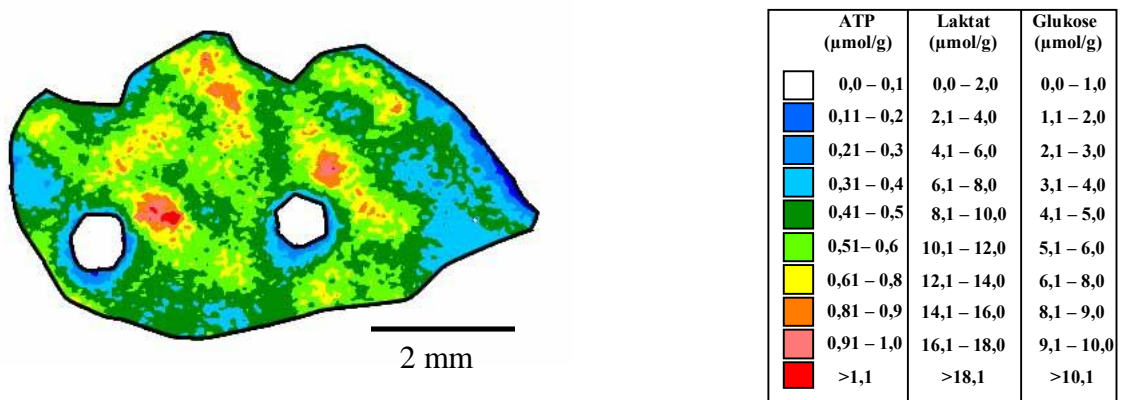


Abbildung 3.3: Das durch die Maske bestimmte, auszuwertende Areal des Laktatschnittes. Nur in diesem Bereich wird die Metabolitkonzentration bestimmt. Mausgewebe sowie non-vitales Tumorgewebe fällt aus der Auswertung heraus. Die Tabelle zeigt die Zuordnung der Konzentrationsbereiche zu den Falschfarben für den jeweiligen Metaboliten.

Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse der Messungen der Metabolikonzentrationen aller Tumorklinen zusammen. Die Anordnung der Daten erfolgt nach aufsteigendem Laktatgehalt.

Alle weiteren Abbildungen und Tabellen, in denen die verschiedenen Tumorklinen verglichen werden, behalten diese Sortierung bei. Es sind Mittelwerte, Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte, sowie der Median für alle untersuchten Tumorklinen aufgezeigt. Die Laktatkonzentrationen bewegen sich in einem Bereich zwischen $7,2 \mu\text{mol/g}$ und $25,9 \mu\text{mol/g}$. Die Glukosewerte reichen von $1,1 \mu\text{mol/g}$ bis $3,1 \mu\text{mol/g}$. ATP Konzentrationswerte liegen zwischen $0,8 \mu\text{mol/g}$ und $2,5 \mu\text{mol/g}$.

Tabelle 3.1: Statistische Daten der Metabolit-Konzentrationen aller untersuchten Xenografts und von Humanbiopsien einer anderen Studie, n: Anzahl gemessener Tumoren, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Min: Minimalwert, Max: Maximalwert, Med: Median

Tumorlinie	n	Laktat ($\mu\text{mol/g}$)				Glukose ($\mu\text{mol/g}$)				ATP ($\mu\text{mol/g}$)				
		MW \pm SD	Min	Max	Med	MW \pm SD	Min	Max	Med	n	MW \pm SD	Min	Max	Med
XF354	12	7,2 \pm 1,5	5,0	10,1	7,1	1,5 \pm 0,9	0,4	3,3	1,2	11	1,5 \pm 0,5	0,9	2,3	1,4
UT-SCC-14	11	12,6 \pm 2,5	7,3	15,4	12,4	3,0 \pm 1,4	0,5	5,5	3,1	11	2,0 \pm 0,5	1,3	2,9	1,9
UT-SCC-15	11	14,6 \pm 2,4	11,9	18,8	14,2	2,5 \pm 1,1	1,1	4,6	2,5	11	2,5 \pm 0,3	2,0	3,0	2,6
FaDu	12	16,9 \pm 2,4	13,0	20,9	17,1	1,1 \pm 0,8	0,4	2,7	0,8	12	1,4 \pm 0,7	0,3	2,6	1,6
SAS	12	17,2 \pm 3,8	12,4	26,4	16,3	2,1 \pm 0,9	0,8	3,8	2,3	12	0,8 \pm 0,3	0,3	1,1	1,8
UT-SCC-45	12	18,2 \pm 2,9	10,9	21,7	18,8	3,1 \pm 1,6	1,4	6,8	2,7	12	1,3 \pm 0,3	0,7	1,8	1,3
UT-SCC-5	13	25,9 \pm 3,9	18,1	30,5	27,5	1,6 \pm 0,4	1,1	2,2	1,6	13	1,5 \pm 0,5	0,7	2,0	1,6
klin. Biop.	50	9,7 \pm 5,0	1,2	20,3	9,0	1,8 \pm 1,0	0,1	3,7	1,7	50	1,1 \pm 0,5	0,2	2,1	1,0

3.1.1 Vergleich zwischen Xenografts und Humanbiopsien

Um die intertumorale Heterogenität zwischen den einzelnen Tumorlinien aufzuzeigen, wurden für jeden Metaboliten die Konzentrationswerte als Box & Whisker Plot dargestellt.

Die Zelllinien sind entsprechend ihres Laktatwerts in aufsteigender Reihenfolge aufgeführt, ATP und Glukose sind dieser Reihenfolge angepasst. Die Abbildungen 3.4, 3.5 und 3.6 zeigen die Konzentrationen der einzelnen Metabolite für jede Tumorlinie. Die Werte klinischer Biopsien aus vorangegangenen Studien (Schroeder 2002) sind zum Vergleich mit aufgeführt.

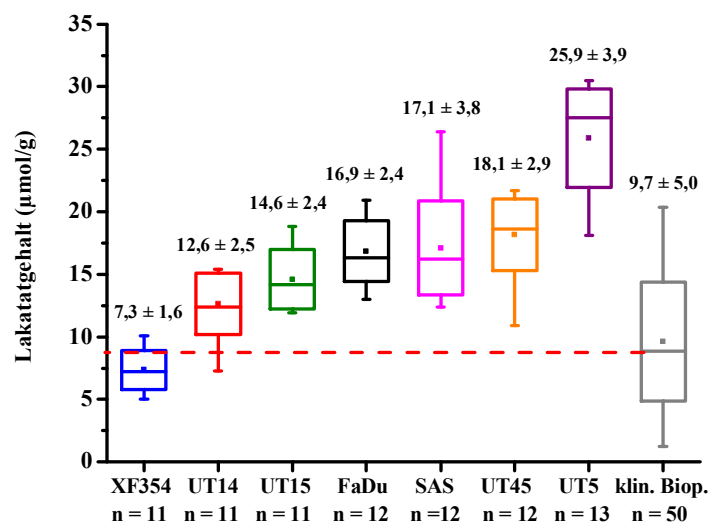


Abbildung 3.4: Laktatkonzentrationen ($\mu\text{mol/g}$) der xenotransplantierten Tumorlinien und von klinischen HNSCC-Tumorbiopsien. Die Zelllinien sind in aufsteigender Reihenfolge der Laktatkonzentration sortiert. Die rote Linie setzt am Median der klinischen Biopsien an und teilt die Tumoren in Hoch- und Niedriglaktattumoren ein (Box: SD, MW, MED; Whisker: Max, Min; Zahlenwerte: MW \pm SD).

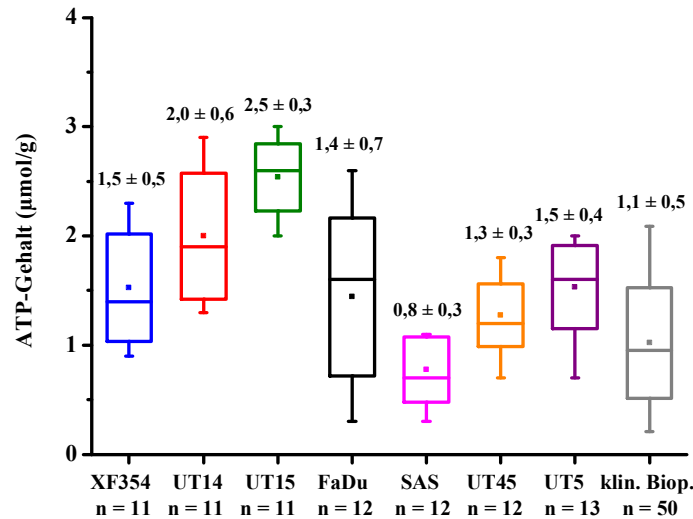


Abbildung 3.5: ATP-Konzentrationen ($\mu\text{mol/g}$) der xenotransplantierten Tumorlinien und von klinischen HNSCC-Tumorbiopsien. Siehe Legende in Abb. 3.4 für Details.

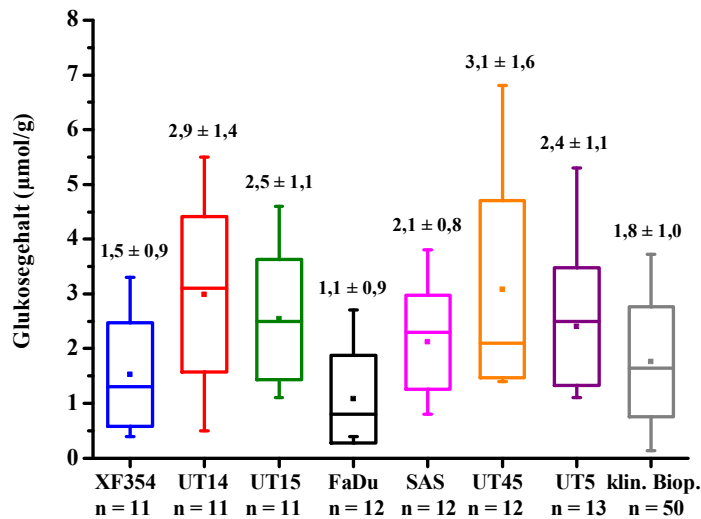


Abbildung 3.6: Glukosekonzentrationen ($\mu\text{mol/g}$) der xenotransplantierten Tumorlinien und von klinischen HNSCC-Tumorbiopsien. Siehe Legende in Abb. 3.4 für Details.

Der Box & Whisker Plot zeigt, dass die Werte der klinischen Biopsien, bis auf wenige Ausnahmen, unterhalb derer der Experimentaltumoren liegen. In vorangegangenen Studien (Walenta et al. 2000, Brizel et al. 2001) bediente man sich des Medians um Tumoren in Hoch- und Niedriglaktattumoren zu unterteilen. Vergleicht man den Laktatgehalt der Xenografts mit dem aus den klinischen Biopsien, wird deutlich, dass fast alle Experimentaltumoren in ihrem Laktatgehalt deutlich über dem Median der klinischen Biopsien liegen. Nimmt man auch hier diesen Median von ca. $9 \mu\text{mol/g}$ als Grenze an, müsste man alle Xenografts, mit Ausnahme von XF354, als Hochlaktattumoren einstufen.

Die Heterogenität der Metabolitverteilungen innerhalb einer Tumorlinie und zwischen den einzelnen Linien lässt sich durch die Mittelwerte und Standardabweichungen der Tumorlinien

bestimmen. Zum Vergleich der Variabilität von Verteilungen dient der von K. PEARSON eingeführte Variationkoeffizient V . Hier wurde der relative Variationskoeffizient V_r berechnet, der in Prozent angegeben wird. Tabelle 3.2 gibt diese Werte für die sieben Xenograft Linien und die klinischen Biopsien an.

Tabelle 3.2: Der relative Variationskoeffizient (%) der drei Metabolitkonzentrationen als prozentualer Anteil am Gesamtwert

Tumor	Laktat V_r (%)	ATP V_r (%)	Glukose V_r (%)
XF354	6	10	17
UT-SCC-14	6	8	14
UT-SCC-15	5	4	13
FaDu	4	14	21
SAS	6	11	12
UT-SCC-45	5	7	15
UT-SCC-5	4	6	7
klin. Biopsien	7	6	8

Es ist zu erkennen, dass innerhalb der Tumorlinien die Heterogenität für Glukose am höchsten liegt, während Laktat gleichmäßiger verteilt ist. Es fällt allerdings auf, dass die Heterogenität der Xenografts insgesamt höher ist als die der klinischen Biopsien, nur Laktat weist diesbezüglich in allen Xenografts niedrigere Werte auf. Glukose zeigt nicht nur die höchste Variation innerhalb einer Zelllinie sondern auch große Schwankungen der Prozentwerte zwischen den Zelllinien, während Laktat auch hier die geringste Heterogenität aufweist.

Ein t-Test zeigt, dass die Unterschiede zwischen den höchsten und niedrigsten Metabolitkonzentrationen zwischen den Tumorlinien bei allen drei Metaboliten signifikant ($p < 0,05$) sind. Ein Indiz für die starke Heterogenität innerhalb des gesamten Probenkollektivs.

3.1.2 Korrelationsanalysen der Metabolitkonzentrationen

Da Laktat im Allgemeinen als Endprodukt der anaeroben Glykolyse gilt, liegt die Vermutung nahe, dass ein Zusammenhang zwischen Glukose- und Laktatgehalt besteht. Um zu überprüfen, ob in den untersuchten Tumorlinien eine Korrelation der beiden Metabolite zu finden ist, wurde der Laktatgehalt als Funktion des Glukosegehaltes der Tumorlinien aufgetragen. Abbildung 3.7 zeigt die Mittelwerte der beiden Metabolite mit den Standardabweichungen für die Tumorlinien.

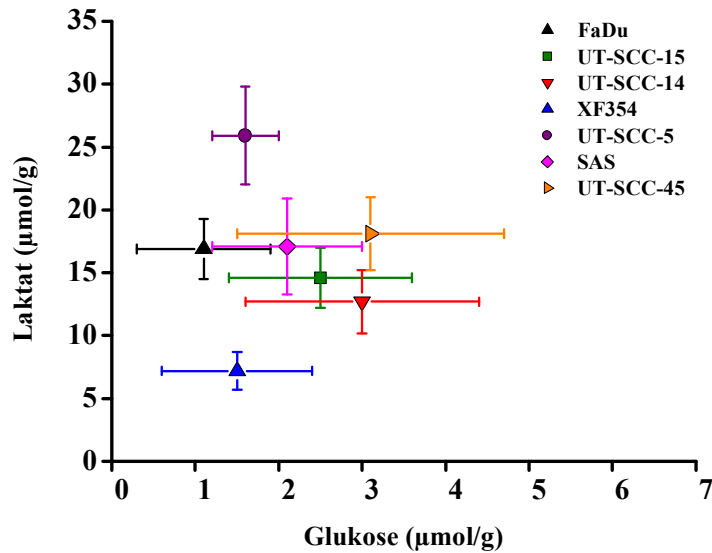


Abbildung 3.7: Die mittlere (\pm SD) Laktatkonzentration ($\mu\text{mol/g}$) ist als Funktion der mittleren (\pm SD) Glukosekonzentration ($\mu\text{mol/g}$) aufgetragen, um einen Zusammenhang zwischen den beiden Metaboliten Laktat und Glukose zu überprüfen. Bei den Tumoren deren Laktatgehalt über $8,99 \mu\text{mol/g}$ (Median der klin. Biopsien, s. Abb. 3.4) liegt, deutet sich eine inverse Korrelation an.

Im Gegensatz zu mehreren Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten, die eine inverse Korrelation zwischen Glukose und Laktat erkennen ließen (Walenta et al. 2004), ist hier kein eindeutiger Zusammenhang zu finden. Es deutet sich lediglich bei den Hochlaktattumoren eine schwache negative Korrelation an, die allerdings mit $p = 0,39$ und einem Korrelationskoeffizienten von $R = -0,43$ nicht signifikant ist. Korrelationen zwischen Laktat und ATP ($p = 0,56$; $R = -0,26$) oder Glukose und ATP ($p = 0,53$; $R = 0,29$) bestehen nicht (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Laktatwerte der Versuchstiere, denen nicht Pimonidazol und Hoechst 33342 injiziert wurde

Den Versuchstieren dieser Studie wurden eine Stunde vor Tumorentnahme der Hypoxiemarker Pimonidazol, sowie der Perfusionsmarker Hoechst 33342 injiziert. Von der Tumorklinie FaDu liegen die Daten der Laktatmessungen für drei Tumoren von Tieren vor, denen die beiden Marker nicht gespritzt worden sind. Diese Werte unterscheiden sich leicht voneinander. Abbildung 3.8 verdeutlicht diesen Unterschied, der aber nicht signifikant ist ($p = 0,16$).

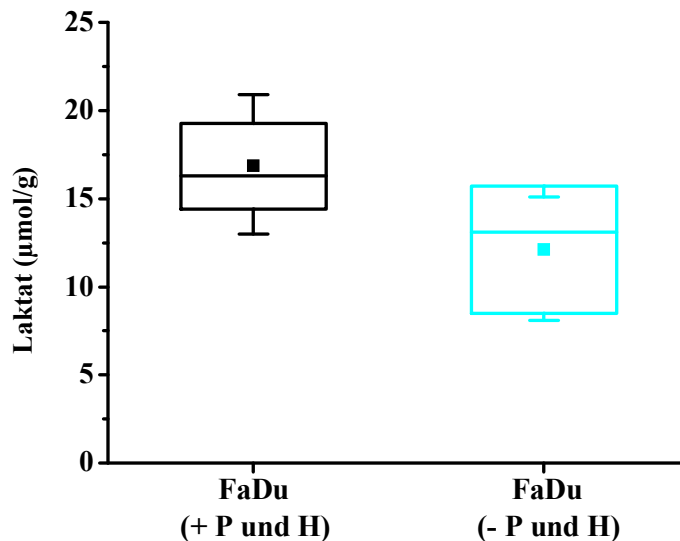


Abbildung 3.8: Unterschied im Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) der Tumoren mit injizierten Markern (+ P und H) und ohne injizierten Markern (- P und H). P: Pimonidazol, H: Hoechst 33342

3.2 Nachweis hypoxischer Gewebeareale

Die Anti-Carboanhydrase IX-Färbung wurde an Gefrierschnitten drei verschiedener Zelllinien durchgeführt. Abbildung 3.9 zeigt beispielhaft eine Färbung mit Ausschnittvergrößerung. Tabelle 3.3 stellt die Daten der CA IX-Färbung vor. Ausgewertet wurde jeweils der prozentuale Flächenanteil positiv gefärbter Zellen an der Gesamtfläche (Abbildung 3.10a). Der Gehalt an CA IX der drei Zelllinien ist erkennbar unterschiedlich. Die höchste Markierungsdichte findet sich bei UT-SCC-14, die niedrigste bei XF354.

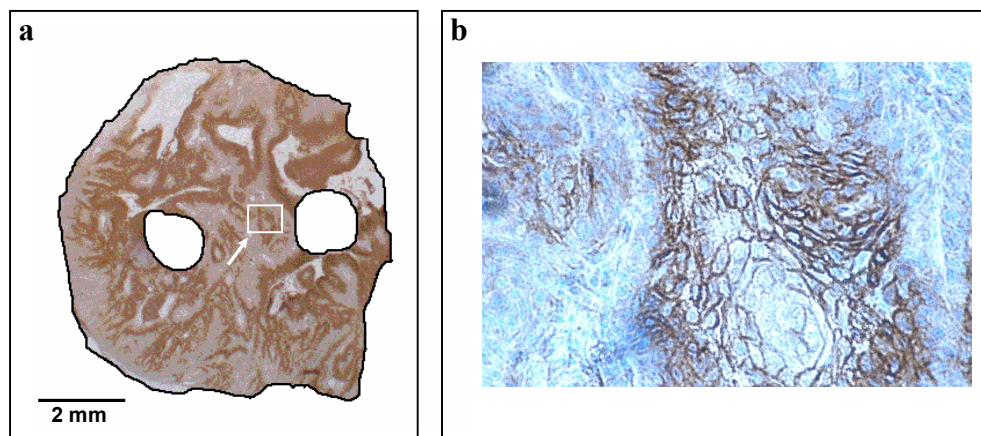


Abbildung 3.9: 3.9a zeigt einen CA IX-immunmarkierten Gesamtschnitt eines UT-SCC-14 Tumorenografts. Die Gegenfärbung erfolgte mit Mayers saurem Hämalaun. CA IX-positive Strukturen sind braun angefärbt. Mikroskopvergrößerung: 15fach. 3.9b zeigt eine Ausschnittvergrößerung, die die Anreicherung der CA IX in der Zellemembran veranschaulicht. Mikroskopvergrößerung: 400fach

Tabelle 3.3: Mittelwert und Standardabweichung (\pm SD) der CA IX-Flächenwerte der drei untersuchten Zelllinien.

Tumor	XF354	UT-SCC-14	UT-SCC-15
CA IX (%) (MW \pm SD)	6,5 \pm 2,9	57,0 \pm 10,7	31,5 \pm 5,1
Laktat (μ mol/g) (MW \pm SD)	6,6 \pm 1,4	13,1 \pm 4,1	13,8 \pm 3,3

Die ausgewerteten positiven Flächenanteile werden in Abbildung 3.10b mit dem Laktatgehalt der Zelllinien verglichen. Zwischen beiden Parametern besteht keine offensichtliche Korrelation. In Abbildung 3.10c ist die über eine Pimonidazol-Färbung ermittelte hypoxische Fraktion als relativer Anteil an der Gesamtfläche (%) der drei Tumorzelllinien dargestellt. Auch hier unterscheiden sich die drei Tumorzelllinien deutlich voneinander, allerdings weisen hier die XF354-Tumoren die stärkste und die UT-SCC-14 die schwächste Markierung auf.

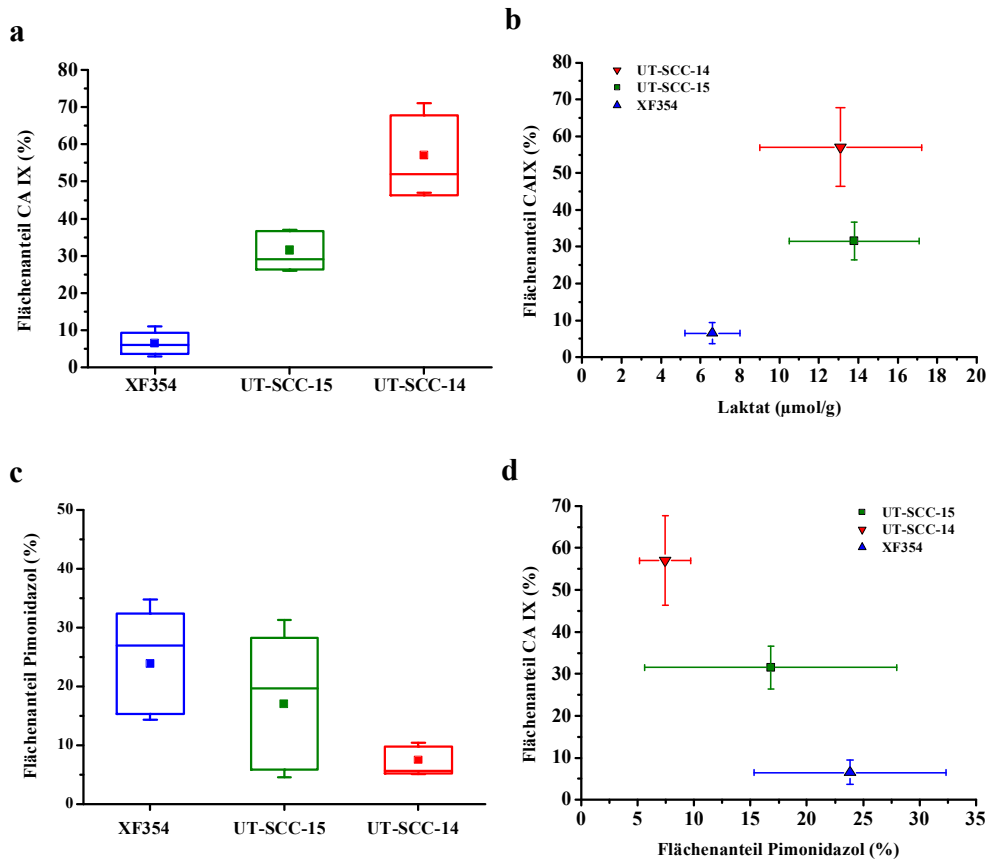


Abbildung 3.10: (a) CA IX positiver Flächenanteil (%) drei verschiedener Tumorzelllinien, (b) CA IX-Anteil (%) als Funktion von Laktat (μ mol/g), (c) Pimonidazol positiver Flächenanteil (%) der drei Tumorzelllinien, (d) Vergleich der beiden Hypoxiemarker CA IX (%) und Pimonidazol (%).

In Tabelle 3.4 und in Abbildung 3.11 sind die Mittelwerte der relativen Pimonidazolanteile, als Maß für die pimonidazoldefinierte-hypoxische Fraktion pHF und die der Laktatgehalte der sieben Tumorzelllinien aufgelistet bzw. gegeneinander aufgetragen. Es lässt sich ein positiver Trend zwischen beiden Parametern erkennen, insbesondere wenn der nach obiger Definition als Niedriglaktattumor eingestufte XF354 nicht berücksichtigt wird (siehe Abbildung 3.4). Mit einem $R = 0,94$ und einem $p < 0,05$ ist die entsprechende Korrelation dann auch signifikant.

Tabelle 3.4: Mittelwerte und Standardabweichung (\pm SD) der Pimonidazol-Flächenwerte der sieben untersuchten Zelllinien. pHF: durch Pimonidazol ermittelte hypoxische Fraktion der Tumorzelllinien

Tumor	XF354	UT-SCC-14	UT-SCC-15	FaDu	SAS	UT-SCC-45	UT-SCC-5
pHF (%) (MW \pm SD)	19,44 \pm 8,17	6,19 \pm 2,08	21,58 \pm 10,29	11,7 \pm 5,41	20,95 \pm 10,69	18,09 \pm 7,35	35,18 \pm 8,0
Laktat (μ mol/g) (MW \pm SD)	7,2 \pm 1,5	12,6 \pm 2,5	14,6 \pm 2,4	16,9 \pm 2,4	17,2 \pm 3,8	18,2 \pm 2,9	25,9 \pm 3,9

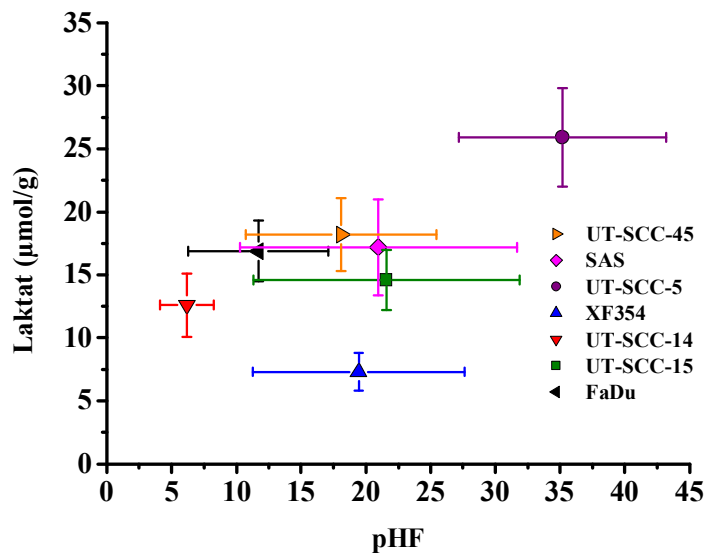


Abbildung 3.11: pHF (%) als Funktion der Laktatkonzentration (μ mol/g). Für die Hochlaktattumoren (Laktatkonzentration $> 8,99 \mu$ mol/g) besteht eine signifikante Korrelation zwischen Hypoxie und Laktatgehalt.

3.3 Expressionsanalysen mit der Real Time RT-PCR

3.3.1 Validierung der RNA-Extraktion und der Reversen Transkription

Die real time RT-PCR lässt quantitative Aussagen über das Transkriptionsniveau von Genen zu. Dieses Niveau definiert sich über die Menge an jeweils transkribierter mRNA, extrahiert aus den Tumorproben. Um die RNA vor ubiquitär vorkommenden RNAsen zu schützen, ist steriles Arbeiten unumgänglich. Es ist weiterhin unbedingt zu überprüfen, ob die aus den Tumorproben extrahierte RNA intakt ist. Dies wird mit einer RNA-Elektrophorese überprüft, in denen die 18S- und 28S-RNA getrennt dargestellt und ihr relativer Gehalt bestimmt werden kann (Abbildung 3.12). Bei intakter mRNA ergibt sich ein Verhältnis von 28S- zu 18S-RNA von 2 : 1. Dies war bei allen untersuchten Proben der Fall.

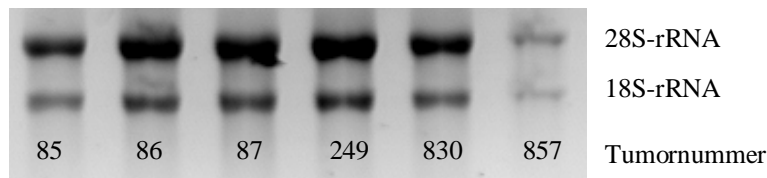


Abbildung 3.12: RNA-Gel von sechs Tumoren der Zelllinie SAS. Das Gel zeigt das typische Bandenmuster der ribosomalen 28- und 18S-rRNA. Bei intakter RNA steht die Bandenstärke in einem Verhältnis von 2:1 zu einander. Dies ist bei allen Tumoren der Fall, wie durch das hier gezeigte Muster exemplarisch veranschaulicht wird.

Während der RNA-Extraktion wird die DNA durch DNase zerstört, um ein Mitführen genomischer DNA in der PCR zu vermeiden, da dies das Ergebnis verfälschen würde. Um zu überprüfen, dass der DNA-Abbau vollständig erfolgt ist, wurden vor der Reversen Transkription sogenannte Negativkontrollen aller Proben durchgeführt. Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse der Negativproben der Reversen Transkription (minus-RT) durch semiquantitative PCR. Die untersuchten Proben zeigen im Vergleich zur Positivkontrolle (cDNA von SiHa-Zellen) keine Banden. Der durchgeführte DNA-Abbau war demnach erfolgreich. Das gezeigte Bild ist repräsentativ für alle während der Arbeit durchgeführten minus-RT Kontrollen.

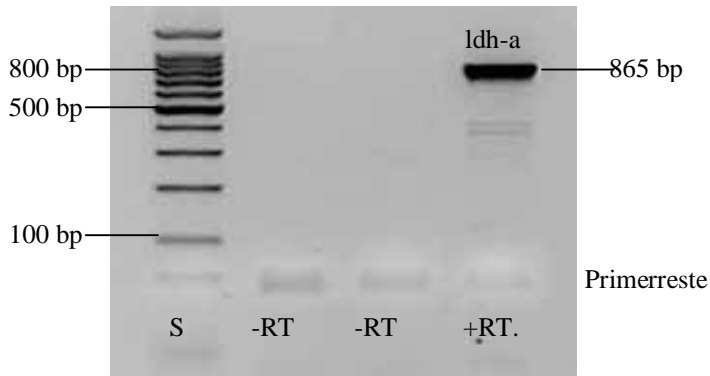


Abbildung 3.13: DNA-Gel der Negativproben der Reversen Transkription auf drei cDNA Proben. Die Positivkontrolle zeigt, dass die PCR erfolgreich verlaufen ist. Da die Negativproben keine Banden zeigen, ist sichergestellt, dass keine genomische DNA in den Proben vorhanden war. S: Standard, -RT: minus-RT, +RT: positiv-RT der PCR, bp: Basenpaare

3.3.2 Validierung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Die relative Quantifizierung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode setzt gleiche PCR-Effizienzen, definiert über den C_T -Wert, aller untersuchten Gene und des Haushaltsgens voraus. Dies wurde mit einer PCR-Analyse einer cDNA-Verdünnungsreihe über vier Verdünnungsstufen von 1:10 bis 1:10.000 überprüft. Der dekadische Logarithmus dieser Verdünnungsstufen wird gegen den ΔC_T -Wert des jeweiligen Gens aufgetragen, um zu überprüfen, ob die resultierende Steigung der Graphen zwischen 0,1 und -0,1 liegt. Abbildung 3.14 zeigt, dass dies bei allen drei Genen der Fall ist; somit ist die Methode valide, und die $\Delta\Delta C_T$ -Methode konnte für alle nachfolgenden Messungen und Berechnungen angewendet werden.

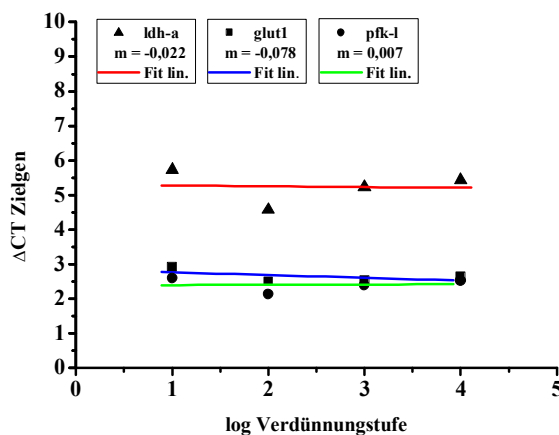


Abbildung 3.14: ΔC_T -Werte der Zielgene als Funktion der logarithmisch dargestellten Verdünnung. Die Geradensteigung muss im Bereich zwischen 0,1 und -0,1 liegen, damit die $\Delta\Delta C_T$ -Methode als Auswertungsmethode der relativen Quantifizierung verwendet werden darf. Dies ist bei allen drei Genen der Fall. R: Regressionskoeffizient, m: Geradensteigung

3.3.3 Genexpression der Tumorlinien

Die $\Delta\Delta C_T$ -Methode lässt eine quantitative Aussage über das Transkriptionsniveau der Zielgene zu. Durch den Vergleich mit klinischen Biopsien kann untersucht werden, ob die Transkriptionshöhe der Zielgene in Xenotransplantaten stark von denen in Humanbiopsien abweicht oder eher gleich ist. Die Ergebnisse werden nachfolgend mit den Metabolitkonzentrationen verglichen, um einen Zusammenhang zwischen Transkriptionslevel und Metabolitgehalt zu finden. Tabelle 3.6 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der real time RT-PCR.

Tabelle 3.5: Statistische Daten der relativen Expressionsstärken (bezogen auf den Kalibrator) der drei untersuchten Gene aller Zelllinien, n: Anzahl gemessener Tumoren, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Min: Minimalwert, Max: Maximalwert, Med: Median

Tumorlinie	n	glut1 (rel. Konz.)				ldh-a (rel. Konz.)				pfk-1 (rel. Konz.)			
		MW \pm SD	Min	Max	Med	MD \pm SD	Min	Max	Med	MW \pm SD	Min	Max	Med
XF354	10	1,2 \pm 0,9	0,4	2,7	0,9	1,4 \pm 0,9	0,1	3,3	1,1	0,5 \pm 0,5	0,1	1,5	0,2
UT-SCC-14	11	1,2 \pm 1,2	0,4	4,0	0,7	1,5 \pm 0,7	0,2	2,9	1,5	0,4 \pm 0,3	0,1	1,0	0,2
UT-SCC-15	10	3,7 \pm 2,0	0,3	7,1	3,7	5,2 \pm 3,2	2,1	10,3	4,1	2,8 \pm 1,7	0,3	6,6	2,5
FaDu	9	2,1 \pm 1,7	0,9	6,4	1,7	2,3 \pm 0,8	1,4	3,6	2,2	1,1 \pm 0,5	0,3	1,9	1,2
SAS	11	0,5 \pm 0,2	0,2	1,0	0,4	1,2 \pm 0,4	0,6	1,7	1,2	1,1 \pm 0,3	0,8	1,7	1,0
UT-SCC-45	11	1,5 \pm 0,5	1,0	2,2	1,3	1,0 \pm 0,3	0,7	1,7	0,9	0,9 \pm 0,4	0,3	1,8	0,9
UT-SCC-5	12	0,8 \pm 0,4	0,2	1,4	0,8	0,7 \pm 0,3	0,3	1,2	0,7	0,4 \pm 0,1	0,2	0,6	0,5
klin. Biopsien	5	1,3 \pm 1,1	0,5	3,3	1,0	1,1 \pm 0,6	0,4	1,7	1,1	1,4 \pm 0,7	0,9	2,6	1,0

Bei allen durchgeführten Messungen zeigte sich kein Signal bei den Proben der Negativkontrolle. Alle Tumorproben zeigten hingegen ein positives Signal, d. h. in jedem Fall wurde die entsprechende cDNA detektiert. Die Abbildungen 3.15 bis 3.17 zeigen die durch die $\Delta\Delta C_T$ -Methode bestimmten relativen Konzentrationen der drei in der real time RT-PCR nachgewiesenen Gene glut1, pfk-1 und ldh-a.

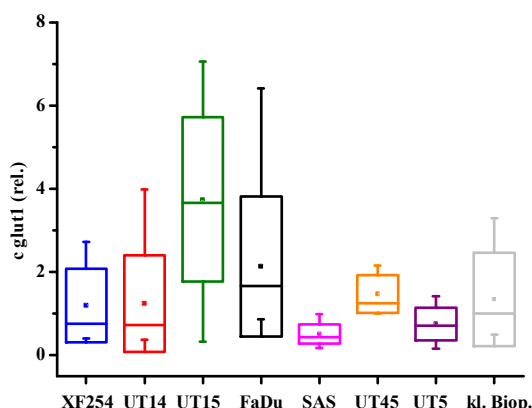


Abbildung 3.15: glut1-Expression (rel. Einheit) der sieben Tumorlinien und von klinischen Biopsien humaner HNSCC-Tumoren.

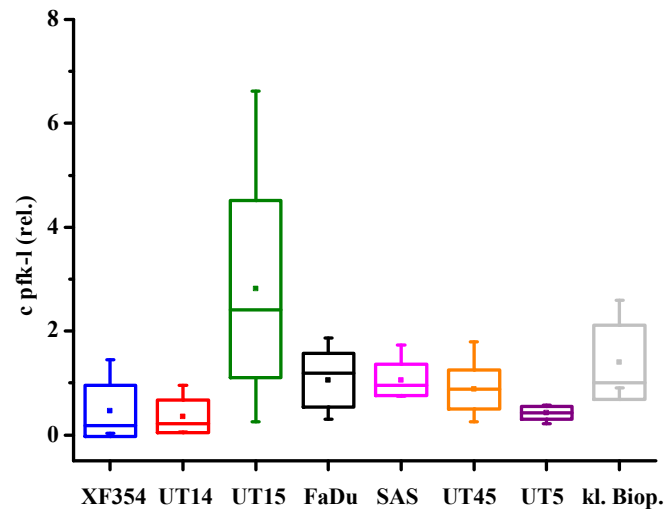


Abbildung 3.16: pfk-1-Expression (rel. Einheit) der sieben Tumorzelllinien und von klinischen Biopsien humaner HNSCC-Tumoren.

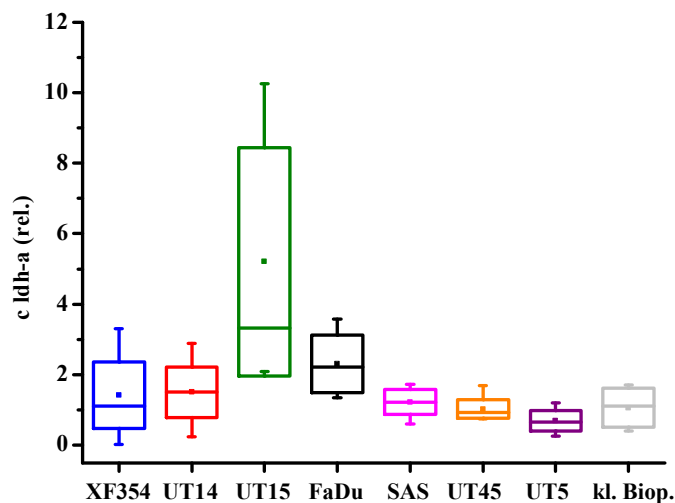


Abbildung 3.17: ldh-a-Expression (rel. Einheit) der sieben Tumorzelllinien und von klinischen Biopsien humaner HNSCC-Tumoren.

Die Tumorzelllinie UT-SCC-15 weist für alle drei Gene die höchsten Konzentrationen auf. Ebenso ist die Variationsbreite innerhalb dieser Linie, erkennbar an der Höhe der Standardabweichung, sehr hoch. Dagegen sind die Gehalte der ldh-a und der pfk-1 der anderen Zelllinien eher ähnlich. Einzig der mRNA-Gehalt von glut1 ist zwischen den Zelllinien deutlich unterschiedlich, ebenso dessen Variationsbreite innerhalb einzelner Tumorzelllinien erhöht. Die Konzentrationen der klinischen Biopsien liegt bei allen drei Genen im Bereich der Xenotransplantate, d. h. die Expressionsniveaus sind sehr ähnlich. Eine Koexpression der drei Gene wurde untersucht, und Abbildung 3.18 zeigt einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen glut1 und pfk-1. Andere Korrelationen traten nicht auf.

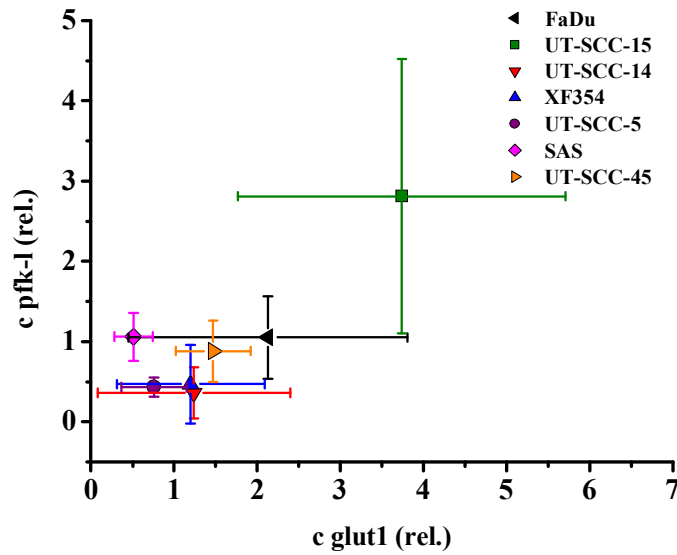


Abbildung 3.18: Koexpression der Gene glut1 und pfk-1. Es besteht eine signifikante positive Korrelation zwischen diesen beiden Genen ($R = 0,79$; $p < 0,05$).

3.3.5 Korrelationen zwischen den Metabolitkonzentrationen und der Genexpression

Die Metabolitkonzentrationen und die Werte der Genexpressionen der untersuchten Tumorzellen wurden einer Korrelationsanalyse unterworfen. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang. Allerdings ähneln sich die Expressionsmuster aller drei Gene hinsichtlich ihrer Verteilung. Exemplarisch zeigen die Abbildungen 3.19 bis 3.21 die Laktatkonzentrationen als Funktion der Expressionsstärken der drei untersuchten Gene.

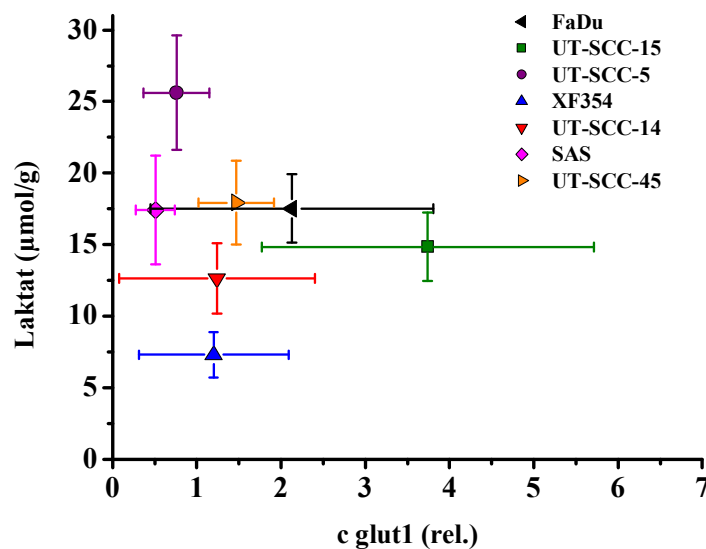


Abbildung 3.19: Laktat ($\mu\text{mol/g}$) als Funktion der glut1-mRNA (rel. Konzentration).

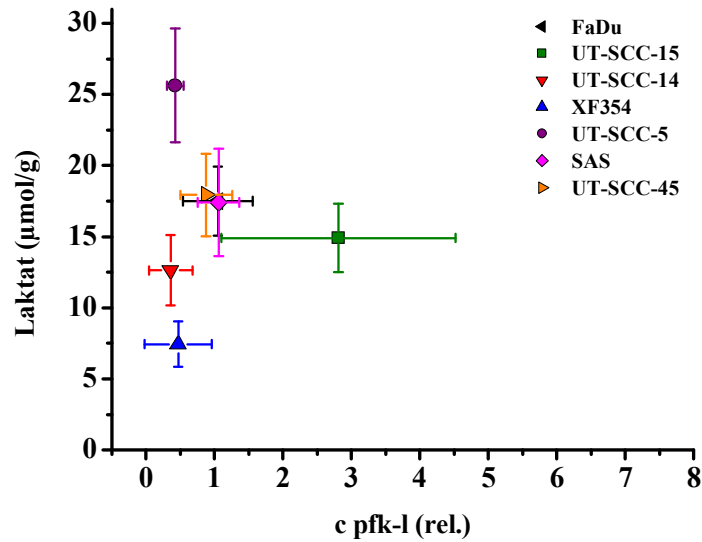


Abbildung 3.20: Laktat (µmol/g) als Funktion der pfk-1-mRNA (rel. Konzentration)

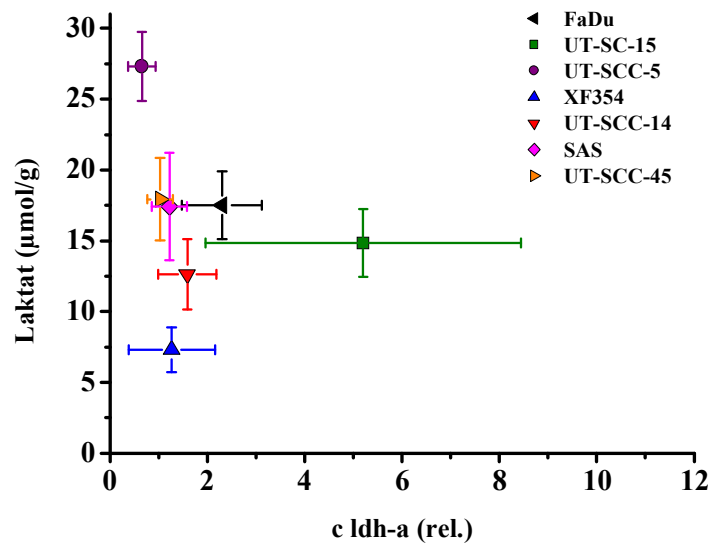


Abbildung 3.21: Laktat (µmol/g) als Funktion der ldh-a-mRNA (rel. Konzentration).

3.3.6 Korrelationen zwischen Hypoxie und der Genexpression

Da die Hypoxie oft als Grund für die Hochregulierung von Glykolyseenzymen angeführt wird, wurde überprüft, ob die drei nachgewiesenen Gene in ihrem Expressionsniveau eine Abhängigkeit zur pHF zeigen. Abbildungen 3.22, 3.23 und 3.24 stellen den Zusammenhang dar. Es zeigt sich kein Einfluss der Hypoxie auf das Genexpressionsniveau. Für glut1 lässt sich eher eine negative Korrelation erkennen, die aber mit einem p-Wert von 0,7 nicht signifikant ist.

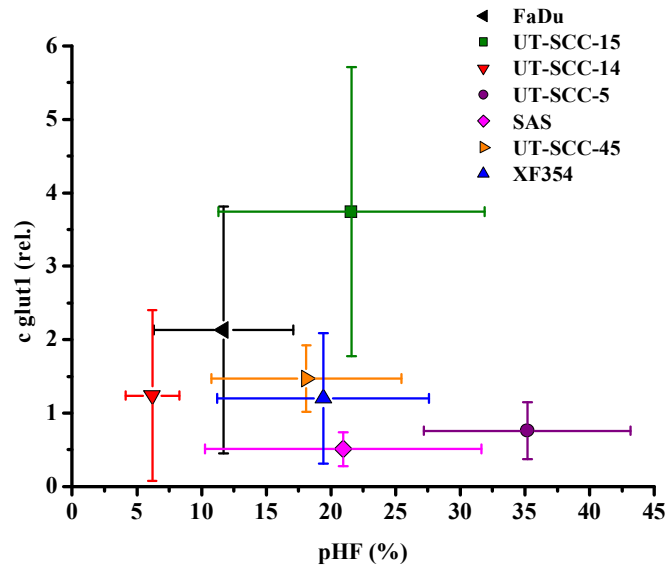


Abbildung 3.22: Die glut1-Expression (rel. Konzentration) als Funktion der pHF (%).

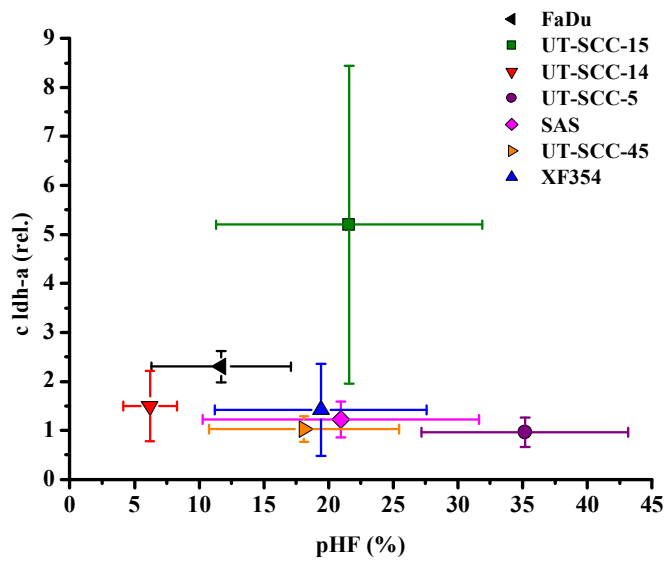


Abbildung 3.23: Die ldh-a-Expression (rel. Konzentration) als Funktion der pHF (%).

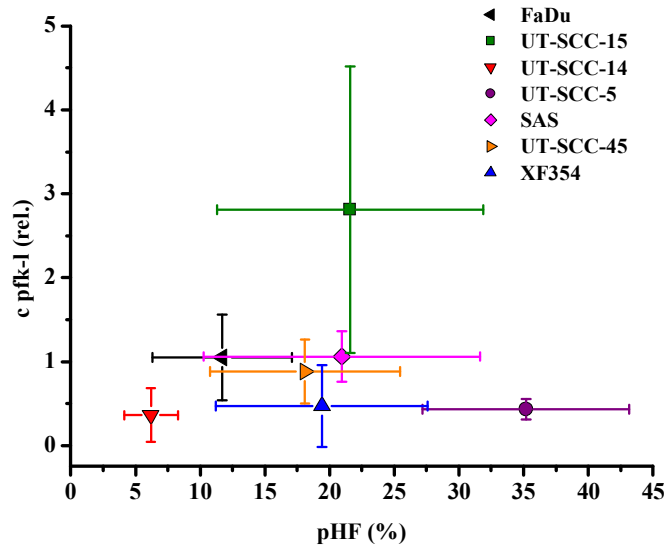


Abbildung 3.24: Die pfk-l-Expression (rel. Konzentration) als Funktion der pHF (%).

3.4 Western Blot

Der Western Blot lässt eine Aussage über den Gehalt bestimmter Proteine zu. Dieser Proteingehalt definiert sich über die Bandenstärke der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine. In unserem Fall wird durch fluoreszenzmarkierte Antikörper ein Intensitätswert als Maß angegeben. Die Proteine LDH-A und das Haushaltsgen konnten gleichzeitig auf einer Membran nachgewiesen werden. Von allen sieben Tumorlinien wurden jeweils fünf Tumoren auf ihren LDH-A Proteingehalt untersucht, um eine Korrelation zwischen LDH-A Proteingehalt und Laktatgehalt bzw. Proteingehalt und *ldh-a* mRNA-Gehalt festzustellen. Abbildung 3.25 zeigt das Bandenmuster für Tubulin (rot) und LDH-A (grün).

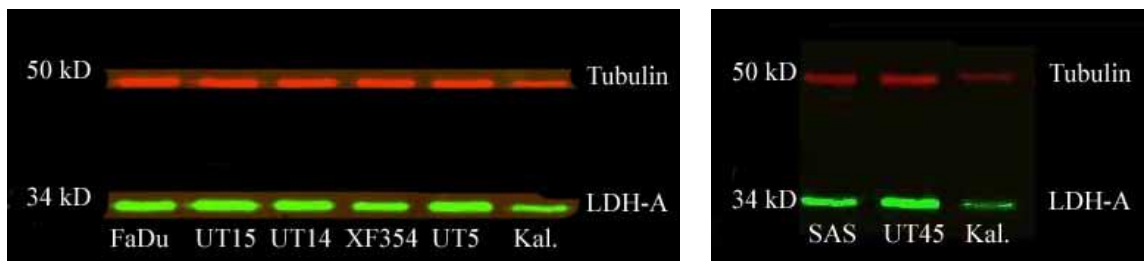


Abbildung 3.25: Fluoreszenzmarkierte Banden, die den Proteingehalt (%) für Tubulin und LDH-A aller sieben Tumorlinien anzeigen, Kal. = Kalibrator (FaDu-Zellysat)

Das Haushaltsgen Tubulin dient gleichzeitig als Ladekontrolle. Man sieht deutlich, dass die Probenmenge in allen Taschen nahezu gleich ist, so dass man die Bandenintensitäten der unterschiedlichen Tumorlinien direkt miteinander vergleichen kann. Es zeigt sich ebenfalls, dass sich keine großen Unterschiede im Proteingehalt zwischen den einzelnen Tumorlinien herausstellen. In Tabelle 3.7 sind alle Western Blot-Ergebnisse, sowie die Laktatwerte und die rel. Konzentration der ldh-a mRNA aufgelistet.

Tabelle 3.6: Mittelwerte (\pm SD) für den Proteingehalt an LDH-A, den Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) und den ldh-a m-RNA Gehalt (rel. Konz.) der sieben Tumorlinien

Tumor	XF354	UT-SCC-14	UT-SCC-15	FaDu	SAS	UT-SCC-45	UT-SCC-5
Proteingehalt (MW \pm SD)	1,3 \pm 0,5	1,8 \pm 0,7	1,7 \pm 0,9	1,2 \pm 0,5	1,1 \pm 0,3	2,2 \pm 1,9	1,9 \pm 0,9
Laktat ($\mu\text{mol/g}$) (MW \pm SD)	7,2 \pm 1,5	12,6 \pm 2,5	14,6 \pm 2,4	16,9 \pm 2,4	17,2 \pm 3,8	18,2 \pm 2,9	25,9 \pm 3,9
ldh-a (rel. Konz.) (MW \pm SD)	1,4 \pm 0,9	1,5 \pm 0,7	5,2 \pm 3,2	2,3 \pm 0,8	1,2 \pm 0,4	1,0 \pm 0,3	1,1 \pm 0,6

Vergleicht man den Proteingehalt der sieben Tumorlinien mit dem Laktatgehalt so zeigt sich keine Korrelation. Abbildung 3.26 verdeutlicht dies. Gleiches gilt für den Vergleich zwischen Proteingehalt und ldh-a mRNA-Gehalt. Auch hier findet sich, wie Abbildung 3.27 zeigt, kein Zusammenhang.

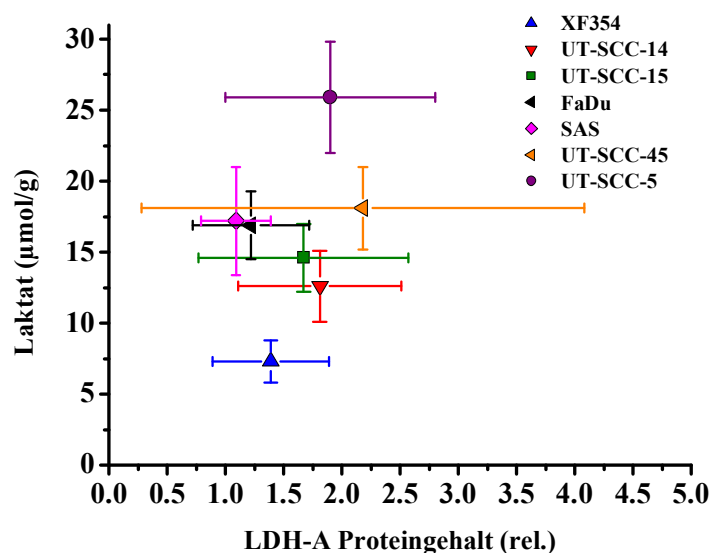


Abbildung 3.26: Laktat ($\mu\text{mol/g}$) als Funktion des relativen LDH-A Proteingehalts.

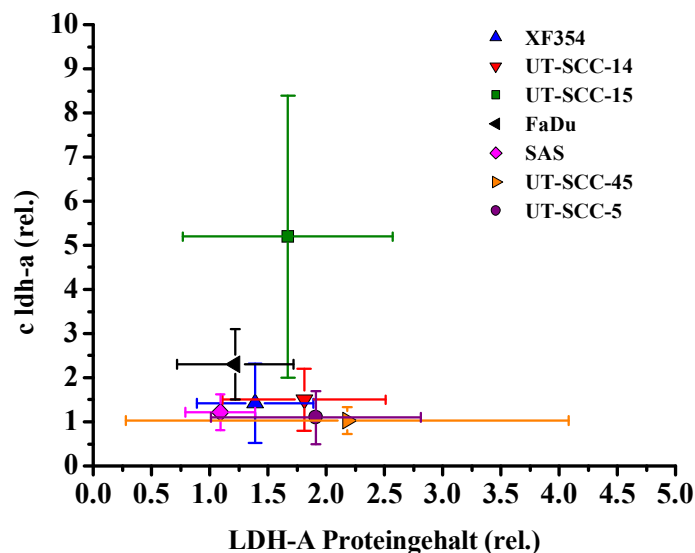


Abbildung 3.27: ldh-a mRNA Gehalt (rel. Konzentration) als Funktion des relativen LDH-A Proteingehalts.

3.5 Strahlensensitivität: Die TCD₅₀

Kernziel der Arbeit waren Untersuchungen zur Frage, ob das metabolische Mikromilieu einen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit von Tumoren hat. Die TCD₅₀ lässt eine Aussage über das biologische Strahlenverhalten von Tumoren zu. Tumoren mit hohen Werten gelten als strahlenresistent, Tumoren mit niedrigen Werten als strahlensensitiv. Wir haben die Werte der TCD₅₀ mit den Laktatwerten der Biolumineszenz verglichen um einen Zusammenhang zu finden. Die Tabelle 3.8 gibt Informationen über die TCD₅₀ aller untersuchten Tumoren mit dem dazugehörigen Konfidenzintervall (KI). Abbildung 3.28 zeigt eine Auftragung des Laktats gegen die TCD₅₀. Ein Vergleich mit Glukose oder ATP ergab keine Korrelation.

Tabelle 3.7: Statistische Daten über die TCD₅₀, MW = Mittelwert, KI = Konfidenzintervall und den Laktatgehalt (MW ± SD)

Tumor	XF354	UT-SCC-14	UT-SCC-15	FaDu	SAS	UT-SCC-45	UT-SCC-5
TCD ₅₀ (MW)	47,4	52,1	78,1	85,2	126,7	45,43	117,16
KI [95 %]	[40,9; 54,6]	[46,4; 58,3]	[63,9; 108,7]	[77,9; 95,6]	[114,9; 140,2]	[38,8; 51,38]	[103,8; 139,1]
Laktat (µmol/g) (MW±SD)	7,2 ± 1,5	12,6 ± 2,5	14,6 ± 2,4	16,9 ± 2,4	17,2 ± 3,8	18,2 ± 2,9	25,9 ± 3,9

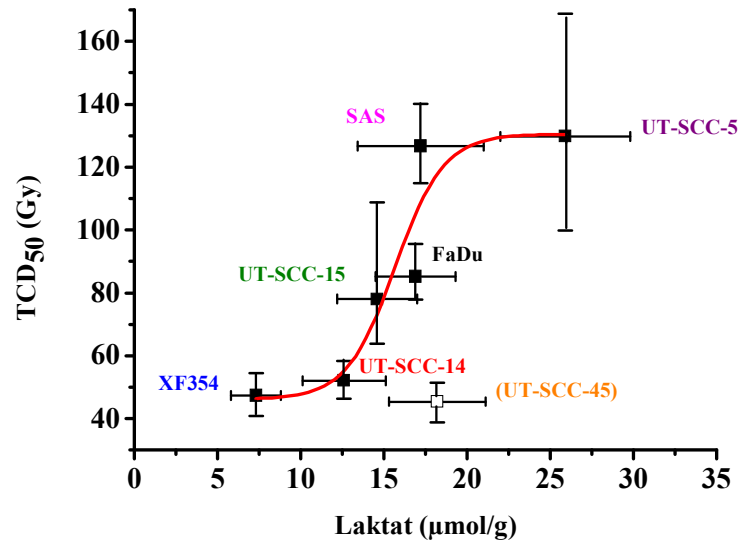


Abbildung 3.28: Die TCD₅₀ (Gy) als Funktion der Laktatkonzentration ($\mu\text{mol/g}$). Es besteht ein sigmoider Zusammenhang zwischen Laktat und der Strahlenempfindlichkeit. Die Tumorklinie UT-SCC-45 stellt aus biologischen Gründen (siehe Diskussion) einen Ausreißer dar und wurde nicht in die Berechnung des Boltzman-Fits miteinbezogen, wurde aber der Vollständigkeit halber mit in das Diagramm aufgenommen

Es besteht ein sigmoider Zusammenhang zwischen dem Laktatgehalt und der Strahlenresistenz von Tumoren. Eine Variation des Laktatgehalts um einen Faktor von ca. 3,5 in Tumoren korreliert mit einer Variation der TCD₅₀ nach fraktionierter Bestrahlung um einen Faktor von ca. 2,5.

4 Diskussion der Methoden

4.1 Tiermodelle in der Onkologie

Man unterscheidet in der tierexperimentellen Tumorforschung grundsätzlich zwischen Transplantations- und Mutationsmodellen. In Mutationsmodellen werden Versuchstiere eingesetzt, die entweder durch spontane oder aber häufiger durch induzierte Mutationen eine bestimmte Eigenschaft besitzen. In der Onkologie gebräuchlicher als die Mutationsmodelle sind die Transplantationsmodelle, d. h. dem Versuchstier werden Tumorzellen oder Tumorfragmente in unterschiedlicher Weise zugeführt. Man unterscheidet wiederum zwischen syngenem und xenogenen Modellen. Bei syngenem Modellen werden Zellen der gleichen Tierspezies appliziert, im Xenograft-Modell stammen Zellspender und Zellempfänger aus zwei unterschiedlichen Arten. Aus diesem Grund müssen in Xenograft Versuchen immundefiziente Tiere eingesetzt werden, um einer Abstoßung der fremden Zellen durch das Immunsystem des Empfängers vorzubeugen. Der so entstandene Tumor stellt histologisch eine Mischung aus speziesfremden Tumor- und wirtseigenen Stromazellen dar.

Transplantationsmodelle werden aber nicht nur anhand der verwendeten Spezies unterschieden, sondern auch auf Grund des Applikationsortes der Tumorzellen. Ist der Injektionsort identisch mit dem Originalgewebe aus dem die Zellen stammen, so spricht man vom orthotopen Modell. Sind Herkunftsgewebe und Zielgewebe verschieden, so bezeichnet man dies als ektop. Ektope Modelle sind auf Grund ihrer einfachen Durchführung in der präklinischen Onkologie weit verbreitet. Die Tumorzellen werden meist subkutan appliziert. Die im vorliegenden Projekt verwendeten subkutanen Experimentaltumoren wurden nach standardisierten Verfahren implantiert und charakterisiert. Ebenso unterlag die Haltung der immundefizienten Tiere internationalen Standards und Normen.

4.2 Tumoren

Die Xenotransplantate wurde in Dresden auf Nacktmäusen gezüchtet. Es wurde versichert, dass die Entnahme mit der anschließenden sofortigen Überführung in flüssigen Stickstoff sorgfältig und zuverlässig durchgeführt wurde. Die spätere ATP-Messung mit der Biolumineszenz zeigte stets ein ausreichend starkes Signal, was als Indiz dafür angesehen werden kann, dass die Proben tatsächlich zügig eingefroren worden sind und die Kühlkette während des Versands und der anschließenden Aufarbeitung bis zur Messung nicht unterbrochen wurde. Tatsächlich kann der ATP-Gehalt einer Probe als sensibles Signal einer unterbrochenen Kühlkette gelten, da sich ATP rasch abbauen würde. Die Schnitte sollten allerdings auch nicht

länger als 2 Wochen bei -20 °C aufbewahrt werden, da auch bei diesen Temperaturen Glukose und ATP einen Abbau erfahren. Sollten die Schnitte nicht innerhalb einer Woche verschickt werden oder nach Ankunft nicht direkt gemessen werden können, empfiehlt sich eine Lagerung bei -80 °C.

4.3 (Immun-) Histologie

Die Schnitte für die Histologie wurden unfixiert luftgetrocknet, bei -20 °C eingefroren und in Schnittkästen auf Trockeneis versandt. Nur der jeweilige Schnitt mit der Nummer 10, der für die Anti HIF-1 α -Färbung vorgesehen war, wurde direkt nach dem Schneiden 2 min bei 50 °C fixiert und anschließend für 10 min in 4 °C kaltem Methanol fixiert. Danach wurde der Schnitt luftgetrocknet und eingefroren. Allerdings wurden die Schnittkästen phasenweise befüllt, so dass während des Einsortierens neuer Schnitte in Dresden, die bereits in dem Kasten befindlichen Schnitte angetaut sein könnten. Dennoch ließen sich alle bearbeiteten Schnitte (Nr. 11 bis 13) nach dem Auftauen und der Fixierung in Aceton problemlos färben. Man sollte jedoch darauf achten, die Schnitte im gefrorenen Zustand zu bewahren, da sich bei Raumtemperatur die Antigene für die Immunfärbungen abbauen können. Darüber hinaus sollte die Färbung auch direkt nach Ankunft der Schnitte erfolgen um längere Lagerungszeiten zu vermeiden.

Die Anti-Maus-Färbung erwies sich anfangs als gut geeignete Strukturfärbung. Zwar wurden Nekrosen unspezifisch gefärbt, dennoch war es stets möglich Mausgewebe von Tumorgewebe zu unterscheiden. Allerdings zeigte sich, dass diese Färbung je nach Tumorlinie ganz unterschiedlich ausfallen konnte. Da im Verlauf der Arbeit ganze Tumorlinien großflächige unspezifische Anfärbungen zeigten, sollte eine andere Färbung angewendet werden. Im Vorfeld wurde die Masson-Goldner-Färbung als Strukturfärbung in Betracht gezogen, jedoch fiel die Entscheidung auf Grund der zeit- und arbeitsintensiven Durchführung gegen dieses Verfahren. Diese Färbung eignet sich aber auch dazu, Bindegewebe zu identifizieren, und könnte als Alternative zu der Anti-Maus-Färbung dienen.

Die Anti-Carboanhydrase IX-Färbung fiel ebenfalls je nach Tumorlinie unterschiedlich aus. Während bei manchen Linien ein starkes positives Signal auftrat, fiel die Färbung bei anderen Tumorlinien schwach aus oder es wurden ebenfalls großflächige Areale unspezifisch angefärbt. Herr Dr. Mayer übernahm einen Teil der Auswertung der gefärbten Schnitte. Dafür wurden die Masken, die für die Biolumineszenzauswertung angefertigt wurden, über die gefärbten Schnitte gelegt, um für den späteren Vergleich mit den Metabolitbildern identische Areale auswerten zu können. Da die Schnitte abfotografiert wurden und anschließend verklei-

bert werden mussten, um die Maske anzupassen, verschlechterte sich die Bildauflösung in einem Maße, dass eine Auswertung von positiv gefärbten Einzelzellen erschwert wurde. Es war dennoch möglich, mit der Software OPTIMAS verwertbare Ergebnisse zu erzielen, so dass man prozentuale Flächenwerte an CA IX positiv gefärbten Arealen im Vergleich zur Gesamtfläche angeben konnte. Es bietet sich an, insbesondere was den Vergleich mit der Pimonidazolfärbung aus Dresden angeht, Pixel zu Pixel-Korrelationen durchzuführen um genauere Überlagerungen anfertigen zu können, die eine Aussage über eine Koexpression der beiden Hypoxiemarker zulassen.

Für die HIF-1 α -Färbung konnte noch kein geeignetes Protokoll ausgearbeitet werden. Auf Grund der schnellen Abbaurate von HIF-1 α unter Normoxie, war es schwierig eine Fixierungsmethode zu finden, bei der HIF-1 α erhalten bleibt. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Hitzebehandlung der Schnitte sich unvorteilhaft ausgewirkt hatte. Es wurde vermutet, dass HIF-1 α durch die Hitze zerstört wurde.

4.4 Bildgebende Biolumineszenz

Die Methode der bildgebenden Biolumineszenz, die in unserer Arbeitsgruppe entwickelt worden ist, wurde bereits in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben und validiert. Bei der Auswertung konnte man größte Genauigkeit garantieren, da es sich um Experimentaltumoren handelte, bei denen der Ausschluss von Normalgewebe dem Ausschluss von Mausgewebe gleich kommt, der durch die Anti-Maus-Färbung möglich wurde. Die in die Biopsie gestochenen Löcher bewährten sich sehr als Orientierungshilfe bei der Überlagerung der Einzelbilder, zusätzlich war auch die Kontur der Maushaut eine große Hilfe.

4.4.1 Kalibrierung

Die Kalibrierung über eine Standardkurve funktionierte bei ATP und Glukose einwandfrei. Bei Laktat allerdings ergab sich das Problem der Übersättigung. Die Kalibrierungskurve für Laktat geht ab einer Konzentration von ca. 20 $\mu\text{mol/g}$ in eine Plateauphase über, so dass Unterschiede zwischen 20 $\mu\text{mol/g}$ und dem höchsten Standard von 50 $\mu\text{mol/g}$ nicht mehr detektiert werden können. Da es aber bei den Tumoren viele Schnitte gab, die stellenweise höhere Intensitätswerte aufwiesen, lagen diese oberhalb des durch die verwendeten Standards vorgegebenen, gültigen Messbereichs und konnten somit nicht vollständig ausgewertet werden.

Dieses Problem wurde in der Endphase dieses Projektteiles und in allen darauf folgenden Laktatmessungen besonders schwerwiegend, da alle Tumorschnitte ausgehend von der Tumormlinie UT-SCC-45 plötzlich abnorm hohe Laktatwerte aufwiesen, die fast alle außerhalb der Kalibrierungskurve lagen und auch sonst in keinem Zusammenhang mehr zu den übrigen

Ergebnissen standen. Diese hohen Laktatwerte sind zurzeit unerklärlich und es wird intensiv geprüft, ob methodische Gründe dafür verantwortlich sind.

4.5 Real-Time RT-PCR

4.5.1 RNA-Extraktion aus Gewebe

Bisher wurde die RNA-Extraktion aus Gewebe über 50-80 Gefrierschnitte von 10 µm Dicke durchgeführt. Dazu wird die Biopsie im Gefriermikrotom mit Tissue Tek aufgeblickt und die Schnitte angefertigt. In unserem Fall war dies nicht möglich. Die Tumorstückchen, die uns für die PCR zur Verfügung standen, waren so klein, dass sie im Tissue Tek versanken. Dadurch wurde bei jedem Schnitt auch ein erheblicher Teil des Einbettmediums mitgeschnitten und zusammen mit dem Tumor in den Lysepuffer überführt. Dies erhöhte zum einen das Kontaminationsrisiko und zum anderen haben Tests ergeben, dass das Einbettmedium, welches bei Raumtemperatur eine zähflüssige Konsistenz hat, auf Grund dessen die Filter der Extraktions säulen verstopfen und somit die RNA-Ausbeute um ein Vielfaches verringert wird. Daher sind wir dazu übergegangen, den Aufschluss der Zellen durch Mörsern in flüssigem Stickstoff durchzuführen. Dies verringerte die Kontaminationsgefahr, und durch das Zerreiben des Gewebes konnte eine bessere Homogenisierung erzielt werden. Eine Aussage über den Anteil an Mausgewebe und über weitere histologische Besonderheiten der Biopsie kann für das entsprechende Tumorstück dann nicht mehr gemacht werden, doch dienen die nachfolgenden Gefrierschnitte derselben Biopsie als Anhaltspunkte zur Berücksichtigung dieses Verhältnisses.

4.5.2 RNA-Formaldehyd-Gel und Reverse Transkription

Das RNA-Formaldehyd-Gel eignete sich sehr gut zur Überprüfung des Zustandes der RNA. Doch liefert es natürlich auch den Beweis dafür, dass bei der Extraktion ebenfalls ribosomale RNA gewonnen wurde. Daher fiel eine Entscheidung zugunsten der Reversen Transkription mit oligo dT-Primern, da diese komplementär an die Poly (A)-Sequenz der mRNA binden und daher keine ribosomale RNA umschreiben. Somit kann man davon ausgehen, dass die Konzentration an cDNA der Konzentration an mRNA entspricht und man kann sich bei der anschließenden PCR auf die reine mRNA beziehen anstatt auf die Gesamtzell-RNA. Die Durchführung von Negativkontrollen der Proben für die Reverse Transkription ist unumgänglich, da bei einer so hochsensitiven Methode wie der PCR selbst kleinste Mengen an genomischer DNA zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Tatsächlich ist es nämlich so, dass ohne DNA-Lyse häufig ein Amplifikat in der Negativkontrolle entsteht.

4.5.3 Verfahren zur RNA-Analyse

Die Quantifizierung von RNA aus geringem Probenmaterial erfordert Verfahren, die nur geringste Mengen an Ausgangsmaterial benötigen. Klassische Verfahren wie etwa Northern Blot benötigen relativ viel Ausgangsmaterial. Bei cDNA-Microarray-Analysen ist die Menge zwar geringer, aber diese Methode erfordert einen hohen apparativen und finanziellen Aufwand. Die PCR-Technik kann selbst bei geringsten Mengen angewendet werden, und durch die Reverse Transkription der mRNA in cDNA ist das Risiko des Materialverlustes durch RNA-Abbau verringert. Durch die RT-PCR ist es möglich den Transkriptionsstatus bestimmter Gene zu untersuchen.

Obwohl die semiquantitative RT-PCR heute zu dem meistverwendeten Verfahren zur mRNA-Quantifizierung zählt, haben wir uns für die vollquantitative real time PCR entschieden, da diese Methode genauere Aussagen über das Transkriptionsniveau einzelner Gene zulässt.

4.5.4 Etablierung der Real Time RT-PCR

Für die real time RT-PCR-Analysen wurde das ABPrism 7300 von Applied Biosystems (ABI) verwendet. Die real time PCR ermöglicht einen hohen Probenumsatz, da bei jedem Durchgang 96 Proben gleichzeitig getestet werden können. Bei jedem Lauf muss man als endogene Kontrolle ein Haushaltsgen mitführen, sowie zusätzlich einen Kalibrator. Die endogene Kontrolle muss ein konstitutiv exprimiertes Gen sein, damit man die Ergebnisse der verschiedenen Tumoren vergleichen kann. Hier diente HMBS als Haushaltsgen. Die am häufigsten verwendeten Standards wie GAPDH und β -Aktin haben wir nicht in Betracht gezogen. Von GAPDH ist bekannt, dass dessen Expression in Tumoren und insbesondere unter Hypoxie schwanken kann, und β -Aktin ist auf Grund vieler vorhandener Pseudogene und ebenfalls schwankender Expressionslevel in verschiedenen Gewebetypen ausgeschlossen worden (Bustin 2000, Vandesompele et al. 2002, Whelan et al. 2003). Die Wahl des Haushaltsgens ist ein sehr wichtiger Faktor für die Auswertung der real time PCR. Das Haushaltsgen dient dazu, die Ergebnisse zu normalisieren und so auch verschiedene PCR-Läufe miteinander vergleichen zu können. Dies ist nur möglich, wenn man davon ausgehen kann, dass das Haushaltsgen in jedem Lauf gleich hoch exprimiert wird. Wir haben unterschiedliche Haushaltsgene getestet und festgestellt, dass HMBS die konstanteste Expression in verschiedenen Zelllinien aufwies. Berechnet man den relativen Variationskoeffizient über die C_T -Werte jeder einzelnen Probe, dann ergeben sich bei zehn unterschiedlichen Läufen Werte zwischen 0,4 % und 1,9 %. Zwei der Werte waren $< 1,0$ %. Es fiel aber auf, dass die C_T -Werte des Kalibrators, also der einzigen Zellysatprobe stets niedriger waren als die C_T -Werte der Gewebeproben. Daher wurde der relative

Variationskoeffizient der Gewebeproben auch noch einmal separat berechnet und die Werte lagen hierbei zwischen 0,6 % und 1,9 %, wobei hier aber fünf von zehn Werten $< 1,0$ % waren. Es zeigte sich also, dass die Expression von HMBS insgesamt und insbesondere innerhalb der Gewebeproben relativ konstant war. Allerdings scheint auch HMBS nach eigenen Beobachtungen von Hypoxie beeinflusst zu werden, so dass es ratsam ist, in Zukunft, insbesondere bei der Untersuchung von Hypoxieproben ein anderes, geeigneteres Haushaltsgen zu suchen.

Der Kalibrator ist eine Basisprobe für vergleichende Ergebnisse und läuft mit den Zielgenprimern. Wir entschieden uns für die cDNA der Zelllinie FaDu, da diese in größerer Menge problemlos hergestellt werden kann, so dass in jedem Lauf dieselbe cDNA verwendet werden konnte. Nachdem zunächst das SYBR[®] Green-Verfahren mit eigens konstruierten Primern ausgetestet wurde, entschieden wir uns dennoch für das sehr viel spezifischere TaqMan[®]-Verfahren und verwendeten dafür kommerziell erhältliche, von ABI vertriebene und optimierte Primer-Sonden-Gemische, so genannte Assays on Demand. Auch der Master Mix wurde nicht mehr aus einzelnen Komponenten selbst zusammengesetzt, sondern es wurde eine fertige Lösung verwendet. Auf diese Weise lassen sich Pipettierfehler und Kontaminationsrisiken auf ein Minimum reduzieren.

Es gibt zwei Quantifizierungsstrategien: die absolute und die relative Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung erhält man als Ergebnis Kopienzahlen des jeweiligen Gens, zugeordnet anhand von Plasmidstandards. Die relative Quantifizierung beschreibt die Expressionsänderung des Zielgens relativ zu einem Kalibrator. Wir haben uns für die relative Quantifizierung entschieden, da die Aussage für unsere Fragestellung ausreichend ist. Darüber hinaus erspart man sich die Herstellung von Plasmidstandards, die für jedes einzelne Gen separat in einem S2 Labor hergestellt werden müssten. Die Auswertung über die Vergleichende C_T -Methode ($\Delta\Delta C_T$) erlaubt einen größeren Probenumsatz, da keine Verdünnungsreihe für eine Standardkurve nötig ist und somit auch keine Pipettierfehler auftreten können.

4.6 Western Blot

4.6.1 Proteinextraktion

Bei der Extraktion von Protein aus gefrorenem Biopsiematerial bewährte sich das mechanische Mörsern unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff. Auf Grund von geringem und wertvollem Ausgangsmaterial wurde das Proteinlysate zwischen den beiden Arbeitsgruppen in München und Mainz aufgeteilt. Die Probenmengen waren aber stets ausreichend für die vor-

gesehenen Untersuchungen. Der Versand erfolgte auf Trockeneis und das Probenmaterial traf stets in einem vollkommen gefrorenen Zustand ein, so dass davon ausgegangen werden kann, dass kein zwischenzeitliches Auftauen stattgefunden hat. Nach Ankunft wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt, da auf Grund verschiedener Anwendungstechniken in München nicht allen Proteinlysaten Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zugefügt wurden. Da aber auch bei -80 °C Enzyme eingeschränkt arbeiten können, ist eine Lagerung auf längeren Zeitraum nicht zu empfehlen. Leider entfällt bei dieser Methode die Möglichkeit, die Biopsie histologisch zu charakterisieren, so dass man keine Informationen über den Anteil an vitalem Tumorgewebe erhält.

4.6.2 Auswertung mit dem Odyssey-System

Die Verwendung des Odyssey Systems für die Auswertung des Western Blots liefert mehrere Vorteile. Durch den sehr viel höheren dynamischen Wertebereich ist eine genauere Quantifizierung möglich. Darüber hinaus ist es möglich eine Multiplex Detektion durchzuführen, d.h. dass gleichzeitig zwei unterschiedliche Proteine auf derselben Membran nachgewiesen werden können. Man erspart sich dadurch das so genannte Strippen der Membran, was zusätzliche Arbeit erfordern würde und ungenauere Ergebnisse liefert. Durch das Scannen der Membran und des Fluoreszenzsignals erspart man sich die Filmentwicklung und die Arbeit in der Dunkelkammer. Durch die hohe Sensitivität dieser Methode hat man keinen Verlust von schwachen Banden und kann mit wesentlich geringeren Probenmengen arbeiten.

Im Vorfeld wurden Etablierungsversuche durchgeführt, die gezeigt haben, dass diese Auswertemethode reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die Unterschiede, die sich ergeben, wenn man eine Membran mehrfach auswertet, sind minimal. Für die endgültigen Ergebnisse wurde jede Membran zweimal ausgewertet. Variationen die sich bei demselben Probenmaterial ergaben, waren stets auf die Elektrophorese oder den Blot selbst zurückzuführen, nicht aber auf die Auswertung. Es wurden Verdünnungsreihen angefertigt, bei denen eindeutige Unterschiede bei Abstufungen von 0,5 µg detektiert werden konnten. Die Intensitätswerte lagen in einem Bereich zwischen 1,05 und 676. Das Mitführen eines Kalibrators, der immer von derselben Probe stammte, lässt es zu, jede Probe darauf zu normieren und somit verschiedene Western Blot Läufe untereinander zu vergleichen.

5 Diskussion der Ergebnisse

5.1 Metabolitkonzentrationen

Durch rasches Einfrieren von Geweben erreicht man eine Kryofixation des aktuellen metabolischen Zustands der Zellen. Die Biolumineszenztechnik liefert somit Resultate, die die Metabolitverteilung im Moment der Probenentnahme widerspiegeln. Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über Messwerte von Metabolitkonzentrationen in ähnlichen Untersuchungen an menschlichen Tumoren.

Tabelle 5.1: Vergleich von Metabolitkonzentrationen aus unterschiedlichen Studien

Studie	Tumoentität	ATP ($\mu\text{mol/g}$)			Glc ($\mu\text{mol/g}$)			Lak ($\mu\text{mol/g}$)		
	Herkunft	MW \pm SD	Min	Max	MW \pm SD	Min	Max	MW \pm SD	Min	Max
Walenta et al. (Cancer Res. 2000)	Cervixkarzinom Human	0,9 \pm 0,5	0,2	2,2	2,3 \pm 1,1	0,5	4,8	8,5 \pm 3,4	2,7	15,6
Diss. Schröder 2002	Kopf-Hals-Karz. Human	1,1 \pm 0,5	0,2	2,1	1,8 \pm 1,0	0,1	3,7	9,7 \pm 5,0	1,2	20,3
Walenta et al. (J Cancer Res Clin Oncol 2003)	Colonkarzinom Human	1,1 \pm 0,5	0,3	2,2	1,3 \pm 0,9	0,1	3,6	7,0 \pm 4,3	1,1	18,2
Eigene Studie (2006)	Kopf-Hals-Karz. Hum. (Xenotrans.)	1,6 \pm 0,5	0,4	2,9	2,1 \pm 0,8	0,4	6,8	16,1 \pm 5,7	5,0	30,5

Die mittleren Konzentrationswerte aller Metabolite der Xenografts liegen unerwartet hoch. Die Werte von Humanbiopsien aus anderen Versuchsreihen lagen (bis auf die Glukoseden in Zeile 1, Tabelle 5.1) stets wesentlich niedriger. Bezieht man sich auf den Median der Humangewebstumoren als Grenze zur Unterteilung in Hoch- und Niedriglaktattumoren, dann liegen, bis auf den XF354 Tumor, alle untersuchten Tumoren deutlich im Bereich der Hochlaktattumoren. Derzeit ist keine Studie bekannt, in der ein direkter Vergleich zwischen Metabolitkonzentrationen von syngenem und xenogenem Transplantationsmodellen oder zwischen Xenotransplantaten und Spontantumoren untersucht wurde. Es ist aber bekannt, dass solide Tumoren eine gesteigerte Glykolyseaktivität zeigen (Gatenby und Gillies 2004, Walenta et al. 2004) und die Transkriptionsrate glykolytischer Enzyme gesteigert ist (Firth et al. 1994, Semenza et al. 1994, Firth et al. 1995, Ebert et al. 1995, Ebert et al. 1996, Salceda et al. 1996, Semenza 1999, Dang und Semenza 1999, Seagroves et al. 2001, Semenza 2002b, Unwin et al. 2003). Ob dies die einzige Erklärung für die hohen Laktatwerte ist, lässt sich nicht eindeutig beantworten. Nagetiere (rodents) und insbesondere Nacktmäuse weisen höhere Blutglukosewerte auf als Menschen. Die Blutglukosewerte der tumortragenden Versuchstiere wurden in

Dresden gemessen, lagen aber mit Mittelwerten von 4,9 mmol/l bis 6,9 mmol/l nicht wesentlich höher als die Werte für den Menschen, die bei 3,5 – 5,5 mmol/l liegen. Die starke Laktatanreicherung ist also nicht die Folge eines erhöhten Substratangebotes. Der Unterschied zwischen den Laktatwerten der Tumoren die mit Pimonidazol und Hoechst 33342 behandelt wurden und den Werten der Tumoren unbehandelter Versuchstiere, ist, wenn auch nicht signifikant, dennoch auffällig. Die Tiere werden durch die Gabe von Pimonidazol und Hoechst 33342 eine Stunde vor der Tumorentnahme einer Stresssituation ausgesetzt. Eine solche Stresssituation ist bekanntermaßen mit einem erhöhten Blutglukosespiegel und einer gesteigerten Stoffwechselrate verknüpft. Daher könnte es sein, dass in dieser Zeitspanne vor Probenentnahme die ohnehin erhöhte Glykolyseaktivität noch ansteigt und zu einer starken Akkumulation von Laktat führt. Dies sollte in einer systematischen Studie abgeklärt werden.

Glykolytisch aktive Gewebe besitzen ein besonders aktives Laktat-Transportsystem, durch das plötzlich oder kontinuierlich anfallendes Laktat schnell aus der Zelle transportiert wird. In solchen Geweben wird häufig der Transporter Subtyp MCT1 angetroffen, der auch in Tumorzellen dominiert (Manning Fox et al. 2000). Über Expression und Aktivität dieser Monocarboxylat-Transportproteine sind in dieser Studie keine Daten vorhanden. Da in Tumoren aber eine abnormale Vaskularisierung anzutreffen ist, stellt sich die Frage, ob das viele Laktat nicht eher die Folge einer Akkumulation durch schlechten Abtransport, als die Folge einer gesteigerten Produktion ist. Frühere an Humantumoren erhobene Befunde sprechen eher gegen diese Hypothese (Schroeder 2002). In den vernetzten Arbeitsgruppen in Dresden und München laufen derzeit Untersuchungen zur Vaskularisationsdichte, die genauere Rückschlüsse auf die Bedeutung der Mikrozirkulation für die Laktatakkumulation zulassen sollten.

5.2 Expression der Hypoxiemarker Carboanhydrase IX und Pimonidazol

Man unterscheidet exogene und endogene Hypoxiemarker. Exogene Marker sind Medikamente oder Chemikalien, die sich in hypoxischen Zellgebieten spezifisch anreichern. Endogene Marker sind Gene oder Gen-Produkte, deren Expression unter Hypoxie spezifisch hochreguliert wird. Um die mikroregionale Verteilung der Hypoxie darzustellen, können sowohl die exogenen als auch die endogenen Marker immunhistochemisch nachgewiesen werden. (Bussink et al. 2003). 2-Nitroimidazole, wie Pimonidazol, werden in Zellen mit einem Sauerstoffgehalt unter 10 mmHg irreversibel reduziert und ortsfixiert und dienen daher als Hypoxiemarker (Yaromina et al. 2005). Unter Hypoxie katalysieren nämlich Nitroreduktasen einen Elektronentransfer auf den Imidazolring des in die Zelle diffundierten Pimonidazols, so dass ein Nitro-Radikal-Anion entsteht. Die so reduzierte Form des Pimonidazols geht mit Molekü-

len die SH-Gruppen tragen, wie Glutathion oder Proteinen, stabile Verbindungen ein. Die so gebundenen Nitroimidazole sind nicht mehr membrangängig und verbleiben somit in den Zellen (Arteel et al. 1998). CA IX hingegen wird durch eine erhöhte Transkriptionsrate unter Hypoxie überexprimiert (Bussink et al. 2003, Rafajova et al. 2004, Puccetti et al. 2005, Thiry et al. 2006).

In der vorliegenden Studie ist der Intensitätswert der CA IX-Färbung zwischen den Tumorklinen unterschiedlich stark ausgeprägt. Es besteht allerdings keine Korrelation zwischen der Färbeintensität der CA IX und der Laktatkonzentration. Die Hypothese, dass die Laktatproduktion durch Hypoxie erhöht wird, lässt sich somit über den Marker CA IX nicht bestätigen. CA IX wird aber durch unterschiedliche nicht hypoxieassoziierte Stimuli beeinflusst. So kann die hypoxiebeeinflusste Transkription und das entsprechende Proteinniveau auch durch verringerte Glukose- und Bikarbonatkonzentrationen stimuliert werden (Rafajova et al. 2004). Die Halbwertszeit des CA IX-Proteins liegt in reoxygenierten Zellen bei 38 h, unabhängig davon, wie lange der Hypoxiezustand zuvor andauerte (Rafajova et al. 2004). Somit spiegelt CA IX nicht nur den aktuellen hypoxischen Zustand der Zellen wider, sondern es werden auch Regionen angefärbt, die bis zu 38 h vor Tumorentnahme von Hypoxie betroffen oder anderen ungünstigen Milieubedingungen ausgesetzt waren. Auch gilt CA IX nicht als strikt sauerstoffabhängig (Vordermark und Brown 2003). Als stromabwärts gelegenes Zielgen von HIF-1 muss die CA IX-Expression nicht grundsätzlich hypoxieabhängig sein, da HIF-1 seinerseits nicht nur durch Hypoxie aktiviert wird (Semenza 2002b, Dery et al. 2005a, Koukourakis et al. 2006). Zudem wird CA IX auch erst nach einer 4 Stunden andauernden Hypoxie detektiert (Mayer et al. 2006), so dass sie sich eher als Marker für chronische Hypoxie eignet. Pimonidazol wird nicht von so vielen verschiedenen Signalen beeinflusst wie CA IX. Arteel et al. (1998) zeigten, dass die Reduktion von Pimonidazol einzig durch den Sauerstoffgehalt reguliert wird und der Redoxzustand der Zellen keinen Einfluss auf Pimonidazol hat. Vergleicht man die Daten der Pimonidazolfärbung mit den Laktatkonzentrationen der Metabolitmessungen, so wird in diesem Fall die Arbeitshypothese bestätigt. Es zeigt sich, dass die Hypoxie Einfluss auf die Laktatproduktion hat, da ein signifikanter Zusammenhang bei den Hochlaktattumoren zwischen der Laktatkonzentration und dem Pimonidazolgehalt besteht ($p < 0,05$). Dies bedeutet, dass die untersuchten Xenograftlinien einen, wenn auch schwachen, Pasteur-Effekt aufrechterhalten und ihren Energieverbrauch unter Hypoxie durch eine leicht erhöhte Glykolyse decken. Dies gilt für sechs der sieben Tumorklinen. Die Tumorklinie XF354 weist nämlich die niedrigste Laktatkonzentration auf, besitzt aber die vierthöchste pHF. Unter Berücksichtigung dieser Linie ergibt sich keine signifikante Korrelation mehr ($p > 0,07$). Die-

se Tatsache und die Daten der CA IX-Messung zeigen, dass man im Umkehrschluss Laktat nicht als Hypoxiemarker heranziehen kann, da die Hypoxie nicht immer eine erhöhte Laktatproduktion zur Folge hat. Die Frage, welcher Hypoxiemarker besser geeignet ist, lässt sich zu diesem Zeitpunkt auf Grund der vorhandenen Daten nicht klären.

Der unmittelbare Vergleich von CA IX und Pimonidazol zeigte keine Übereinstimmung bezüglich hypoxischer Areale. Es deutete sich, im Gegenteil, eine negative Korrelation an. Diese gegensätzlichen Ergebnisse können daher rühren, dass es sich um zwei grundsätzlich verschiedene Detektionsmethoden handelt. Pimonidazol wird als exogener Hypoxiemarker ab einem Schwellenwert von < 10 mmHg katalytisch reduziert, während CA IX als endogener Marker hypoxieabhängigen transkriptionellen und translationellen Prozessen unterworfen ist. Der Vergleich zwischen CA IX und Pimonidazol wurde über Durchschnittswerte durchgeführt. Eine mikroskopische Koloalisationsanalyse beider Marker sollte genauere Informationen liefern. Derartige Koloalisationsstudien sind allerdings bereits mehrfach durchgeführt worden (Wykoff et al. 2000, Olive et al. 2001, Jankovic et al. 2006) und zeigten eine parallele Ausprägung beider Hypoxiemarker.

5.3 Genexpression

5.3.1 Regulation der Glykolyse

Zellen benötigen für die Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion eine bestimmte Energiemenge, die sie unter physiologischen Bedingungen durch den oxidativen Abbau von Nährstoffen gewinnen. Glukose stellt das wichtigste Substrat für die oxidative Energiegewinnung dar und ist der Ausgangspunkt mehrerer Stoffwechselwege. Durch die Glykolyse wird über eine Serie enzymatischer Prozesse ein Molekül Glukose in zwei Moleküle Pyruvat umgewandelt, mit einem Nettogewinn von zwei Molekülen ATP. Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat katalysiert. Der Glukosestoffwechsel kann auf molekularer Ebene durch Glukosetransportproteine reguliert werden. Diese Glukosetransporter ermöglichen die erleichterte Diffusion der Glukose durch die Plasmamembran; sie werden gewebs- bzw. zellspezifisch exprimiert und zum Teil durch externe Stimuli reguliert. GLUT1 findet sich in nahezu allen Säugerzellen und dient der basalen Glukoseversorgung vieler Gewebe. Er besitzt die höchste Affinität für Glukose und regelt vor allem die Glukoseaufnahme in Erythrozyten und über die Blut-Hirn-Schranke.

Hormone regulieren die Biosynthese von Schlüsselenzymen der Glykolyse. Dabei wird nicht nur die Menge des betreffenden Enzyms in der Zelle vermehrt oder vermindert, sondern auch die maximal mögliche Umsatzgeschwindigkeit der Glykolyse. Hexokinase (HK), die

Phosphofruktokinase (PFK) als Geschwindigkeit bestimmendes Enzym und die Pyruvatkinase (PK) nehmen dabei zentrale Funktionen ein. Der Aufbau der Promotorstrukturen, an die allgemeine aber auch ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren binden können, dieser Schlüsselenzyme ist sehr komplex. Die Transkriptionsrate des entsprechenden Gens ergibt sich damit aus dem komplexen Zusammenspiel der einzelnen, den Promotor aktivierenden bzw. inhibierenden Faktoren. Zu diesen Faktoren zählen vor allem Insulin und cAMP, wobei Insulin als Stimuli für die Expression der Glykolyseenzyme dient und cAMP als Antagonist des Insulins fungiert. Somit ergibt sich ein Bild, das auf eine koordinierte transkriptionelle Regulation der Glykolyse schließen lässt.

Darüber hinaus werden die Schlüsselenzyme durch allosterische Liganden reguliert. Die PFK wird durch ATP und Citrat gehemmt, während AMP, ADP und Fruktose-6-phosphat, sowie Fruktose-2,6-bisphosphat Aktivatoren sind. Die Pyruvatkinase wird durch Fruktose-1,6-bisphosphat allosterisch aktiviert, durch ATP hingegen gehemmt. Die HK wird zudem durch ihr Produkt Glukose-6-phosphat gehemmt.

5.3.2 Pathophysiologie des Tumorstoffwechsels

Wenn die oxidative Phosphorylierung beeinträchtigt ist, sind Zellen in der Lage alternative Stoffwechselwege derart anzupassen, dass der Energiebedarf gedeckt wird (Xu et al. 2005b). Die Erhöhung der Glykolyseaktivität ist eine solche Anpassung. Die mitochondriale Zellatmungsfunktion kann durch viele Faktoren negativ beeinflusst werden, wobei Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA) die Hauptursache eingeschränkter Mitochondrienaktivität ist (Penta et al. 2001, Carew und Huang 2002, Pelicano et al. 2006). Da die ATP Gewinnung über die oxidative Phosphorylierung wesentlich effizienter ist als über die Glykolyse, ist bereits ein geringer Verlust der mitochondrialen Aktivität durch stark erhöhte Glykolyseaktivität auszugleichen, um den Energiestatus aufrecht zu erhalten. Die Hypoxie ist ein weiterer wichtiger Faktor, der den Stoffwechsel betrifft und die Zelle zusätzlich von der Glykolyse abhängig macht. Zu den Adaptionsprozessen zählt auch die Hochregulation der Transkriptionsrate glykolytischer Enzyme sowie des Glukosetransporters GLUT1 durch Onkogene aber vor allem durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 α (Firth et al. 1994, Semenza et al. 1994, Firth et al. 1995, Ebert et al. 1995, Ebert et al. 1996, Salceda et al. 1996, Dang und Semenza 1999, Seagroves et al. 2001, Semenza 2002a, Unwin et al. 2003). Firth et al. (1995) führten Arbeiten an dem murinen LDH-A Promoter aus und zeigten, dass die O₂-regulierte Transkription der Zusammenarbeit dreier unterschiedlicher Domänen des Gens bedarf. Sie betonten die absolute Notwendigkeit einer HIF-1 Bindungsdomäne. Semenza et al. (1994) postulierten allerdings, dass es durchaus Signaltransduktionswege geben könnte, die HIF-1-unabhängig an der Regu-

lation von Glykolyseenzymen beteiligt sind. Dennoch gelten die Glykolyseenzyme und auch GLUT1 als durch Hypoxie induzierbare Gene. Außerdem beobachteten Seagroves et al. (2001), dass ein Verlust von HIF-1 α die erhöhte Laktatproduktion während der Hypoxie aufhebt. Auf transkriptioneller Ebene werden die Enzyme der Glykolyse somit stark reguliert und dies vermutlich über mehrere Wege, die aber alle eine Hochregulation bewirken. Betroffen sind vor allem die LDH-A, die PFK-L, die PGK1 (Phosphoglycerat Kinase1), die Triosephosphat-Isomerase, die Aldolase-A und -C, die Enolase, die Hexokinase und der Glukosetransporter GLUT1 (Dang und Semenza 1999). Die erhöhte Glykolyse führt zu einer Akkumulation von Laktat, womit eine erhöhte Aggressivität und ein erhöhter Metastasierungsgrad von Tumoren einhergeht, was in einer schlechten Prognose resultiert (Walenta et al. 2000).

5.3.3 Expression der Laktatdehydrogenase A (ldh-a)

Da Laktat ausschließlich über LDH gebildet wird, wurde die Hypothese überprüft, ob eine positive Korrelation zwischen der ldh-a mRNA Expression und dem Laktatgehalt besteht. Die ldh-a Expression auf mRNA-Ebene zeigte aber keinen Zusammenhang mit der Laktatkonzentration. Ob das Expressionsniveau generell gegenüber nicht-transformierten Zellen erhöht ist wurde nicht untersucht, da keine entsprechenden Normalgewebe zur Verfügung standen. Es ist ohnehin schwierig für Kopf-Hals-Tumoren geeignetes Normalgewebe für vergleichende Studien zu finden. Das Expressionsniveau für ldh-a ist bei fünf von sieben Tumoren höher als für die anderen beiden untersuchten Gene glut1 und pfk-l. Der hypoxische Status der Tumoren dieser Arbeit konnte bisher noch nicht vollständig definiert werden. Umfangreiche Daten liegen bisher nur für die durch Pimonidazolfärbung gemessene hypoxische Fraktion vor. Doch diese Daten stehen genauso wenig wie der Laktatgehalt in Zusammenhang mit dem ldh-a mRNA Gehalt. Die Hypoxie selbst ist aber auch nicht alleine ausschlaggebend für die Aktivierung der Transkription des ldh-Gens (Leo et al. 2004). Der Transkriptionsfaktor HIF wird nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch mehrere andere Stimuli aktiviert (Semenza 2002b, Dery et al. 2005b, Koukourakis et al. 2006), und die Laktatproduktion findet in den vorliegenden Tumoren auch unter Normoxie statt. Darüber hinaus wird die ldh-a Genexpression auch vom c-Myc-Onkogen aktiviert (Papavas et al. 1999, Lewis et al. 2000, Semenza et al. 2001). c-Myc wurde bereits in mehreren Tumorarten mit der ldh-a Induktion und einem darauf folgendem Laktatanstieg in Verbindung gebracht (Shim et al. 1997). Es muss also keine Korrelation zwischen Hypoxie und ldh-a Genexpression bestehen. Die Hypothese, dass ein erhöhter Laktatgehalt die Folge einer erhöhten ldh-a mRNA-Expression ist, konnte nicht bestätigt werden. Somit wird die Laktatproduktion entweder auf Proteinebene reguliert, oder es sind mehrere Mechanismen gleichzeitig an der Aktivierung und Steigerung der ldh-a Expres-

sion beteiligt. Denkbar ist aber auch, dass die LDH-B-Untereinheit eine entscheidendere Rolle bei der Laktatproduktion spielt, als bisher angenommen.

5.3.4 Expression der Phosphofruktokinase L (pfk-l)

Die PFK-1 selbst gilt nicht als in Tumoren vorwiegend überexprimiertes Glykolyseenzym, wohl aber ihre L-Untereinheit (Semenza 2002a). In einigen Tumoren wird PFK-1 allerdings über die Onkogene ras und src hochreguliert (Chesney 2006). Leider gibt es keine Vergleichswerte zu dem Expressionsverhalten in Normalgewebe, aber die Expression der pfk-l schwankt innerhalb der hier untersuchten Tumoren und auch innerhalb der einzelnen Tumorklinen (mit Ausnahme der UT-SCC-15 Tumorklinie) nicht so stark wie die der ldh-a oder auch glut1. Obwohl die Rolle der PFK in Tumoren unklar ist (Pelicano et al. 2006), wurde vermutet, dass die gesteigerte pfk-l Expression einen Einfluss auf die Glykolyserate und somit auf die Laktatproduktion hat. Eine Korrelation zwischen Laktatkonzentration und pfk-l mRNA-Expression konnte aber nicht gefunden werden. Doch die geringeren Schwankungen der Expression zwischen den Tumorklinen lässt vermuten, dass die tumorpathologischen Veränderungen des Glukosestoffwechsels, die zu einem erhöhten glykolytischen Flux führen, nicht an der Expressionsregulation der PFK ansetzen und die PFK auch in Tumoren als Schrittmacherenzym fungiert. Vora et al. (1985) zeigten, dass PFK-Enzyme, die aus den vier L-Untereinheiten zusammengesetzt sind, die geringste Sensitivität bezüglich der Inhibition für Zitat aufweisen, aber die höchste Sensitivität bezüglich der Aktivierung durch Fruktose-2,6-Bisphosphat (F-2,6-BP). Es handelt sich um eine allosterische Aktivierung der PFK-1, die eine Affinitätserhöhung für das Substrat Fruktose-6-Phosphat zur Folge hat (Chesney 2006). Die Glykolyserate ist also auch von der zellulären Fruktose-2,6-Bisphosphat-Konzentration abhängig, die wiederum von der Aktivität der PFK-2 abhängig ist. Die PFK-2 gilt als starker Aktivator der Glykolyse. Blockiert man die PFK-2, stellt man eine verminderte F-2,6-Bisphosphat-Konzentration und infolgedessen eine verminderte Glykolyseaktivität und ATP-Konzentration fest (Calvo et al. 2006). Auch in Tumoren ist die PFK1 das Schrittmacherenzym der Glykolyse, das aber sekundär über die Aktivität der PFK-2 reguliert wird. Viele Tumoren zeigen eine Überexpression der PFK-2 (Bando et al. 2005), bedingt durch HIF-1 α , Onkogene und Wachstumsfaktoren (Minchenko et al. 2004, Chesney 2006). Somit wären die Unterschiede in der Laktatproduktion und -akkumulation zwischen den hier untersuchten Zelllinien gegebenenfalls auf Unterschiede in der PFK-2-Expression zurückzuführen. Dies sollte in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

5.3.5 Expression des Glukosetransporters 1 (glut1)

Der Glukosetransporter GLUT1, dessen Expression in vielen Tumoren ebenfalls durch HIF-1 α und c-Myc Aktivierung erhöht ist (Osthus et al. 2000, Kuo et al. 2006) war nach der ldh-a am zweithöchsten exprimiert und schwankte innerhalb der Tumorklinien am stärksten. Die relative Konzentration von glut1-mRNA steht in keinem Zusammenhang mit dem Laktatgehalt der Tumoren, so dass die Annahme, der hohe Laktatgehalt sei Folge eines erhöhten Glukoseimports in die Zelle, nicht bestätigt werden konnte. Diesen Ergebnissen stehen zahlreiche Befunde der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) entgegen. Diese Methode dient unter Verwendung von [¹⁸F] markierter Fluorodeoxyglukose (FDG) der Beurteilung des zellulären Energiestoffwechsels, da man annimmt, dass die Aufnahmerate der Fluorodeoxyglukose proportional zur zellulären Stoffwechselaktivität ist (Rajendran et al. 2004). Diese Methode zeigt für verschiedene Tumorentitäten eine erhöhte Glukoseaufnahme an. Eine Reihe von Arbeiten allerdings konnte keinen Zusammenhang zwischen der Expression von GLUT1 und der FDG-Aufnahme belegen (Tian et al. 2004). Es ist also möglich, dass die glut1-Expression auf RNA-Ebene zwar gesteigert ist, jedoch nicht grundsätzlich vermehrt Glukose in die Zellen aufgenommen wird. Dafür würde auch die Tatsache sprechen, dass kein Zusammenhang zwischen der glut1-Expression und dem Glukosegehalt in den Tumorschnitten gefunden wurde. Dies kann aber auch die Folge von rascher Umwandlung der Glukose in Glukose-6-Phosphat sein, katalysiert von der Hexokinase, deren Expression in Tumoren ebenfalls hochreguliert ist und zur hohen Glykolyserate beiträgt (Marin-Hernandez et al. 2006). Durch die rasche Umwandlung ist trotz erhöhter Aufnahme über den Glukosetransporter1 die intrazelluläre Konzentration eher niedrig, insbesondere verglichen mit Konzentrationen der Blutglukose (Walenta et al. 2004). Einen Hinweis darauf, dass die Glukose, die in die Zelle aufgenommen wird, auch tatsächlich abgebaut wird, enthält auch der Zusammenhang zwischen der glut1- und pfk-1-Expression.

5.3.6 Zusammenhang zwischen Hypoxie und Genexpression

Die Hypothese, dass die Hypoxie einen Einfluss auf die Genexpression hat, wie es auch schon insbesondere im Fall von glut-1, der ja auch als Hypoxiemarker dient, oft nachgewiesen wurde (Semenza et al. 1994, Ebert et al. 1995, Ebert et al. 1996, Dang und Semenza 1999, (Osthus et al. 2000, Kuo et al. 2006), hat sich bei den vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt. Auch zwischen den Expressionsniveaus von ldh-a und pfk-1 konnte keine Korrelation zur Hypoxie bzw. der pHF nachgewiesen werden. Da Die Hypoxie selbst nicht alleine ausschlaggebend für die Aktivierung der Transkription des ldh-Gens (Leo et al. 2004) ist, kann

dies auch für die Gene *glut1* und *pfk-1* gelten. Dieser Befund trägt zur Diskussion bei, ob GLUT-1 als Hypoxiemarker geeignet ist (Vordermark und Brown 2003, Mayer et al. 2006). Außerdem stellt sich hier die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Transkription und Translation bzw. Transkription und Enzymaktivität besteht. Darüber können allerdings an dieser Stelle keine Angaben gemacht werden, weil Untersuchungen zur Enzymmenge und –aktivität bezüglich GLUT-1 und PFK-L nicht durchgeführt wurden.

5.4 Western Blot

Tumorzellen können eine erhöhte LDH-A-Proteinexpression im Vergleich zu Normalgewebe zeigen (Vila et al. 2000). Das Expressionsniveau im Western Blot unserer Untersuchungen zeigte zwischen den einzelnen Tumorlinien weder im Gewebe noch in reinen Zelllysaten große Unterschiede. Das Expressionsniveau ist nahezu gleich. Es besteht überraschenderweise überhaupt kein Zusammenhang zwischen den PCR-Daten und den Western Blot-Daten. Die Menge der mRNA ist also nicht entscheidend für die Proteinmenge. Dies wird besonders bei der Tumorlinie UT-SCC-5 sehr deutlich, welche die zweithöchste Expression für das Protein LDH-A aufweist, aber die niedrigste mRNA-Expressionsrate für das Gen *ldh-a*. Die erhöhte Glykolyserate scheint nicht über die Transkriptionsrate der Enzyme geregelt zu sein, da diese keine Rückschlüsse über den Proteingehalt zulässt.

So existiert auch kein Zusammenhang zwischen der Laktatkonzentration und dem LDH-A-Proteingehalt. Da der Proteingehalt aber nahezu in allen Tumorzelllinien gleich ist, sich aber deutliche Unterschiede im Laktatgehalt gezeigt haben, ist auch der reine Proteingehalt kein regulatorischer Faktor der Glykolyse. Von sieben Zelllinien zeigt nur die Tumorlinie UT-SCC-5 eine Korrelation zwischen Laktatgehalt und Proteinexpression. Vielmehr scheinen translationale und posttranslationale Prozesse eine Rolle zu spielen. Die Zusammensetzung des Isoenzymmusters kann ausschlaggebend sein, da die Isoenzyme unterschiedliche Aktivitäten bezüglich der Umwandlung von Pyruvat zu Laktat zeigen (Unwin et al. 2003). Die Glykolyserate wird offensichtlich direkt über die Aktivität der entsprechenden Enzyme geregelt, nicht aber über deren Menge.

5.5 Der Zusammenhang zwischen Laktatgehalt und Strahlenresistenz von Xenografts

Ein wichtiges Ergebnis der Studie ist, dass ein hoher Laktatgehalt mit einer erhöhten Strahlenresistenz gekoppelt zu sein scheint. Es zeichnet sich ein sigmoider Zusammenhang zwischen den Parametern Laktat und TCD_{50} ab. Auch wenn ein Tumor (UT-SCC-45) von sieben op-

tisch aus der Korrelation herausfällt, ist dieser Zusammenhang immer noch signifikant. Nach Abschluss und Auswertung der vorliegenden Experimente stellte sich heraus, dass die Tumorzelle UT-SCC-45 stark immunogen ist und sich somit von allen anderen untersuchten Tumorzellen grundsätzlich unterscheidet. So ist beispielsweise denkbar, dass Makrophagen, die auch in immunsupprimierten Mäusen vorhanden sind, in die Tumoren einwandern und deren Laktatgehalt erhöhen. Darüber hinaus stellte sich heraus, dass die Strahlenresistenz immunogener Tumorzellen geringer ist als die nicht-immunogener Linien. In jedem Fall erscheint es gerechtfertigt, diese Tumorzelle von der Betrachtung einer laktatabhängigen Strahlenresistenz auszuschließen. Vorangegangene Studien haben bereits den Zusammenhang zwischen Laktatgehalt und Tumoralternativität hinreichend dokumentiert (Brizel et al. 2001, Walenta et al. 2002) und dabei auch die schlechte Prognose für Patienten dargelegt, die überwiegend einer Strahlentherapie unterzogen worden waren. Die vorliegende Arbeit belegt zum ersten Mal, dass die Strahlenresistenz von Tumoren in einem direkten Zusammenhang mit dem Laktatgehalt stehen kann.

Es ist natürlich sehr wahrscheinlich, dass eine Kombination mehrerer Faktoren die Strahlenresistenz von Tumoren beeinflusst. Daher liegt nahe, dass der Laktatgehalt alleine nicht ausreicht, um das strahlenbiologische Verhalten von Tumoren vorherzusagen. So spielt auch HIF-1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Strahlenempfindlichkeit (Brizel et al. 1997, Moeller und Dewhirst 2006). Der Einfluss von HIF-1 auf Apoptose, Metabolismus, Proliferation und Tumorkreislaufbildung ist dabei von großer Bedeutung.

Laktat dient in Tumoren vor allem als Indikator für eine hohe glykolytische Aktivität, insbesondere für eine hohe Umsatzrate von Pyruvat. Pyruvat ist als Radikalfänger bekannt und kann somit der Strahlentherapie entgegenwirken. Obwohl das Pyruvatniveau im Gewebe relativ niedrig ist ($\leq 1 \mu\text{mol/g}$; (Krause und Wegener 1996), schließt dies nicht eine hohe Umsatzrate von Pyruvat aus und den begleitenden Effekt der Neutralisation von freien Radikalen. Unsere Ergebnisse unterstützen die Arbeitshypothese, dass ein hoher glykolytischer Flux mit einer hohen Umsatzrate an Metaboliten mit Radikalfängerfunktion, wie Pyruvat, einhergeht, die den Tumoren eine Radioresistenz verleihen. Auch die, wenn auch geringere, antioxidative Aktivität von Laktat spielt hier eine Rolle, da Laktat in sehr hohen Konzentrationen vorliegt.

Vorausgesetzt, dass diese Daten in Patientenstudien bestätigt werden können, hätten die Ergebnisse beträchtliche klinische Auswirkung und Relevanz. Es gibt nicht invasive Techniken, wie die Kombination von Magnet-Resonanz-Spektroskopie und ^1H -MRSI, die es ermöglichen den Laktatgehalt in Tumoren von Patienten zu quantifizieren (Laprie et al. 2005,

Raizer et al. 2005). Laktatbestimmungen mit MRSI hat sich bereits als geeignet erwiesen, das Grading von Hirntumoren als Prognoseparameter für das Überleben der Patienten zu bestimmen (Xu et al. 2005a). MRSI könnte somit für eine der Radiotherapie vorangehende Patientenselektion dienen mit Laktat als Marker für die Radioresistenz bzw. die Dosisplanung. Darüber hinaus kann man vermuten, dass der Einsatz von Glykolyseinhibitoren wie 3-Brompyruvat (Xu et al. 2005c) nicht nur generell ein viel versprechendes Tumorbekämpfungsmittel ist, sondern auch dazu dienen kann, die Tumoren mit hoher Glykolyserate vorübergehend direkt vor Bestrahlung für die Radiotherapie zu sensibilisieren.

5.6 Ausblick

Dieses umfangreiche Projekt ist noch nicht abgeschlossen. Es wird zunächst für weitere drei Jahre fortgeführt werden, in denen noch drei weitere Zelllinien in die Untersuchungen miteinbezogen werden, die zu einer Komplettierung der bisherigen Befunde führen werden. Es wird sich zeigen, ob sich der bisher gezeigte Zusammenhang zwischen Laktatgehalt, Hypoxie und Strahlenresistenz mit einem erweiterten Probenkollektiv bestätigen lässt. Es ist sinnvoll zu überprüfen, ob die Stresssituation der Tiere einen Einfluss auf die Glykolyserate hat, damit keine verfälschten Aussagen getroffen werden. Ein weiterer in Zukunft zu beachtender Punkt ist die Tatsache, dass aus Dresden die Information kam, dass sich Unterschiede zwischen dem *in vitro* und *in vivo* Verhalten der Zellen zeigen. Bei unseren Untersuchungen konnte in den Western Blot-Untersuchungen kein Unterschied gefunden werden zwischen der Proteinexpression von Biopsien und Zelllysaten. Auch eine Hypoxiebehandlung führte zu keinen signifikanten Unterschieden. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern aber einen eindeutigen Hinweis darauf, dass ein erhöhter glykolytischer Flux, der eine Laktatanhäufung zur Folge hat, Einfluss auf die Strahlenresistenz von Tumoren nimmt. Dies ist eine wertvolle Erkenntnis für die Zukunft der Strahlentherapie, da es so möglich werden kann, Tumoren im Vorfeld einer Radiotherapie eindeutiger zu charakterisieren und deren Therapieverhalten gezielter zu beeinflussen. Für die Zukunft scheint es sinnvoll zu untersuchen, ob, und wenn ja wie, sich das metabolische Mikromilieu zu verschiedenen Zeitpunkten einer Strahlenbehandlung verändert. Sicherlich ist die Frage, warum Tumoren gleicher Stadien und gleicher Pathohistologie derart unterschiedliche Mengen Laktat anreichern, noch weitgehend ungeklärt. Die vorliegenden Befunde sprechen eher gegen eine transkriptionelle Regulation des glykolytischen Fluxes. Zukünftige Untersuchungen sollten sich daher eher auf Mechanismen der Aktivitätsregulierung konzentrieren, wie z. B. auf das Regulatorsystem der PKF-2.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Stoffwechseluntersuchungen an Experimentaltumoren von humanen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches mit bekannter Strahlenempfindlichkeit durchzuführen. Die Resultate sollten mit dem Genexpressionsniveau glykolyseassoziierter Transportproteine und Enzyme, der Proteinexpression von LDH-A, der Hypoxie und der Strahlenresistenz der Tumoren korreliert werden. Während die Tumorproben und die Daten zum biologischen Strahlenverhalten und zur Charakterisierung der Hypoxie aus Dresden stammen, wurden alle anderen Untersuchungen in Mainz durchgeführt. Ein wichtiges Merkmal der kooperativen Studie bestand darin, dass erstmals die Strahlenresistenz von Experimentaltumoren systematisch in einem klinischen Fraktionierungsschema untersucht wurde.

Die lokale Bestimmung der Gewebskonzentrationen der Metabolite ATP, Glukose und Laktat erfolgte mit dem Verfahren der bildgebenden Biolumineszenz. Die Auswertung der Ergebnisse mit Unterstützung von Bildverarbeitungs-Software wurde weiterentwickelt und in wesentlichen Punkten verbessert.

Zur Ermittlung des mRNA-Expressionsniveaus der Glykolyseenzyme PFK-L und LDH-A sowie des Glukosetransporters GLUT1 diente die real time RT-PCR-Methode. Ein Kernpunkt des methodischen Teils der vorliegenden Arbeit bildeten die Validierung und Etablierung dieses Verfahrens. Durch die Anwendung dieser Technik war es möglich, eine relative Quantifizierung des Expressionslevels durchzuführen.

Die Western Blot-Analyse lieferte Aussagen über den Proteingehalt von LDH-A. Dabei kam ein neues Auswerteverfahren durch Anwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper zum Einsatz.

Die Ergebnisse zeigten erstmals einen direkten Zusammenhang zwischen dem Laktatgehalt von Tumoren und deren Strahlenresistenz. Es wurde im Vergleich zu früheren klinischen Untersuchungen eine Einstufung in Hoch- und Niedriglaktattumoren vorgenommen und eine signifikante Korrelation innerhalb der Hochlaktattumoren zwischen dem Laktatgehalt und der über Pimonidazol quantifizierten hypoxischen Fraktion festgestellt. Während die PCR Unterschiede in den drei untersuchten Genen auf transkriptioneller Ebene zwischen den sieben untersuchten Tumorlinien erkennen ließ, waren die Western Blot-Ergebnisse nahezu gleich. Da auch die Western Blot-Analysen keine Übereinstimmungen mit dem Laktatgehalt zeigten, kann auch der reine Proteingehalt keine Rolle als aktivitätsbestimmende Größe der Glykolyse spielen. Vielmehr scheinen Aktivierungs- und posttranslationale Prozesse oder auch eine Kombination mehrerer Faktoren eine Rolle zu spielen. Letztlich deuten die Befunde darauf

hin, dass die glykolytische Aktivität der untersuchten Tumoren nicht über Transkription und Proteinexpression reguliert wird.

Der Zusammenhang zwischen dem Laktatgehalt und der Strahlenresistenz der Tumoren kann von großer klinischer Bedeutung sein, da ein klinisch relevantes Fraktionierungsschema bei der Bestrahlung angewandt wurde. Unsere Ergebnisse bestätigen die Arbeitshypothese, dass ein hoher glykolytischer Flux mit einer hohen Umsatzrate an Metaboliten mit Radikalfängerfunktion, wie Pyruvat, einhergeht, die den Tumoren eine Radioresistenz verleihen. Der Laktatgehalt von Biopsien als Marker für die Strahlenresistenz könnte in Zukunft zu einer der Radiotherapie vorangehenden Patientenselektion herangezogen werden, um die Therapie- und insbesondere Dosisplanung in der Onkologie zu unterstützen.

7 Literaturverzeichnis

1. Arteel, G. E., Thurman, R. G. und Raleigh, J. A. Reductive metabolism of the hypoxia marker pimonidazole is regulated by oxygen tension independent of the pyridine nucleotide redox state. *Eur. J. Biochem.* 253 (3), 743-750, 1998.
2. Bando, H., Atsumi, T., Nishio, T., Niwa, H., Mishima, S., Shimizu, C., Yoshioka, N., Bucala, R. und Koike, T. Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clin. Cancer Res.* 11 (16), 5784-5792, 2005.
3. Bonny, C., Cooker, L. A. und Goldberg, E. Deoxyribonucleic acid-protein interactions and expression of the human testis-specific lactate dehydrogenase promoter: transcription factor Sp1 plays a major role. *Biol. Reprod.* 58 (3), 754-759, 1998.
4. Brand, K. A. und Hermfisse, U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J.* 11 (5), 388-395, 1997a.
5. Brand, K. A. und Hermfisse, U. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J.* 11 (5), 388-395, 1997b.
6. Brizel, D. M., Schroeder, T., Scher, R. L., Walenta, S., Clough, R. W., Dewhirst, M. W. und Mueller-Klieser, W. 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, 2001.
7. Brizel, D. M., Sibley, G. S., Prosnitz, L. R., Scher, R. L. und Dewhirst, M. W. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 38 (2), 285-289, 1997.
8. Bussink, J., Kaanders, J. H. und van der Kogel, A. J. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother. Oncol.* 67 (1), 3-15, 2003.
9. Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25 (2), 169-193, 2000.
10. Calvo, M. N., Bartrons, R., Castano, E., Perales, J. C., Navarro-Sabate, A. und Manzano, A. PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Lett.* 580 (13), 3308-3314, 2006.
11. Carew, J. S. und Huang, P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol. Cancer* 1, 9, 2002.
12. Chesney, J. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* 9 (5), 535-539, 2006.
13. Cuezva, J. M., Krajewska, M., de Heredia, M. L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J. M., Marusawa, H., Chamorro, M. und Reed, J. C. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.* 62 (22), 6674-6681, 2002.

14. Dang, C. V. und Semenza, G. L. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 24 (2), 68-72, 1999.
15. Dery, M. A., Michaud, M. D. und Richard, D. E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (3), 535-540, 2005b.
16. Dery, M. A., Michaud, M. D. und Richard, D. E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (3), 535-540, 2005a.
17. Ebert, B. L., Firth, J. D. und Ratcliffe, P. J. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J. Biol. Chem.* 270 (49), 29083-29089, 1995.
18. Ebert, B. L., Gleadle, J. M., O'Rourke, J. F., Bartlett, S. M., Poulton, J. und Ratcliffe, P. J. Isoenzyme-specific regulation of genes involved in energy metabolism by hypoxia: similarities with the regulation of erythropoietin. *Biochem. J.* 313 (Pt 3), 809-814, 1996.
19. Firth, J. D., Ebert, B. L., Pugh, C. W. und Ratcliffe, P. J. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91 (14), 6496-6500, 1994.
20. Firth, J. D., Ebert, B. L. und Ratcliffe, P. J. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J. Biol. Chem.* 270 (36), 21021-21027, 1995.
21. Furudoi, A., Tanaka, S., Haruma, K., Yoshihara, M., Sumii, K., Kajiyama, G. und Shimamoto, F. Clinical significance of human erythrocyte glucose transporter 1 expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology* 60 (2), 162-169, 2001.
22. Gatenby, R. A. und Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4 (11), 891-899, 2004.
23. Gleadle, J. M. und Ratcliffe, P. J. Hypoxia and the regulation of gene expression. *Mol. Med. Today* 4 (3), 122-129, 1998.
24. Gray, C. H. Glycosuria and hyperglycaemia. *Br. Med. J.* 2 (4850), 1367-1369, 1953.
25. Groussard, C., Morel, I., Chevanne, M., Monnier, M., Cillard, J. und Delamarche, A. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J. Appl. Physiol* 89 (1), 169-175, 2000.
26. Haber, R. S., Rathan, A., Weiser, K. R., Pritsker, A., Itzkowitz, S. H., Bodian, C., Slater, G., Weiss, A. und Burstein, D. E. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: a marker for poor prognosis. *Cancer* 83 (1), 34-40, 1998.
27. Hermanek, P., Hutter, R. V. P., Sobin, L. H., Wagner, G. und Wittekind, C. TNM-Atlas. Springer, Berlin. 1998.

28. Hockel, M., Schlenger, K., Mitze, M., Schaffer, U. und Vaupel, P. Hypoxia and Radiation Response in Human Tumors. *Semin. Radiat. Oncol.* 6 (1), 3-9, 1996.
29. Hockel, M. und Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93 (4), 266-276, 2001b.
30. Hockel, M. und Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93 (4), 266-276, 2001a.
31. Hockel, M. und Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93 (4), 266-276, 2001c.
32. Jankovic, B., Aquino-Parsons, C., Raleigh, J. A., Stanbridge, E. J., Durand, R. E., Banath, J. P., MacPhail, S. H. und Olive, P. L. Comparison between pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and expression of endogenous hypoxia markers in cancer of the uterine cervix. *Cytometry B Clin. Cytom.* 70 (2), 45-55, 2006.
33. Kang, S. S., Chun, Y. K., Hur, M. H., Lee, H. K., Kim, Y. J., Hong, S. R., Lee, J. H., Lee, S. G. und Park, Y. K. Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 93 (10), 1123-1128, 2002.
34. Kawamura, T., Kusakabe, T., Sugino, T., Watanabe, K., Fukuda, T., Nashimoto, A., Honma, K. und Suzuki, T. Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma: association with tumor aggressiveness, metastasis, and patient survival. *Cancer* 92 (3), 634-641, 2001.
35. Kim, S. J., Rabbani, Z. N., Vollmer, R. T., Schreiber, E. G., Oosterwijk, E., Dewhirst, M. W., Vujaskovic, Z. und Kelley, M. J. Carbonic anhydrase IX in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 10 (23), 7925-7933, 2004.
36. Kopperschlager, G. und Kirchberger, J. Methods for the separation of lactate dehydrogenases and clinical significance of the enzyme. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 684 (1-2), 25-49, 1996.
37. Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A. und Sivridis, E. Lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5: differential expression by neoplastic and stromal cells in non-small cell lung cancer and other epithelial malignant tumors. *Tumour. Biol.* 24 (4), 199-202, 2003.
38. Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Gatter, K. C. und Harris, A. L. Lactate Dehydrogenase 5 Expression in Operable Colorectal Cancer: Strong Association With Survival and Activated Vascular Endothelial Growth Factor Pathway: A Report of the Tumour Angiogenesis Research Group. *J. Clin. Oncol.* 2006.
39. Krause, U. und Wegener, G. Control of glycolysis in vertebrate skeletal muscle during exercise. *Am. J. Physiol* 270 (4 Pt 2), R821-R829, 1996.
40. Kuo, S. J., Wu, Y. C., Chen, C. P., Tseng, H. S. und Chen, D. R. Expression of glucose transporter-1 in Taiwanese patients with breast carcinoma--a preliminary report. *Kaohsiung. J. Med. Sci.* 22 (7), 339-345, 2006.

41. Kurata, T., Oguri, T., Isobe, T., Ishioka, S. und Yamakido, M. Differential expression of facilitative glucose transporter (GLUT) genes in primary lung cancers and their liver metastases. *Jpn. J. Cancer Res.* 90 (11), 1238-1243, 1999.
42. Laprie, A., Pirzkall, A., Haas-Kogan, D. A., Cha, S., Banerjee, A., Le, T. P., Lu, Y., Nelson, S. und McKnight, T. R. Longitudinal multivoxel MR spectroscopy study of pediatric diffuse brainstem gliomas treated with radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 62 (1), 20-31, 2005.
43. Leo, C., Giaccia, A. J. und Denko, N. C. The hypoxic tumor microenvironment and gene expression. *Semin. Radiat. Oncol.* 14 (3), 207-214, 2004.
44. Lewis, B. C., Prescott, J. E., Campbell, S. E., Shim, H., Orlowski, R. Z. und Dang, C. V. Tumor induction by the c-Myc target genes *rcl* and lactate dehydrogenase A. *Cancer Res.* 60 (21), 6178-6183, 2000.
45. Macheda, M. L., Rogers, S. und Best, J. D. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J. Cell Physiol* 202 (3), 654-662, 2005.
46. Manning Fox, J. E., Meredith, D. und Halestrap, A. P. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J. Physiol* 529 Pt 2, 285-293, 2000.
47. Marin-Hernandez, A., Rodriguez-Enriquez, S., Vital-Gonzalez, P. A., Flores-Rodriguez, F. L., Macias-Silva, M., Sosa-Garrocho, M. und Moreno-Sanchez, R. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS J.* 273 (9), 1975-1988, 2006.
48. Mayer, A., Hockel, M. und Vaupel, P. Endogenous Hypoxia Markers in Locally Advanced Cancers of the Uterine Cervix: Reality or Wishful Thinking? *Strahlenther. Onkol.* 182 (9), 501-510, 2006.
49. Minchenko, O., Opentanova, I., Minchenko, D., Ogura, T. und Esumi, H. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation. *FEBS Lett.* 576 (1-2), 14-20, 2004.
50. Moeller, B. J. und Dewhirst, M. W. HIF-1 and tumour radiosensitivity. *Br. J. Cancer* 95 (1), 1-5, 2006.
51. O'Donnell-Tormey, J., Nathan, C. F., Lanks, K., DeBoer, C. J. und de la, H. J. Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *J. Exp. Med.* 165 (2), 500-514, 1987.
52. Olive, P. L., Aquino-Parsons, C., MacPhail, S. H., Liao, S. Y., Raleigh, J. A., Lerman, M. I. und Stanbridge, E. J. Carbonic anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer. *Cancer Res.* 61 (24), 8924-8929, 2001.
53. Opavsky, R., Pastorekova, S., Zelnik, V., Gibadulinova, A., Stanbridge, E. J., Zavada, J., Kettmann, R. und Pastorek, J. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics* 33 (3), 480-487, 1996.

54. Oskam, R., Rijksen, G., Staal, G. E. und Vora, S. Isozymic composition and regulatory properties of phosphofructokinase from well-differentiated and anaplastic medullary thyroid carcinomas of the rat. *Cancer Res.* 45 (1), 135-142, 1985.
55. Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L. A. und Dang, C. V. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 275 (29), 21797-21800, 2000.
56. Papas, K. K., Sun, L., Roos, E. S., Gounarides, J. S., Shapiro, M. und Nalin, C. M. Change in lactate production in Myc-transformed cells precedes apoptosis and can be inhibited by Bcl-2 overexpression. *FEBS Lett.* 446 (2-3), 338-342, 1999.
57. Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R. H. und Huang, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25 (34), 4633-4646, 2006.
58. Penta, J. S., Johnson, F. M., Wachsman, J. T. und Copeland, W. C. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat. Res.* 488 (2), 119-133, 2001.
59. Perez, J. X., Roig, T., Manzano, A., Dalmau, M., Boada, J., Ventura, F., Rosa, J. L., Bermudez, J. und Bartrons, R. Overexpression of fructose 2,6-bisphosphatase decreases glycolysis and delays cell cycle progression. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 279 (5), C1359-C1365, 2000.
60. Potter, C. P. und Harris, A. L. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *Br. J. Cancer* 89 (1), 2-7, 2003.
61. Puccetti, L., Fasolis, G., Vullo, D., Chohan, Z. H., Scozzafava, A. und Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, IX, and XII with Schiff's bases incorporating chromone and aromatic sulfonamide moieties, and their zinc complexes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (12), 3096-3101, 2005.
62. Rafajova, M., Zatovicova, M., Kettmann, R., Pastorek, J. und Pastorekova, S. Induction by hypoxia combined with low glucose or low bicarbonate and high posttranslational stability upon reoxygenation contribute to carbonic anhydrase IX expression in cancer cells. *Int. J. Oncol.* 24 (4), 995-1004, 2004.
63. Raizer, J. J., Koutcher, J. A., Abrey, L. E., Panageas, K. S., DeAngelis, L. M., Lis, E., Xu, S. und Zakian, K. L. Proton magnetic resonance spectroscopy in immunocompetent patients with primary central nervous system lymphoma. *J. Neurooncol.* 71 (2), 173-180, 2005.
64. Rajendran, J. G., Mankoff, D. A., O'Sullivan, F., Peterson, L. M., Schwartz, D. L., Conrad, E. U., Spence, A. M., Muzi, M., Farwell, D. G. und Krohn, K. A. Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clin. Cancer Res.* 10 (7), 2245-2252, 2004.
65. Rudlowski, C., Becker, A. J., Schroder, W., Rath, W., Buttner, R. und Moser, M. GLUT1 messenger RNA and protein induction relates to the malignant transformation of cervical cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 120 (5), 691-698, 2003.

66. Salceda, S., Beck, I. und Caro, J. Absolute requirement of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein for gene activation by hypoxia. *Arch. Biochem. Biophys.* 334 (2), 389-394, 1996.
67. Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
68. Sanchez-Martinez, C. und Aragon, J. J. Analysis of phosphofructokinase subunits and isozymes in ascites tumor cells and its original tissue, murine mammary gland. *FEBS Lett.* 409 (1), 86-90, 1997.
69. Schroeder, T. Die prognostische Bedeutung des Laktatgehaltes in Plattenepithelkarzinomen des menschlichen Kopf-Hals-Bereichs. *Universität Mainz*, 2002.
70. Seagroves, T. N., Ryan, H. E., Lu, H., Wouters, B. G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute, K. und Johnson, R. S. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 21 (10), 3436-3444, 2001.
71. Semenza, G. L. Perspectives on oxygen sensing. *Cell* 98 (3), 281-284, 1999.
72. Semenza, G. L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol. Med.* 8 (4 Suppl), S62-S67, 2002a.
73. Semenza, G. L. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Intern. Med.* 41 (2), 79-83, 2002b.
74. Semenza, G. L., Artemov, D., Bedi, A., Bhujwala, Z., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Ravi, R., Simons, J., Taghavi, P. und Zhong, H. 'The metabolism of tumours': 70 years later. *Novartis. Found. Symp.* 240, 251-260, 2001.
75. Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M. und Wang, G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 269 (38), 23757-23763, 1994.
76. Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R. und Dang, C. V. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94 (13), 6658-6663, 1997.
77. Svastova, E., Hulikova, A., Rafajova, M., Zat'ovicova, M., Gibadulinova, A., Casini, A., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Pastorek, J. und Pastorekova, S. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett.* 577 (3), 439-445, 2004.
78. Thiry, A., Dogne, J. M., Masereel, B. und Supuran, C. T. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (11), 566-573, 2006.
79. Tian, M., Zhang, H., Nakasone, Y., Mogi, K. und Endo, K. Expression of Glut-1 and Glut-3 in untreated oral squamous cell carcinoma compared with FDG accumulation in a PET study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 31 (1), 5-12, 2004.
80. Tohma, T., Okazumi, S., Makino, H., Cho, A., Mochizuki, R., Shuto, K., Kudo, H., Matsubara, K., Gunji, H., Matsubara, H. und Ochiai, T. Overexpression of glucose

- transporter 1 in esophageal squamous cell carcinomas: a marker for poor prognosis. *Dis. Esophagus*. 18 (3), 185-189, 2005.
81. Unwin, R. D., Craven, R. A., Harnden, P., Hanrahan, S., Totty, N., Knowles, M., Eardley, I., Selby, P. J. und Banks, R. E. Proteomic changes in renal cancer and coordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics*. 3 (8), 1620-1632, 2003.
 82. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. und Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 (7), RESEARCH0034, 2002.
 83. Vaupel, P., Kelleher, D. K. und Hockel, M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin. Oncol.* 28 (2 Suppl 8), 29-35, 2001a.
 84. Vaupel, P., Thews, O. und Hoeckel, M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med. Oncol.* 18 (4), 243-259, 2001b.
 85. Vila, M. R., Nicolas, A., Morote, J., de, I. und Meseguer, A. Increased glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in renal cell carcinoma identified by RNA-based, arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Cancer* 89 (1), 152-164, 2000.
 86. Vora, S., Halper, J. P. und Knowles, D. M. Alterations in the activity and isozymic profile of human phosphofructokinase during malignant transformation in vivo and in vitro: transformation- and progression-linked discriminants of malignancy. *Cancer Res.* 45 (7), 2993-3001, 1985.
 87. Vordermark, D. und Brown, J. M. Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance? *Strahlenther. Onkol.* 179 (12), 801-811, 2003.
 88. Walenta, S., Schroeder, T. und Mueller-Klieser, W. Metabolic mapping with bioluminescence: basic and clinical relevance. *Biomol. Eng* 18 (6), 249-262, 2002.
 89. Walenta, S., Schroeder, T. und Mueller-Klieser, W. Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr. Med. Chem.* 11 (16), 2195-2204, 2004.
 90. Walenta, S., Wetterling, M., Lehrke, M., Schwickert, G., Sundfor, K., Rofstad, E. K. und Mueller-Klieser, W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res.* 60 (4), 916-921, 2000.
 91. Whelan, J. A., Russell, N. B. und Whelan, M. A. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J. Immunol. Methods* 278 (1-2), 261-269, 2003.
 92. Wright, E. A. und Howard-Flanders, P. The influence of oxygen on the radiosensitivity of mammalian tissues. *Acta Radiol.* 48 (1), 26-32, 1957.

93. Wykoff, C. C., Beasley, N. J., Watson, P. H., Turner, K. J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G. D., Turley, H., Talks, K. L., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. und Harris, A. L. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 60 (24), 7075-7083, 2000.
94. Xu, M., See, S. J., Ng, W. H., Arul, E., Back, M. F., Yeo, T. T. und Lim, C. C. Comparison of magnetic resonance spectroscopy and perfusion-weighted imaging in presurgical grading of oligodendroglial tumors. *Neurosurgery* 56 (5), 919-926, 2005a.
95. Xu, R. H., Pelicano, H., Zhou, Y., Carew, J. S., Feng, L., Bhalla, K. N., Keating, M. J. und Huang, P. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* 65 (2), 613-621, 2005b.
96. Xu, W. D., Gu, Y. D., Lu, J. B., Yu, C., Zhang, C. G. und Xu, J. G. Pulmonary function after complete unilateral phrenic nerve transection. *J. Neurosurg.* 103 (3), 464-467, 2005c.
97. Yaromina, A., Holscher, T., Eicheler, W., Rosner, A., Krause, M., Hessel, F., Petersen, C., Thames, H. D., Baumann, M. und Zips, D. Does heterogeneity of pimonidazole labelling correspond to the heterogeneity of radiation-response of FaDu human squamous cell carcinoma? *Radiother. Oncol.* 76 (2), 206-212, 2005.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AM	Anti-Maus
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
CA IX	Carboanhydrase IX
cAMP	zyklisches AMP
cDNA	copy DNA
DEPC	Diethyl-Pyrokarbonat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
FDG	Fluorodeoxyglukose
FET	Fluoreszenzenergietransfer
FMN	Flavin-Mononukleotid
F-2,6-BP	Fruktose-2,6-Bisphosphat
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Glc	Glukose
GLUT1	Glukosetransporter 1
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Gy	Grey
h	Stunde
HMBS	Hydroxy-Methyl-Bilane-Synthase
H/E	Hämatoxylin (bzw. Hämalaun)/ Eosin
HG	Quecksilber
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HK	Hexokinase
HPV	Humanes Papilloma Virus
kDa	kilo Dalton
Lak	Laktat
LDH	Laktatdehydrogenase
mA	mili Ampere
Max	Maximalwert
MCT	Monocarboxylat-Transportprotein
Med	Median
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minimalwert
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
MRSI	Magnet-Resonanz-Spektroskopie und -imaging
mtDNA	mitochondriale DNA
MW	Mittelwert
NAD	Nikotin-Adenin-Dinukleotid

NADP	Nikotin-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OD	Optische Dichte
PAGE	Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFK	Phosphofruktokinase
PGK	Phosphoglyceratkinase
PK	Pyruvatkinase
pHF	Pimonidazol definierte Hypoxische Fraktion
rHF	radiobiologische Hypoxische Fraktion
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription/ Trankriptase
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCD ₅₀	Tumor Contril Dose 50 %
Temed	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
V	Volt

8.2 Tabellarische Auflistung der Einzeldaten der Biolumineszenz

Tabelle 8.1: Metabolitkonzentrationen der Tumorlinie XF354: Es sind die Daten für ATP, Glukose und Laktat aufgelistet, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Med: Median, Perz: Perzentile, Min: Minimalwert, Max: Maximalwert

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
178	1,2	0,6	1,2	0,5	2,0	0,1	4,3
180	2,3	0,9	2,3	1,1	3,5	0,1	5,0
181	1,6	0,9	1,5	0,6	2,8	0,1	5,0
258	1,2	0,6	1,2	0,5	2,0	0,1	4,6
259	2,2	0,9	2,2	1,0	3,4	0,1	5,0
476							
477	0,9	0,5	0,8	0,3	1,5	0,1	3,8
478	1,4	0,6	1,4	0,6	2,2	0,1	5,0
546	2,0	0,8	1,9	0,9	3,1	0,1	5,0
715	0,9	0,5	0,8	0,3	1,5	0,1	3,6
717	1,3	0,6	1,2	0,5	2,2	0,1	4,8
718	1,8	1,0	1,7	0,6	3,1	0,1	5,0

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
178	2,1	1,4	1,7	0,9	4,0	0,0	12,0
180	0,7	0,7	0,5	0,1	1,6	0,0	8,2
181	0,4	0,3	0,3	0,1	0,8	0,0	6,1
258	1,3	1,2	1,0	0,3	2,7	0,0	9,8
259	0,6	0,5	0,5	0,1	1,2	0,0	5,7
476	1,0	0,8	0,7	0,2	2,0	0,0	9,9
477	2,6	1,6	2,2	1,0	4,8	0,0	12,0
478	1,0	0,6	0,9	0,5	1,9	0,0	5,0
546	0,9	0,6	0,7	0,3	1,8	0,0	6,5
715	3,3	1,7	3,1	1,3	5,6	0,0	12,0
717	1,5	1,2	1,1	0,4	3,2	0,0	10,4
718	2,4	1,6	2,0	0,8	4,6	0,1	12,0

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
178	7,5	4,3	6,5	3,0	13,0	0,1	29,3
180	5,6	3,4	4,8	2,3	9,7	0,1	29,3
181	5,0	2,8	4,4	2,2	8,3	0,1	29,3
258	7,0	3,8	6,4	2,8	11,8	0,1	29,3
259	7,8	4,1	7,1	3,5	12,7	0,1	29,3
476	6,0	3,7	5,0	2,3	10,9	0,1	29,3
477	9,6	4,9	8,8	4,2	16,0	0,1	29,3
478	10,1	5,3	9,3	3,9	17,0	0,1	29,3
546	8,2	4,1	7,8	3,5	13,2	0,1	29,3
715	6,4	3,7	5,7	2,7	10,8	0,1	29,3
717	7,2	4,3	6,3	2,8	12,7	0,1	29,3
718	6,4	4,2	5,4	2,2	12,0	0,1	29,3

Tabelle 8.2: Metabolitkonzentrationen der Tumorlinie UT-SCC-14: Es sind die Daten für ATP, Glukose und Laktat aufgelistet, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Med: Median, Perz: Perzentile, Min: Minimalwert, Max: Maximalwert

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
131	2,9	1,1	2,9	1,4	4,3	0,1	5,0
132	2,6	0,9	2,6	1,4	3,8	0,0	5,0
133	2,6	1,1	2,6	1,2	4,1	0,0	5,0
134	2,4	0,9	2,3	1,2	3,7	0,1	5,0
557	1,5	0,8	1,5	0,5	2,7	0,0	5,0
558	2,2	0,9	2,1	1,2	3,4	0,0	5,0
559	1,9	1,0	1,7	0,6	3,3	0,0	5,0
560	1,3	0,7	1,2	0,6	2,2	0,0	5,0
603	1,3	0,9	1,2	0,2	2,6	0,0	5,0
604	1,4	0,7	1,4	0,6	2,3	0,0	5,0
605	2,5	0,9	2,5	1,4	3,7	0,0	5,0
606	1,9	1,1	1,8	0,5	3,3	0,0	5,0

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
131	2,8	1,8	2,6	0,5	5,2	0,0	12,0
132	5,5	2,2	5,3	2,9	8,4	0,2	12,0
133	2,2	1,4	1,9	0,7	4,0	0,0	12,0
134	3,2	1,9	3,1	0,8	5,7	0,0	12,0
557	3,1	1,7	2,8	1,2	5,3	0,1	11,6
558	4,2	2,4	4,0	1,3	7,4	0,0	12,0
559	2,4	2,0	1,9	0,4	5,1	0,0	12,0
560	4,5	2,7	4,3	1,2	8,4	0,2	12,0
603	0,5	0,5	0,4	0,1	1,2	0,0	4,6
604	1,3	1,1	0,9	0,3	2,9	0,0	7,9
605	2,5	1,5	2,2	0,8	4,7	0,0	12,0
606	3,2	2,1	2,9	0,7	6,0	0,0	12,0

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
131	12,4	5,9	11,3	5,8	20,9	1,2	29,9
132	13,6	5,7	12,8	7,0	22,1	0,0	29,9
133	15,4	7,5	14,8	5,8	26,3	0,0	29,9
134	14,6	6,9	13,6	6,3	24,9	0,0	29,9
557	7,3	4,2	6,3	3,1	12,6	0,2	29,9
558	12,2	6,7	10,4	5,1	22,9	0,0	29,9
559	15,2	6,9	14,3	6,8	25,6	0,2	29,9
560	10,6	7,1	9,1	2,7	21,4	0,2	29,9
603	11,6	7,2	9,3	3,9	23,2	0,0	29,9
604	11,0	7,1	8,9	3,5	22,2	0,1	29,9
605	3,2	4,1	1,6	0,7	8,3	0,0	29,9
606	15,0	7,4	13,7	6,1	26,0	0,1	29,9

Tabelle 8.3: Metabolitkonzentrationen der Tumورlinie UT-SCC-15: Es sind die Daten für ATP, Glukose und Laktat aufgelistet, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Med: Median, Perz: Perzentile, Min: Minimalwert, Max: Maximalwert

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
95	3,0	1,1	3,1	1,5	4,4	0,0	5,0
96	2,3	1,1	2,2	0,9	4,0	0,0	5,0
98	2,8	1,2	2,8	1,1	4,4	0,0	5,0
109	2,4	1,0	2,3	1,0	3,7	0,0	5,0
229	2,4	1,0	2,4	1,2	3,8	0,0	5,0
230	2,7	1,1	2,7	1,3	4,2	0,0	5,0
232	2,2	1,1	2,2	0,8	3,6	0,0	5,0
259	2,6	1,1	2,6	1,0	4,2	0,0	5,0
262	2,9	1,3	3,1	0,8	4,4	0,0	5,0
263	2,6	1,1	2,6	1,1	4,2	0,0	5,0
264	2,0	1,2	1,9	0,5	3,7	0,0	5,0

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
95	1,9	1,1	1,7	0,7	3,4	0,0	7,5
96	1,3	1,1	1,0	0,3	2,8	0,0	8,3
98	2,8	2,4	2,1	0,5	6,2	0,0	12,0
109	1,1	1,0	0,9	0,2	2,4	0,0	11,8
229	4,6	2,4	4,3	1,7	7,8	0,0	12,0
230	3,5	2,7	2,8	0,6	7,8	0,0	12,0
232	3,7	1,9	3,5	1,4	6,2	0,0	12,0
259	1,7	1,2	1,4	0,5	3,2	0,0	8,4
262	2,5	1,9	2,0	0,5	5,1	0,0	12,0
263	1,8	1,2	1,6	0,5	3,5	0,0	10,3
264	3,0	2,0	2,6	0,7	5,7	0,0	12,0

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
95	15,6	6,6	14,4	7,6	25,8	1,6	29,9
96	18,1	11,1	15,2	7,0	34,4	1,4	56,1
98	14,2	6,6	13,1	6,4	24,2	0,0	29,9
109	11,9	7,4	9,9	3,8	23,4	0,4	29,9
229	14,2	6,5	13,1	6,5	24,1	0,0	29,9
230	13,4	6,4	12,2	6,0	23,0	0,0	29,9
232	12,6	6,9	11,2	4,6	23,4	0,6	29,9
259	16,8	7,2	16,8	7,1	26,8	0,3	29,9
262	12,3	6,3	10,7	5,4	22,1	0,0	29,9
263	12,8	5,9	11,6	6,1	21,7	0,7	29,9
264	18,8	10,7	16,2	7,4	34,1	1,1	56,1

Tabelle 8.4: Metabolitkonzentrationen der Tumورlinie FaDu: Es sind die Daten für ATP, Glukose und Laktat aufgelistet, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Med: Median, Perz: Perzentile, Min: Minimalwert, Max: Maximalwert

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
364	1,5	1,1	1,3	0,3	3,2	0,0	5,0
372	1,8	1,2	1,5	0,3	3,6	0,0	5,0
837	0,3	0,3	0,2	0,0	0,7	0,0	1,9
843	2,0	1,3	1,9	0,4	4,0	0,0	5,0
844	2,6	1,3	2,6	0,8	4,4	0,0	5,0
845	2,0	1,3	1,8	0,5	3,9	0,0	5,0
846	1,9	1,1	1,6	0,6	3,5	0,0	5,0
871	0,5	0,4	0,4	0,1	1,0	0,0	2,8
872	1,7	1,2	1,4	0,3	3,4	0,0	5,0
873	1,6	1,0	1,4	0,5	3,1	0,0	5,0
874	0,5	0,3	0,4	0,1	0,9	0,0	2,4
905	0,9	0,5	0,8	0,3	1,5	0,0	4,4

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
364	0,4	0,4	0,3	0,1	0,9	0,0	7,6
372	0,6	0,7	0,3	0,1	1,4	0,0	7,5
837	0,4	0,5	0,3	0,1	1,1	0,0	5,6
843	2,7	1,8	2,7	0,5	5,0	0,0	12,0
844	1,3	1,2	1,0	0,2	2,9	0,0	12,0
845	0,5	0,6	0,2	0,1	1,2	0,0	8,6
846	2,6	2,4	1,8	0,4	6,3	0,0	12,0
871	1,1	1,3	0,5	0,1	2,9	0,0	12,0
872	0,8	1,0	0,5	0,1	1,7	0,0	11,0
873	0,5	0,6	0,3	0,1	1,2	0,0	6,2
874	0,8	0,9	0,4	0,2	2,0	0,0	9,0
905	1,2	1,2	0,8	0,2	3,0	0,0	9,2

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
364	16,3	9,2	13,9	7,6	28,4	0,0	56,1
372	20,4	10,4	18,4	9,1	35,1	0,0	56,1
837	13,0	9,0	10,9	4,2	24,6	0,0	56,1
843	15,5	8,5	13,5	7,0	26,9	0,4	56,1
844	14,7	8,9	12,9	5,7	26,1	0,0	56,1
845	15,9	9,9	13,1	6,4	29,6	0,0	56,1
846	13,9	9,3	11,4	5,2	26,1	0,0	56,1
871	20,9	11,3	18,5	8,3	37,7	0,6	56,1
872	17,8	10,0	15,7	7,1	31,6	0,0	56,1
873	18,2	11,6	15,5	6,0	35,4	0,0	56,1
874	17,8	9,5	15,6	7,8	31,1	0,6	56,1
905	17,8	9,7	15,8	7,4	30,8	0,0	56,1

Tabelle 8.5: Metabolitkonzentrationen der Tumorlinie SAS: Es sind die Daten für ATP, Glukose und Laktat aufgelistet, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Med: Median, Perz: Perzentile, Min: Minimalwert, Max: Maximalwert

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
74	0,9	0,3	0,9	0,5	1,4	0,0	2,7
85	0,4	0,2	0,4	0,2	0,7	0,0	1,9
86	0,5	0,3	0,4	0,1	1,0	0,0	2,3
87	0,7	0,3	0,7	0,3	1,1	0,0	2,2
249	0,9	0,4	0,8	0,4	1,3	0,0	3,1
830	0,3	0,2	0,3	0,1	0,5	0,0	1,4
849	1,1	0,4	1,0	0,5	1,6	0,0	3,5
850	1,1	0,4	1,1	0,5	1,6	0,0	3,5
857	0,5	0,3	0,4	0,1	0,8	0,0	1,9
902	1,1	0,5	1,1	0,5	1,6	0,0	4,0
909	0,7	0,4	0,7	0,3	1,2	0,0	3,3
910	1,1	0,4	1,1	0,6	1,6	0,1	3,4

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
74	3,8	1,7	3,6	1,9	6,0	0,1	12,0
85	1,9	1,2	1,7	0,6	3,5	0,0	10,8
86	1,5	1,1	1,2	0,3	3,0	0,0	7,4
87	2,3	1,8	1,6	0,7	4,6	0,0	12,0
249	2,7	2,1	2,2	0,6	5,7	0,0	12,0
830	1,1	0,9	0,8	0,3	2,2	0,0	11,1
849	1,2	1,0	0,9	0,3	2,6	0,0	8,3
850	2,3	1,6	1,9	0,6	4,4	0,0	12,0
857	2,3	1,5	1,9	0,6	4,3	0,0	11,7
902	2,6	1,7	2,2	0,7	4,9	0,0	12,0
909	0,8	0,7	0,6	0,2	1,8	0,0	8,9
910	2,9	1,6	2,7	1,2	5,1	0,1	12,0

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
74	13,7	7,9	11,5	6,2	23,8	1,2	54,5
85	14,1	7,2	12,8	6,7	23,2	0,2	54,5
86	12,4	7,0	10,6	6,1	20,8	0,2	54,5
87	26,4	9,9	24,4	15,3	41,3	5,7	54,5
249	18,8	9,2	16,8	9,4	30,9	0,8	54,5
830	16,2	8,3	14,7	7,3	26,7	1,4	54,5
849	18,0	8,5	16,3	9,2	29,1	0,2	54,5
850	16,1	9,3	14,0	6,5	28,6	0,2	54,5
857	18,1	9,2	16,1	8,4	30,3	0,1	54,5
902	16,3	9,3	14,4	6,8	28,6	1,2	54,5
909	20,7	8,7	18,9	11,7	32,3	0,1	54,5
910	14,4	8,4	12,1	6,4	25,5	0,5	54,5

Tabelle 8.6: Metabolitkonzentrationen der Tumorlinie UT-SCC-45: Es sind die Daten für ATP, Glukose und Laktat aufgelistet, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Med: Median, Perz: Perzentile, Min: Minimalwert, Max: Maximalwert

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
6	1,1	0,6	1,0	0,4	1,8	0,0	3,9
13	1,0	0,5	1,0	0,4	1,8	0,0	3,4
14	1,2	0,7	1,1	0,3	2,2	0,0	4,4
15	1,5	0,6	1,4	0,7	2,3	0,0	4,0
16	1,6	0,7	1,5	0,7	2,5	0,0	5,0
37	1,2	0,5	1,2	0,6	1,9	0,0	3,4
295	0,7	0,5	0,5	0,2	1,4	0,0	3,0
299	1,2	0,5	1,1	0,6	2,0	0,0	4,2
399	1,8	0,7	1,8	0,9	2,8	0,0	5,0
421	1,4	0,6	1,4	0,6	2,2	0,0	3,8
939	1,3	0,5	1,2	0,6	2,0	0,1	3,6
940	1,3	0,6	1,3	0,6	2,1	0,1	3,9

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
6	1,9	1,4	1,5	0,5	3,7	0,0	12,0
13	2,0	1,7	1,5	0,5	4,0	0,0	12,0
14	1,6	1,1	1,3	0,5	3,1	0,0	9,2
15	6,8	2,7	6,9	3,2	10,6	0,3	12,0
16	4,1	1,7	3,8	2,3	6,3	0,0	12,0
37	2,1	1,4	1,7	0,8	3,9	0,1	11,9
295	1,4	0,9	1,2	0,6	2,5	0,0	9,5
299	3,9	2,0	3,8	1,5	6,5	0,1	12,0
399	1,7	1,0	1,4	0,7	3,0	0,0	9,1
421	4,7	2,1	4,5	2,3	7,6	0,1	12,0
939	3,3	1,9	3,0	1,2	5,7	0,1	12,0
940	3,5	1,6	3,2	1,8	5,6	0,1	12,0

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
6	17,1	9,7	15,0	6,6	30,3	0,7	54,5
13	19,0	10,2	17,1	7,6	33,1	1,6	54,5
14	17,3	9,4	15,2	7,4	31,0	1,1	49,1
15	18,6	9,1	16,4	8,9	31,0	1,4	49,1
16	17,1	9,3	15,0	7,2	30,1	0,2	49,1
37	21,7	10,0	19,7	10,5	35,8	1,5	54,5
295	20,4	9,7	18,5	9,9	33,9	2,1	54,5
299	20,1	8,8	18,0	10,8	33,1	1,4	49,1
399	19,3	10,5	17,5	7,3	34,4	0,1	49,1
421	20,5	10,2	18,6	8,9	35,8	1,8	49,1
939	10,9	8,1	8,5	3,7	21,3	0,0	54,5
940	15,7	9,6	13,6	5,5	29,2	0,7	49,1

Tabelle 8.7: Metabolitkonzentrationen der Tumورlinie UT-SCC-5: Es sind die Daten für ATP, Glukose und Laktat aufgelistet, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung, Med: Median, Perz: Perzentile, Min: Minimalwert, Max: Maximalwert

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
32	1,9	0,8	1,8	0,9	3,0	0,0	5,0
46	1,9	0,8	1,7	0,9	3,0	0,0	5,0
60	2,0	0,8	1,9	1,0	3,0	0,1	5,0
98	1,6	0,9	1,5	0,6	2,8	0,0	5,0
404	1,6	0,8	1,6	0,7	2,7	0,0	5,0
405	1,3	0,7	1,2	0,5	2,1	0,0	5,0
406	1,8	1,0	1,6	0,5	3,2	0,0	5,0
407	0,7	0,5	0,5	0,2	1,3	0,0	3,5
633	1,4	0,7	1,3	0,5	2,4	0,0	4,9
698	1,4	0,6	1,4	0,6	2,2	0,0	5,0
699	1,3	0,6	1,3	0,5	2,1	0,0	4,1
700	1,9	0,9	1,8	0,8	3,1	0,0	5,0
701	1,1	0,5	1,0	0,4	1,7	0,0	4,2

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
32	1,4	1,3	0,9	0,3	3,2	0,0	12,0
46	2,5	1,9	2,0	0,6	5,1	0,0	12,0
60	2,6	1,7	2,3	0,7	4,7	0,0	12,0
98	1,1	1,5	0,6	0,2	2,5	0,0	12,0
404	5,3	3,0	4,9	1,7	9,6	0,0	12,0
405	2,8	2,2	2,2	0,6	5,8	0,0	12,0
406	2,7	2,2	2,1	0,6	5,8	0,0	12,0
407	2,2	1,6	2,0	0,4	4,3	0,0	11,0
633	1,5	1,8	0,8	0,2	3,9	0,0	12,0
698	2,3	1,7	1,7	0,8	4,8	0,0	12,0
699	1,3	1,1	0,9	0,3	2,8	0,0	11,3
700	3,0	2,2	2,4	0,8	6,3	0,0	12,0
701	2,5	2,2	1,7	0,5	5,6	0,0	12,0

Tumor	Mittelwert	Sd	Median	Perz 10%	Perz 90%	Minimum	Maximum
32	26,8	10,3	25,5	14,5	41,3	4,9	54,5
46	25,7	11,2	23,8	12,7	42,6	0,1	55,3
60	22,8	10,5	20,4	11,4	38,3	1,7	55,3
98	29,1	11,6	28,0	14,9	46,2	1,8	55,3
404	30,5	11,8	29,5	15,4	47,3	0,1	55,3
405	29,1	11,9	28,4	13,6	46,2	0,4	55,3
406	27,5	12,6	25,8	12,2	46,2	0,1	55,3
407	18,1	10,2	15,8	7,5	32,8	2,1	55,3
633	28,2	12,0	26,7	13,5	45,3	2,2	55,3
698	27,5	11,8	25,8	13,3	45,2	1,0	55,3
699	20,5	10,5	18,7	8,6	34,8	0,8	54,5
700	29,4	12,0	28,1	14,5	47,2	0,9	55,3
701	21,2	10,3	19,3	9,7	35,8	2,4	54,5

Anhang

Tabelle 8.10: real time RT-PCR Daten der Tumورlinie UT-SCC-15, MW: Mittelwert der CT-Werte, SD: Standardabweichung, c: Konzentration

Zielgen	Tumor	cDNA-Menge	CT-Wert	CT-Wert	CT-Wert	MW	SD	SD²	dCT-Wert	SD(dCT)	ddCT-Wert	c-ZielgenN
LDH-A	UTSCC15 95	2000 ng/ml	25,01	24,89	24,92	24,94	0,07	0,004	-6,26	0,25	-1,05	2,08
	UTSCC15 96	2000 ng/ml	22,59	22,79	22,85	22,75	0,14	0,018	-7,52	0,14	-2,31	4,96
	UTSCC15 98	2000 ng/ml	23,23	23,71		23,47	0,34	0,114	-8,46	0,53	-3,25	9,54
	UTSCC15 109	2000 ng/ml	22,51	22,54	22,57	22,54	0,03	0,001	-8,57	0,31	-3,36	10,26
	Kalibrator	2000 ng/ml	22,28	22,41	23,01	22,57	0,39	0,153	-5,21	0,39	0,00	1,00
	UT15 #229	2000 ng/ml	23,26	23,26	23,33	23,28	0,04	0,001	-7,77	0,22	-2,26	4,79
	UT15 #232	2000 ng/ml	23,00	23,06	23,13	23,07	0,06	0,004	-6,58	0,18	-1,07	2,10
	UT15 #259	2000 ng/ml	23,01	23,25	24,64	23,63	0,88	0,775	-6,93	0,93	-1,42	2,68
	UT15 #263	2000 ng/ml	22,22	22,17	22,43	22,28	0,14	0,019	-7,24	0,18	-1,73	3,33
	UT15 #264	2000 ng/ml	23,70	23,87	24,02	23,86	0,16	0,026	-7,12	0,30	-1,61	3,06
Kalibrator	2000 ng/ml	21,27	21,68		21,47	0,29	0,084	-5,51	0,54	0,00	1,00	
GLUT1	UTSCC15 95	2000 ng/ml	30,36	30,17	30,30	30,28	0,10	0,009	-0,93	0,26	1,63	0,32
	UTSCC15 96	2000 ng/ml	25,98	26,01	25,36	25,78	0,37	0,138	-4,48	0,37	-1,93	3,80
	UTSCC15 98	2000 ng/ml	27,24	27,71	27,24	27,40	0,27	0,073	-4,53	0,49	-1,98	3,94
	UTSCC15 109	2000 ng/ml	26,21	26,04	25,47	25,90	0,38	0,147	-5,20	0,49	-2,65	6,27
	Kalibrator	2000 ng/ml	25,20	25,24	25,23	25,22	0,02	0,001	-2,55	0,05	0,00	1,00
	UT15 #229	2000 ng/ml	26,71	26,74	26,76	26,74	0,02	0,000	-4,32	0,21	-1,78	3,45
	UT15 #232	2000 ng/ml	26,27	26,21	26,33	26,27	0,06	0,003	-3,37	0,18	-0,84	1,79
	UT15 #259	2000 ng/ml	26,17	26,10	25,28	25,85	0,49	0,244	-4,72	0,58	-2,18	4,54
	UT15 #263	2000 ng/ml	25,03	25,18	25,14	25,12	0,08	0,007	-4,40	0,14	-1,87	3,66
	UT15 #264	2000 ng/ml	27,07	27,11	27,07	27,08	0,02	0,000	-3,90	0,25	-1,37	2,58
Kalibrator	2000 ng/ml	24,21	24,69		24,45	0,35	0,120	-2,53	0,57	0,00	1,00	
HMBS (EC)	UTSCC15 95	2000 ng/ml	31,08	31,49	31,05	31,20	0,24	0,060				
	UTSCC15 96	2000 ng/ml	30,23	30,27	30,29	30,26	0,03	0,001				
	UTSCC15 98	2000 ng/ml	32,26	31,47	32,06	31,93	0,41	0,171				
	UTSCC15 109	2000 ng/ml	31,10	31,42	30,80	31,11	0,31	0,096				
	Kalibrator	2000 ng/ml	27,83	27,73	27,78	27,78	0,05	0,003				
	UT15 #229	2000 ng/ml	30,85	31,04	31,28	31,06	0,21	0,046				
	UT15 #232	2000 ng/ml	29,51	29,59	29,83	29,64	0,17	0,028				
	UT15 #259	2000 ng/ml	30,22	30,66	30,82	30,57	0,31	0,097				
	UT15 #263	2000 ng/ml	29,52	29,63	29,41	29,52	0,11	0,013				
	UT15 #264	2000 ng/ml	31,16	31,10	30,70	30,99	0,25	0,063				
	Kalibrator	2000 ng/ml	27,31	26,66		26,98	0,46	0,209				
PFK-L	UT15 95	2000 ng/ml	30,29	30,44	30,23	30,32	0,11	0,012	-1,60	0,25	1,97	0,26
	UT15 96	2000 ng/ml	25,64	25,98	26,04	25,89	0,22	0,048	-4,84	0,35	-1,27	2,41
	UT15 98	2000 ng/ml	26,50	26,85		26,68	0,25	0,060	-4,54	0,27	-0,97	1,96
	UT15 109	2000 ng/ml	25,80	25,85	25,77	25,80	0,04	0,002	-6,29	0,06	-2,73	6,62
	UT15 229	2000 ng/ml	26,71	26,65	26,83	26,73	0,09	0,008	-5,37	0,10	-1,80	3,49
	UT15 230	2000 ng/ml	26,32	26,32	26,19	26,28	0,07	0,005	-5,66	0,30	-2,09	4,26
	UT15 232	2000 ng/ml	26,08	26,16	26,25	26,16	0,09	0,008	-4,31	0,18	-0,75	1,68
	UT15 259	2000 ng/ml	26,45	26,62		26,53	0,12	0,014	-4,72	0,28	-1,16	2,23
	UT15 263	2000 ng/ml	25,22	25,25	25,24	25,24	0,01	0,000	-4,96	0,09	-1,39	2,62
	UT15 264	2000 ng/ml	27,01	27,08	27,22	27,10	0,10	0,011	-4,93	0,17	-1,37	2,58
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,62	24,81	24,66	24,70	0,10	0,010	-3,57	0,11	0,00	1,00
HMBS (EC)	UT15 95	2000 ng/ml	32,17	31,81	31,77	31,92	0,22	0,048				
	UT15 96	2000 ng/ml	30,41	30,85	30,91	30,72	0,28	0,076				
	UT15 98	2000 ng/ml	32,11	31,85	31,96	31,97	0,13	0,018				
	UT15 109	2000 ng/ml	31,18	31,35	31,11	31,21	0,12	0,014				
	UT15 229	2000 ng/ml	32,10	32,05	32,15	32,10	0,05	0,002				
	UT15 230	2000 ng/ml	31,60	32,08	32,13	31,94	0,29	0,087				
	UT15 232	2000 ng/ml	30,31	30,49	30,62	30,47	0,16	0,024				
	UT15 259	2000 ng/ml	30,98	31,49	31,30	31,26	0,26	0,066				
	UT15 263	2000 ng/ml	30,18	30,11	30,29	30,19	0,09	0,008				
	UT15 264	2000 ng/ml	31,88	32,13	32,10	32,04	0,14	0,018				
	Kalibrator	2000 ng/ml	28,23	28,30		28,26	0,05	0,002				

Anhang

Tabelle 8.11: real time RT-PCR Daten der Tumorlinie FaDu, MW: Mittelwert der CT-Werte, SD: Standardabweichung, c: Konzentration

Zielgen	Tumor	cDNA-Menge	CT-Wert	CT-Wert	CT-Wert	MW	SD	SD ²	dCT-Wert	SD(dCT)	ddCT-Wert	c-Zielgen _s	
LDH-A	FaDu 364	2000 ng/ml	23,12	23,18	23,16	23,15	0,03	0,001	-6,21	0,09	-0,83	1,77	
	FaDu 837	2000 ng/ml	23,51	24,30		23,91	0,56	0,311	-7,22	0,56	-1,84	3,57	
	FaDu 843	2000 ng/ml	22,63	22,81	22,74	22,73	0,09	0,008	-6,87	0,28	-1,50	2,82	
	FaDu 372	2000 ng/ml	22,62	22,79	22,87	22,76	0,13	0,017	-5,96	0,28	-0,58	1,49	
	Kalibrator	2000 ng/ml	22,27	22,50	22,45	22,41	0,12	0,015	-5,38	0,19	0,00	1,00	
	FaDu 872	2000 ng/ml	24,05	23,92	23,79	23,92	0,13	0,017	-6,35	0,23	-1,14	2,21	
	FaDu 874	2000 ng/ml	22,85	24,27		23,56	1,01	1,014	-5,80	1,02	-0,59	1,50	
	FaDu 905	2000 ng/ml	25,08	25,17	25,32	25,19	0,12	0,015	-6,87	1,09	-1,66	3,17	
	FaDu 873	2000 ng/ml	24,41	24,50	24,73	24,54	0,17	0,027	-5,64	0,23	-0,43	1,35	
	Kalibrator	2000 ng/ml	22,28	22,41	23,01	22,57	0,39	0,153	-5,21	0,39	0,00	1,00	
	GLUT1	FaDu 364	2000 ng/ml	25,26	25,27	25,32	25,28	0,04	0,001	-4,07	0,09	-1,07	2,09
		FaDu 837	2000 ng/ml	25,49	25,68	25,14	25,44	0,27	0,074	-5,69	0,27	-2,68	6,41
FaDu 843		2000 ng/ml	25,81	25,87	25,91	25,86	0,05	0,002	-3,74	0,27	-0,73	1,66	
FaDu 372		2000 ng/ml	24,71	24,79	24,86	24,78	0,08	0,006	-3,93	0,26	-0,92	1,90	
Kalibrator		2000 ng/ml	24,83	24,71	24,80	24,78	0,06	0,004	-3,01	0,15	0,00	1,00	
FaDu 872		2000 ng/ml	27,01	27,03	27,10	27,05	0,05	0,002	-3,23	0,20	-0,67	1,59	
FaDu 874		2000 ng/ml	26,83	26,60	26,73	26,72	0,11	0,013	-2,64	0,19	-0,08	1,06	
FaDu 905		2000 ng/ml	29,23	29,29	29,21	29,24	0,04	0,002	-2,82	1,08	-0,26	1,20	
FaDu 873		2000 ng/ml	27,79	27,96	27,79	27,84	0,10	0,010	-2,34	0,19	0,21	0,86	
Kalibrator		2000 ng/ml	25,20	25,24	25,23	25,22	0,02	0,001	-2,55	0,05	0,00	1,00	
HMBS (EC)		FaDu 364	2000 ng/ml	29,42	29,30		29,36	0,08	0,007				
		FaDu 837	2000 ng/ml	31,12	31,13		31,12	0,00	0,000				
	FaDu 843	2000 ng/ml	29,79	29,41		29,60	0,27	0,071					
	FaDu 372	2000 ng/ml	28,70	28,48	28,97	28,72	0,25	0,060					
	Kalibrator	2000 ng/ml	27,81	27,64	27,91	27,79	0,14	0,019					
	FaDu 872	2000 ng/ml	30,25	30,47	30,09	30,27	0,19	0,037					
	FaDu 874	2000 ng/ml	29,30	29,24	29,53	29,36	0,15	0,023					
	FaDu 905	2000 ng/ml	32,82	31,30		32,06	1,08	1,166					
	FaDu 873	2000 ng/ml	30,24	30,00	30,31	30,18	0,16	0,026					
	Kalibrator	2000 ng/ml	27,83	27,73	27,78	27,78	0,05	0,003					
	PFK-L	FaDu 364	2000 ng/ml	25,81	25,67	25,60	25,69	0,11	0,012	-4,06	0,29	-0,58	1,50
		FaDu 372	2000 ng/ml	25,12	25,16	25,15	25,14	0,02	0,000	-3,91	0,12	-0,42	1,34
FaDu 837		2000 ng/ml	26,41	26,51	27,20	26,71	0,43	0,185	-4,39	0,44	-0,90	1,87	
FaDu 843		2000 ng/ml	26,43	26,51	26,61	26,52	0,09	0,009	-3,79	0,18	-0,31	1,24	
FaDu 871		2000 ng/ml	25,34	25,63	25,55	25,51	0,15	0,022	-3,73	0,28	-0,25	1,19	
FaDu 872		2000 ng/ml	27,55	27,45	27,51	27,50	0,05	0,003	-3,20	0,14	0,28	0,82	
FaDu 873		2000 ng/ml	28,76	29,02	29,05	28,95	0,16	0,025	-1,74	0,24	1,74	0,30	
FaDu 874		2000 ng/ml	26,21	26,24		26,23	0,02	0,000	-3,21	0,35	0,27	0,83	
FaDu 905		2000 ng/ml	29,36	29,65	29,92	29,64	0,28	0,079	-2,17	0,31	1,31	0,40	
Kalibrator		2000 ng/ml	24,41	24,49	24,80	24,57	0,20	0,042	-3,48	0,21	0,00	1,00	
HMBS (EC)		FaDu 364	2000 ng/ml	29,64	30,06	29,56	29,75	0,27	0,073				
		FaDu 372	2000 ng/ml	29,12	28,92	29,11	29,05	0,11	0,013				
	FaDu 837	2000 ng/ml	31,22	31,02	31,04	31,09	0,11	0,012					
	FaDu 843	2000 ng/ml	30,28	30,17	30,48	30,31	0,16	0,025					
	FaDu 871	2000 ng/ml	29,16	29,51	29,05	29,24	0,24	0,057					
	FaDu 872	2000 ng/ml	30,85	30,65	30,60	30,70	0,13	0,018					
	FaDu 873	2000 ng/ml	30,73	30,49	30,85	30,69	0,18	0,034					
	FaDu 874	2000 ng/ml	29,83	29,20	29,28	29,44	0,35	0,119					
	FaDu 905	2000 ng/ml	31,76	31,71	31,97	31,81	0,14	0,019					
	Kalibrator	2000 ng/ml	28,03	28,03	28,08	28,05	0,03	0,001					

Tabelle 8.12: real time RT-PCR Daten der Tumورlinie SAS, MW: Mittelwert der CT-Werte, SD: Standardabweichung, c: Konzentration

Zielgen	Tumor	cDNA-Menge	CT-Wert	CT-Wert	CT-Wert	MW	SD	SD ²	dCT-Wert	SD(dCT)	ddCT-Wert	c-Zielgen _N
LDH-A	# 85	2000 ng/ml	21,48	21,43	21,43	21,4	0,03	0,001	-7,53	0,18	-0,79	1,72
	# 86	2000 ng/ml	21,58	21,66	21,72	21,6	0,07	0,005	-7,16	0,24	-0,42	1,34
	# 87	2000 ng/ml	22,34	23,19		22,8	0,60	0,364	-6,68	0,68	0,07	0,95
	# 249	2000 ng/ml	22,72	22,68	22,69	22,7	0,02	0,000	-7,26	0,18	-0,51	1,43
	# 830	2000 ng/ml	22,70	22,92	23,45	23,0	0,39	0,151	-7,02	0,39	-0,27	1,21
	# 850	2000 ng/ml	22,91	22,91		22,9	0,00	0,000	-7,03	0,20	-0,28	1,22
	Kalibrator	2000 ng/ml	21,15	21,31	21,35	21,3	0,11	0,011	-6,74	0,13	0,00	1,00
	#849	2000 ng/ml	22,27	22,52	22,38	22,4	0,13	0,016	-7,16	0,16	-0,76	1,69
	#857	2000 ng/ml	23,70	23,84	23,75	23,8	0,07	0,005	-6,95	0,08	-0,55	1,46
	#902	2000 ng/ml	21,76	22,18		22,0	0,30	0,089	-6,04	0,49	0,36	0,78
	#909	2000 ng/ml	21,69	21,74	21,97	21,8	0,15	0,022	-6,49	0,16	-0,08	1,06
	#910	2000 ng/ml	22,93	23,16	23,34	23,1	0,20	0,041	-5,62	0,22	0,79	0,58
	Kalibrator	2000 ng/ml	21,43	21,29	21,57	21,4	0,14	0,019	-6,40	0,15	0,00	1,00
GLUT1	# 85	2000 ng/ml	25,76	25,80	25,86	25,81	0,05	0,002	-3,17	0,18	0,48	0,72
	# 86	2000 ng/ml	26,51	26,58	26,59	26,56	0,04	0,002	-2,25	0,23	1,39	0,38
	# 87	2000 ng/ml	27,54	27,38	28,01	27,64	0,33	0,106	-1,80	0,45	1,85	0,28
	# 249	2000 ng/ml	27,59	27,85	27,70	27,71	0,13	0,018	-2,24	0,23	1,41	0,38
	# 830	2000 ng/ml	27,21	27,15	27,25	27,20	0,05	0,002	-2,84	0,05	0,81	0,57
	# 850	2000 ng/ml	27,96	28,11	26,64	27,57	0,81	0,656	-2,37	0,83	1,28	0,41
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,37	24,35	24,40	24,37	0,02	0,001	-3,64	0,07	0,00	1,00
	#849	2000 ng/ml	25,77	25,82	25,92	25,83	0,08	0,006	-3,72	0,12	0,01	0,99
	#857	2000 ng/ml	28,22	28,13	28,23	28,19	0,05	0,003	-2,52	0,06	1,21	0,43
	#902	2000 ng/ml	25,08	25,15	24,25	24,82	0,50	0,251	-3,18	0,64	0,55	0,68
	#909	2000 ng/ml	25,44	25,30	25,38	25,37	0,07	0,005	-2,91	0,09	0,82	0,57
	#910	2000 ng/ml	27,49	27,47	27,57	27,51	0,05	0,003	-1,25	0,10	2,48	0,18
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,25	24,27	23,79	24,10	0,27	0,073	-3,73	0,28	0,00	1,00
PFK-L	# 85	2000 ng/ml	25,14	25,08	25,07	25,10	0,04	0,002	-3,88	0,18	-0,15	1,11
	# 86	2000 ng/ml	25,13	25,16	25,29	25,19	0,09	0,008	-3,62	0,25	0,11	0,93
	# 87	2000 ng/ml	26,05	26,22		26,13	0,12	0,014	-3,31	0,33	0,42	0,75
	# 249	2000 ng/ml	26,59	26,58	26,64	26,60	0,03	0,001	-3,35	0,19	0,39	0,76
	# 830	2000 ng/ml	26,31	26,23	26,58	26,37	0,18	0,034	-3,67	0,18	0,06	0,96
	# 850	2000 ng/ml	26,29	26,27		26,28	0,01	0,000	-3,66	0,20	0,08	0,95
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,22	24,18	24,45	24,28	0,14	0,021	-3,73	0,16	0,00	1,00
	#849	2000 ng/ml	25,23	25,23	25,27	25,24	0,03	0,001	-4,31	0,10	-0,79	1,73
	#857	2000 ng/ml	27,36	27,38	27,45	27,40	0,05	0,002	-3,32	0,06	0,20	0,87
	#902	2000 ng/ml	24,30	24,31	23,65	24,09	0,38	0,144	-3,92	0,55	-0,40	1,32
	#909	2000 ng/ml	24,26	24,32	24,32	24,30	0,03	0,001	-3,98	0,06	-0,47	1,38
	#910	2000 ng/ml	25,29	25,52	25,61	25,47	0,17	0,028	-3,29	0,19	0,23	0,85
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,36	24,31	24,28	24,31	0,04	0,002	-3,52	0,07	0,00	1,00
HMBS (EC)	# 85	2000 ng/ml	28,79	29,15	28,98	28,98	0,18	0,032				
	# 86	2000 ng/ml	28,76	28,61	29,06	28,81	0,23	0,053				
	# 87	2000 ng/ml	29,61	29,63	29,08	29,44	0,31	0,095				
	# 249	2000 ng/ml	30,00	29,75	30,10	29,95	0,18	0,034				
	# 830	2000 ng/ml	30,05	30,02	30,06	30,04	0,02	0,000				
	# 850	2000 ng/ml	30,13	29,96	29,73	29,94	0,20	0,040				
	Kalibrator	2000 ng/ml	27,94	28,06	28,05	28,02	0,07	0,005				
	#849	2000 ng/ml	29,62	29,45	29,59	29,55	0,09	0,009				
	#857	2000 ng/ml	30,71	30,74	30,68	30,71	0,03	0,001				
	#902	2000 ng/ml	28,29	28,17	27,56	28,01	0,39	0,153				
	#909	2000 ng/ml	28,25	28,26	28,34	28,28	0,05	0,003				
	#910	2000 ng/ml	28,67	28,78	28,83	28,76	0,08	0,006				
	Kalibrator	2000 ng/ml	27,84	27,88	27,77	27,83	0,06	0,003				

Anhang

Tabelle 8.13: real time RT-PCR Daten der Tumorlinie UT-SCC-45, MW: Mittelwert der CT-Werte, SD: Standardabweichung, c: Konzentration

Zielgen	Tumor	cDNA-Menge	CT-Wert	CT-Wert	CT-Wert	MW	SD	SD ²	dCT-Wert	SD(dCT)	ddCT-Wert	c-ZielgenN
LDH-A	UT45 #6	2000 ng/ml	21,65	21,88	21,86	21,80	0,13	0,017	-6,35	0,14	0,20	0,87
	UT45 #13	2000 ng/ml	20,44	20,60	20,58	20,54	0,08	0,007	-6,66	0,12	-0,11	1,08
	UT45 #14	2000 ng/ml	20,73	21,33		21,03	0,43	0,184	-6,60	0,50	-0,05	1,04
	UT45 #15	2000 ng/ml	20,75	20,82	20,83	20,80	0,04	0,002	-6,82	0,13	-0,28	1,21
	UT45 #16	2000 ng/ml	21,94	21,99	22,40	22,11	0,26	0,066	-6,43	0,27	0,12	0,92
	UT45 #37	2000 ng/ml	21,18	21,39	23,18	21,92	1,10	1,202	-6,43	1,10	0,12	0,92
	Kalibrator	2000 ng/ml	21,22	21,31	21,19	21,24	0,06	0,004	-6,55	0,12	0,00	1,00
	UT45 #295	2000 ng/ml	21,65	21,59	21,43	21,56	0,11	0,013	-7,36	0,28	-0,76	1,69
	UT45 #299	2000 ng/ml	21,32	21,34	21,39	21,35	0,03	0,001	-6,48	0,19	0,12	0,92
	UT45 #399	2000 ng/ml	20,77	21,40		21,09	0,44	0,198	-6,24	0,48	0,36	0,78
	UT45 #448	2000 ng/ml	21,25	21,24	21,33	21,28	0,05	0,003	-7,13	0,23	-0,52	1,44
	UT45 #939	2000 ng/ml	20,88	20,95	21,26	21,03	0,20	0,041	-6,75	0,32	-0,15	1,11
	UT45 #940	2000 ng/ml	20,99	20,95	23,10	21,68	1,23	1,507	-6,17	1,23	0,43	0,74
	Kalibrator	2000 ng/ml	21,28	21,23	21,32	21,28	0,04	0,002	-6,60	0,17	0,00	1,00
GLUT1	UT45 #6	2000 ng/ml	24,77	24,76	24,71	24,75	0,03	0,001	-3,40	0,06	-0,15	1,11
	UT45 #13	2000 ng/ml	23,97	23,92	23,96	23,95	0,03	0,001	-3,25	0,09	0,00	1,00
	UT45 #14	2000 ng/ml	23,62	23,50	23,03	23,38	0,31	0,099	-4,25	0,41	-1,01	2,01
	UT45 #15	2000 ng/ml	23,63	23,68	23,69	23,67	0,03	0,001	-3,96	0,12	-0,71	1,64
	UT45 #16	2000 ng/ml	25,24	25,23	25,22	25,23	0,01	0,000	-3,31	0,09	-0,06	1,04
	UT45 #37	2000 ng/ml	24,45	24,53	23,51	24,16	0,57	0,320	-4,19	0,58	-0,94	1,92
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,70	24,38	24,55	24,54	0,16	0,026	24,50	1,06	0,00	1,00
	UT45 #295	2000 ng/ml	24,44	24,44	24,47	24,45	0,02	0,000	-4,46	0,25	-1,11	2,16
	UT45 #299	2000 ng/ml	23,52	23,70	23,47	23,57	0,12	0,015	-4,26	0,22	-0,91	1,88
	UT45 #399	2000 ng/ml	24,23	23,97	23,63	23,94	0,30	0,091	-3,39	0,35	-0,03	1,02
	UT45 #448	2000 ng/ml	25,65	25,76	25,66	25,69	0,06	0,003	-2,71	0,23	0,64	0,64
	UT45 #939	2000 ng/ml	24,09	24,17	24,08	24,11	0,05	0,002	-3,67	0,26	-0,32	1,25
	UT45 #940	2000 ng/ml	24,37	24,50	23,91	24,26	0,31	0,099	-3,59	0,34	-0,23	1,18
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,42	24,56	24,58	24,52	0,09	0,007	-3,35	0,18	0,00	1,00
PFK-L	UT45 #6	2000 ng/ml	24,90	24,78	24,89	24,85	0,06	0,0042	-3,29	0,08	0,08	0,95
	UT45 #13	2000 ng/ml	23,95	23,97	24,12	24,01	0,09	0,0088	-3,18	0,13	0,19	0,88
	UT45 #14	2000 ng/ml	24,26	24,35	25,65	24,75	0,78	0,6057	-2,88	0,82	0,49	0,71
	UT45 #15	2000 ng/ml	24,26	24,31	24,31	24,29	0,03	0,0010	-3,33	0,12	0,04	0,98
	UT45 #16	2000 ng/ml	25,22	25,37	25,45	25,35	0,11	0,0132	-3,19	0,15	0,18	0,88
	UT45 #37	2000 ng/ml	25,09	25,06	24,88	25,01	0,12	0,0134	-3,34	0,16	0,03	0,98
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,39	24,40	24,47	24,42	0,04	0,002	-3,37	0,11	0,00	1,00
	UT45 #295	2000 ng/ml	24,53	24,50	24,53	24,52	0,02	0,000	-4,39	0,25	-0,85	1,80
	UT45 #299	2000 ng/ml	24,94	25,10	25,13	25,06	0,10	0,011	-2,77	0,21	0,77	0,59
	UT45 #399	2000 ng/ml	25,03	25,22	27,04	25,76	1,11	1,230	-1,57	1,12	1,97	0,25
	UT45 #448	2000 ng/ml	25,77	25,92	25,74	25,81	0,09	0,009	-2,59	0,24	0,95	0,52
	UT45 #939	2000 ng/ml	24,20	24,21	24,47	24,29	0,15	0,023	-3,49	0,30	0,05	0,96
	UT45 #940	2000 ng/ml	24,43	24,51	25,32	24,75	0,49	0,243	-3,09	0,51	0,45	0,73
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,29	24,36	24,35	24,33	0,04	0,001	-3,54	0,16	0,00	1,00
HMBS (EC)	UT45 #6	2000 ng/ml	28,16	28,18	28,10	28,15	0,05	0,002				
	UT45 #13	2000 ng/ml	27,12	27,18	27,29	27,19	0,09	0,007				
	UT45 #14	2000 ng/ml	27,92	27,44	27,54	27,63	0,26	0,066				
	UT45 #15	2000 ng/ml	27,75	27,52	27,60	27,63	0,12	0,014				
	UT45 #16	2000 ng/ml	28,51	28,64	28,47	28,54	0,09	0,008				
	UT45 #37	2000 ng/ml	28,32	28,26	28,48	28,35	0,11	0,013				
	Kalibrator	2000 ng/ml	27,88	27,67	27,82	27,79	0,11	0,011				
	UT45 #295	2000 ng/ml	29,17	28,67	28,89	28,91	0,25	0,064				
	UT45 #299	2000 ng/ml	27,62	27,88	27,99	27,83	0,19	0,035				
	UT45 #399	2000 ng/ml	27,51	27,35	27,14	27,33	0,18	0,033				
	UT45 #448	2000 ng/ml	28,17	28,62	28,41	28,40	0,22	0,050				
	UT45 #939	2000 ng/ml	27,52	28,03	27,79	27,78	0,25	0,064				
	UT45 #940	2000 ng/ml	27,99	27,83	27,73	27,85	0,13	0,017				
	Kalibrator	2000 ng/ml	27,71	28,03	27,88	27,88	0,16	0,025				

Anhang

Tabelle 8.14: real time RT-PCR Daten der Tumorlinie UT-SCC-5, MW: Mittelwert der CT-Werte, SD: Standardabweichung, c: Konzentration

Zielgen	Tumor	cDNA-Menge	CT-Wert	CT-Wert	CT-Wert	MW	SD	SD ²	dCT-Wert	SD(dCT)	ddCT-Wert	c-ZielgenN
LDH-A	UT5 32	2000 ng/ml	22,48	22,47	22,67	22,54	0,11	0,013	-5,32	0,20	0,59	0,67
	UT5 46	2000 ng/ml	22,59	23,48	24,59	23,55	1,00	1,001	-4,64	1,00	1,27	0,41
	UT5 60	2000 ng/ml	22,90	22,91		22,91	0,00	0,000	-5,72	0,44	0,19	0,88
	Kalibrator	2000 ng/ml	21,75	21,86	21,89	21,83	0,08	0,006	-5,91	0,12	0,00	1,00
	UT5 404	2000 ng/ml	21,79	21,88	21,95	21,87	0,08	0,006	-5,38	0,09	0,53	0,69
	UT5 405	2000 ng/ml	22,45	23,17	24,37	23,33	0,97	0,940	-3,97	0,98	1,94	0,26
	UT5 406	2000 ng/ml	22,74	22,82		22,78	0,06	0,003	-4,63	0,63	1,28	0,41
	Kalibrator	2000 ng/ml	21,45	21,63	21,88	21,65	0,22	0,048	-5,91	0,24	0,00	1,00
	UT5 407	2000 ng/ml	21,43	21,66	21,59	21,56	0,12	0,014	-5,49	0,12	0,48	0,72
	UT5 633	2000 ng/ml	22,47	23,13		22,80	0,47	0,220	-5,04	0,47	0,93	0,52
	UT5 698	2000 ng/ml	22,10	22,07		22,09	0,02	0,000	-5,61	0,05	0,36	0,78
	Kalibrator	2000 ng/ml	21,53	21,70	21,83	21,69	0,15	0,023	-5,97	0,17	0,00	1,00
	UT5 699	2000 ng/ml	22,43	22,62	22,77	22,61	0,17	0,029	-5,22	0,18	0,59	0,66
	UT5 700	2000 ng/ml	22,88	22,78		22,83	0,07	0,004	-6,07	0,26	-0,27	1,20
	UT5 701	2000 ng/ml	22,24	22,33	22,31	22,29	0,05	0,002	-5,95	0,07	-0,15	1,11
Kalibrator	2000 ng/ml	21,52	21,77		21,64	0,18	0,034	-5,80	0,22	0,00	1,00	
GLUT1	UT5 32	2000 ng/ml	25,15	25,17	25,22	25,18	0,04	0,001	-2,69	0,17	0,50	0,71
	UT5 46	2000 ng/ml	24,53	24,43	24,56	24,51	0,07	0,004	-3,69	0,11	-0,50	1,42
	UT5 60	2000 ng/ml	25,65	25,67		25,66	0,01	0,000	-2,97	0,44	0,22	0,86
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,57	24,60	24,50	24,56	0,05	0,002	-3,19	0,11	0,00	1,00
	UT5 404	2000 ng/ml	25,32	25,26	25,99	25,52	0,40	0,161	-1,73	0,40	1,36	0,39
	UT5 405	2000 ng/ml	25,94	25,50	25,61	25,68	0,23	0,053	-1,62	0,25	1,48	0,36
	UT5 406	2000 ng/ml	27,03	26,88	26,82	26,91	0,11	0,012	-0,50	0,63	2,60	0,16
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,51	24,52	24,37	24,46	0,08	0,007	-3,10	0,13	0,00	1,00
	UT5 407	2000 ng/ml	24,89	25,01	25,02	24,97	0,08	0,006	-2,07	0,08	1,20	0,44
	UT5 633	2000 ng/ml	25,58	25,36	25,28	25,41	0,15	0,024	-2,44	0,16	0,84	0,56
	UT5 698	2000 ng/ml	24,47	24,51		24,49	0,02	0,001	-3,21	0,05	0,07	0,96
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,40	24,43	24,32	24,39	0,06	0,003	-3,27	0,10	0,00	1,00
	UT5 699	2000 ng/ml	25,03	25,03	24,98	25,01	0,03	0,001	-2,81	0,06	0,36	0,78
	UT5 700	2000 ng/ml	25,67	25,53	25,49	25,56	0,10	0,010	-3,34	0,27	-0,16	1,12
	UT5 701	2000 ng/ml	24,78	24,62		24,70	0,11	0,013	-3,55	0,12	-0,38	1,30
Kalibrator	2000 ng/ml	24,32	24,23	24,29	24,28	0,05	0,002	-3,17	0,12	0,00	1,00	
PFK-L	UT5 32	2000 ng/ml	25,73	25,73	25,68	25,71	0,03	0,001	-2,15	0,17	0,97	0,51
	UT5 46	2000 ng/ml	25,76	25,82	26,02	25,87	0,14	0,019	-2,33	0,17	0,79	0,58
	UT5 60	2000 ng/ml	26,41	26,46		26,44	0,03	0,001	-2,19	0,44	0,93	0,53
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,57	24,60	24,70	24,62	0,07	0,005	-3,12	0,12	0,00	1,00
	UT5 404	2000 ng/ml	25,64	25,61	25,67	25,64	0,03	0,001	-1,62	0,05	1,44	0,37
	UT5 405	2000 ng/ml	26,28	26,43	26,54	26,42	0,13	0,017	-0,89	0,17	2,17	0,22
	UT5 406	2000 ng/ml	26,44	26,49	26,72	26,55	0,15	0,022	-0,86	0,64	2,20	0,22
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,42	24,65	24,44	24,50	0,13	0,016	-3,06	0,16	0,00	1,00
	UT5 407	2000 ng/ml	25,27	25,24	25,26	25,26	0,02	0,000	-1,79	0,02	1,39	0,38
	UT5 633	2000 ng/ml	25,90	26,07	26,07	26,01	0,10	0,010	-1,83	0,10	1,36	0,39
	UT5 698	2000 ng/ml	25,32	25,45	25,15	25,31	0,15	0,023	-2,39	0,16	0,79	0,58
	Kalibrator	2000 ng/ml	24,45	24,47	24,51	24,48	0,03	0,001	-3,18	0,09	0,00	1,00
	UT5 699	2000 ng/ml	25,97	25,84	25,79	25,87	0,09	0,009	-1,96	0,11	1,21	0,43
	UT5 700	2000 ng/ml	26,78	26,77	27,03	26,86	0,15	0,021	-2,04	0,29	1,13	0,46
	UT5 701	2000 ng/ml	26,06	25,95		26,00	0,07	0,005	-2,24	0,09	0,93	0,52
Kalibrator	2000 ng/ml	24,32	24,23	24,29	24,28	0,05	0,002	-3,17	0,12	0,00	1,00	
HMBS	UT5 32	2000 ng/ml	28,02	27,69	27,88	27,87	0,17	0,028				
	UT5 46	2000 ng/ml	28,09	28,22	28,27	28,19	0,09	0,009				
	UT5 60	2000 ng/ml	29,06	28,65	28,18	28,63	0,44	0,196				
	Kalibrator	2000 ng/ml	27,63	27,78	27,81	27,74	0,10	0,010				
	UT5 404	2000 ng/ml	27,30	27,21	27,26	27,26	0,05	0,002				
	UT5 405	2000 ng/ml	27,19	27,31	27,41	27,30	0,11	0,012				
	UT5 406	2000 ng/ml	27,44	28,01	26,76	27,40	0,63	0,391				
	Kalibrator	2000 ng/ml	27,66	27,56	27,47	27,56	0,10	0,009				
	UT5 407	2000 ng/ml	27,05	27,03	27,06	27,05	0,02	0,000				
	UT5 633	2000 ng/ml	27,83		27,86	27,84	0,02	0,000				
	UT5 698	2000 ng/ml	27,74	27,70	27,65	27,70	0,04	0,002				
	Kalibrator	2000 ng/ml	27,60	27,75	27,63	27,66	0,08	0,006				
	UT5 699	2000 ng/ml		27,86	27,78	27,82	0,05	0,003				
	UT5 700	2000 ng/ml	28,66	28,90	29,15	28,90	0,25	0,062				
	UT5 701	2000 ng/ml	28,28	28,21		28,25	0,05	0,003				
Kalibrator	2000 ng/ml	27,36	27,58	27,41	27,45	0,11	0,013					

8.4 Tabellarische Auflistung der Western Blot Daten

Tabelle 8.15 Statistische Daten der Western Blot Ergebnisse an Tumorgewebe, MW: Mittelwert, SD: Standardabweichung

Tumor		Tumor		Tumor		Tumor		Tumor		MW	SD
FaDu #818	1,63	FaDu #817	0,67	FaDu #861	1,85	FaDu #816	0,90	FaDu #904	1,02	1,21	0,50
UT15 #182	2,62	UT15 #243	0,94	UT15 #388	2,65	UT15 #180	0,89	UT15 #386	1,19	1,66	0,90
UT14 #100	2,67	UT14 #101	1,06	UT14 #574	2,20	UT14 #99	1,00	UT14 #102	2,07	1,80	0,74
XF354 #736	2,01	XF354 #547	0,70	XF354 #653	1,58	XF354 #737	1,10	XF354 #332	1,03	1,28	0,51
UT5 #694	3,17	UT5 #684	1,02	UT5 #19	2,12	UT5 #438	1,20	UT5 #112	1,91	1,88	0,85
Kalibrator	1,00	Kalibrator	1,00	Kalibrator	1,00	Kalibrator	1,00	Kalibrator	1,00		
SAS #926	1,22	SAS #223	1,29	SAS #75	0,73	SAS #927	0,90	SAS #934	1,34	1,10	0,26
UT45 #991	1,09	UT45 #221	5,53	UT45 #35	1,65	UT45 #38	1,33	UT45 #220	1,30	2,18	1,88
Kalibrator	1,00	Kalibrator	1,00	Kalibrator	1,00	Kalibrator	1,00	Kalibrator	1,00		

8.5 Verwendete Kits

Kit	Funktion	Firma
RNeasy®Mini Kit (50)	RNA-Extraktion	QIAGEN
RNase-Free DNase Set (50)	DNA Abbau auf der Extraktionssäule	QIAGEN
Reverse-iT™ 1st Strand Synthesis Kit	Reverse Transkription	ABgene

8.6 Verwendete Puffer und Lösungen

PBS 10x (pH 7,3 – 7,4)

Substanz	Menge
Kaliumchlorid (KCl) 2,68 mM	2 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) 1,47 mM	2 g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 8,09 mM	11,5 g
Natriumchlorid (NaCl) 136,7 mM	80 g
mit A. dest auf 1 L auffüllen	

TBS 10x pH (7,6 ± 0,2)

Substanz	Menge
Tris HCl 502,47 mM	61 g in 500 ml A. dest lösen
Natriumchlorid (NaCl) 3 M	175,3 g
mit A. dest auf 1 L auffüllen	

TBE 5x

Substanz	Menge
Tris Base 450 mM	54 g
Borsäure 450 mM	27,5 g
0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 ml
mit A. dest auf 1 L auffüllen	

Phosphatpuffer 0,1 M mit 50 mM Glutamat (pH 7,0)

Substanz	Menge
Kaliumdihydrogenphosphat Trihydrat ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$)	0,2758 g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) 2,95	0,4195 g
Natrium Glutamat	0,423 g
mit A. dest auf 50 ml auffüllen	

Phosphatpuffer 0,3 M (pH 7,0)

Substanz	Menge
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	0,661 g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	1,44 g
mit A. dest auf 50 ml auffüllen	

TE-Puffer 10x (pH 7,5)

Substanz	Menge
Tris-HCl 100mM	0,6057 g
EDTA 10 mM	0,1861 g
mit A. dest auf 50 ml auffüllen	

Transferpuffer

Substanz	Menge
Tris-Base 48 mM	2,91 g
SDS (10 % m/v) 1,3 mM	187,5 μl
Glycine 39 mM	1,465 g

10 x MOPS (pH 7,0)

Substanz	Menge
MOPS free acid 0,2 M	41,854 g
Natriumacetat 0,05 M	6,804 g
EDTA 0,01 M	3,7224 g
mit H ₂ O _{DEPC} auf 1 auffüllen	

2x Laemmli-Puffer (Ladepuffer)

Substanz	Menge
Tris-HCl 125 mM	0,2955 g
SDS (10 % m/v)	6 ml
Glycerol 20 %	3 ml
β-Mercaptoethanol	1,5 ml
Bromphenolblau 2,5 %	750 µl
mit A. dest auf 15 ml auffüllen	

5x SDS-PAGE-Laufpuffer

Substanz	Menge
Tris-HCl 25 mM	15,1 g
Glycin 250 mM	94 g
SDS (10 % m/v)	50 ml
mit A. dest auf 1 l auffüllen	

6x DNA-Gelladepuffer

Substanz	Menge
Sukrose	4 g
EDTA	1 ml
SDS (10 % m/v)	1 ml
Orange G	Spatelspitze Pulver
mit A. dest auf 10 ml auffüllen	

FMN

25 mg (entspricht einer Verpackungseinheit) in 9,5 ml 0,3 M Phosphatpuffer lösen

DTT (Dithiothreitol)

250 mg (entspricht einer Verpackungseinheit) DTT in 25 ml A. dest lösen

1 M Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

4,2 g NaHCO₃ in 50 ml A. dest lösen, leicht erwärmen (Heizplatte)

640 mM Decanal in Methanol

1,204 ml Decanal mit Methanol auf 10 ml auffüllen (Abzug)

0,1 % DEPC-Wasser

1 ml DEPC zu 1 l H₂O geben und über Nacht rühren, anschließend autoklavieren

TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Name: Quennet
Vornamen: Verena Beate Kathrin
Geburtsname: Banning
Geburtsdaten: 28.09.1977 in Köln
Anschrift: Zedernweg 1
65451 Kelsterbach

Schulbildung:

1983 - 1984 Deutsche Schule Jeddah (Saudi Arabien)
1984 - 1988 Colegio Humboldt Caracas (Venezuela)
1988 - 1992 Michael-Grzimek-Schule Nairobi (Kenia)
1992 - 1996 Rhein-Sieg-Gymnasium Sankt Augustin

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,7

Hochschulausbildung:

1996 - 2002 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Diplomarbeit: Autoökologische und ethologische Untersuchungen an arid-adaptierten Pfeilgiftfröschen Boliviens
Diplomvater: Prof. Dr. Wolfgang Böhme

Abschluss: Diplom-Biologin, Gesamtnote: 1,4

Berufspraxis:

Mai 2003- Oktober 2006 Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fachbereich Medizin:
Im Rahmen der Promotion Bearbeitung eines DFG-Forschungsprojekts im Bereich Tumorforschung
Doktorvater: Prof. Dr. Wolfgang Müller-Klieser

Thema der Promotion: Bedeutung des Glukosestoffwechsels für die Strahlenempfindlichkeit solider Tumoren

Voraussichtlicher Abschluss: Dezember 2006