

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

**Metabolische Wirkung einer spezifischen Inhibition
des Monocarboxylat-Transporters-1 (MCT1)
in Ovarialkarzinomzellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Andreas Klein
aus Limburg a.d. Lahn

Mainz, 2020

Tag der Promotion:

08.12.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis	10
1 Einleitung	12
2 Literaturdiskussion	15
2.1 Tumorerkrankungen	15
2.2 Ovariakarzinome.....	17
2.2.1 Klassifikation und Epidemiologie	17
2.2.2 Risikofaktoren	18
2.2.3 Symptome und Diagnose	19
2.2.4 Therapie und Prognose	21
2.3 Tumormetabolismus	22
2.3.1 Energiestoffwechsel solider Tumoren (aerobe Glykolyse).....	22
2.3.2 Monocarboxylat-Transporter (MCT)	28
2.3.3 Inhibitoren der Monocarboxylat-Transporter (MCT)	34
3 Material und Methoden.....	39
3.1 Material.....	39
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	39
3.1.2 Geräte	40
3.1.3 Materialien.....	41
3.1.4 Software	41
3.2 Zellkultur	43
3.2.1 Zelllinien	43
3.2.2 Kultivieren und Passagieren.....	44
3.2.3 Automatisierte Zellzählung	45
3.2.4 Mykoplasmentest	45
3.3 Bestimmung metabolischer Parameter.....	46
3.3.1 Super-GL2-Analysator.....	46
3.3.2 Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3	48
3.4 Toxizitätsbestimmung mittels XTT-Assay	53
3.5 Immunhistologische Darstellung der MCT1- und MCT4-Expression	54
3.6 Statistische Auswertung	59
4 Ergebnisse	60
4.1 Einfluss von α -CHC und AR-C155858 auf ausgewählte metabolische	

Parameter.....	60
4.1.1 Laktatproduktionsraten.....	61
4.1.2 Glukoseverbrauchsraten.....	65
4.1.3 Extrazelluläre Azidifizierungsraten.....	70
4.1.4 Sauerstoffverbrauchsraten.....	74
4.2 Toxizität von α -CHC und AR-C155858.....	79
4.3 Expression von MCT1 und MCT4.....	83
5 Diskussion.....	87
5.1 Diskussion der Methoden.....	87
5.1.1 Methoden der Zellkultur.....	87
5.1.2 Metabolische Untersuchungen.....	88
5.1.3 Toxizitätsmessungen.....	92
5.1.4 Immunhistologische Fluoreszenzanalyse.....	93
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	94
5.2.1 Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsraten.....	95
5.2.2 Sauerstoffverbrauchs- und Azidifizierungsraten.....	99
5.2.3 Toxizität.....	102
5.2.4 MCT-Expressionsmuster.....	103
5.2.5 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....	104
6 Zusammenfassung.....	108
7 Literaturverzeichnis.....	109
8 Anhang.....	125
Danksagung.....	144
Lebenslauf.....	145

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
7-ACC	7-Aminocarboxycoumarins
α	Alpha
α -CHC / CHC	α -cyano-4-hydroxy cinnamate (α -Cyano-4-Hydroxizimtsäure)
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro-
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AR-C	AR-C155858
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintri-phosphat
BRCA1	Breast Cancer 1
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CD	cluster of differentiation
ca.	circa
CA-125	Cancer-Antigen 125
CHC / α -CHC	α -cyano-4-hydroxy cinnamate (α -Cyano-4-Hydroxizimtsäure)
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DIDS	Di-Isothiocyano-stilbene-Disulfonat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e ⁻	Elektron
ECAR	Extracellular Acidification Rate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoietin
et al.	und andere
etc.	et cetera
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)

FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FU	Fluoruracil
G	Grünwert
g	Gramm
GHB	Gammahydroxybuttersäure
Glu	Glukose
GLUT	Glukosetransporter
gp	Glykoprotein
GSH	Glutathion
GVR	Glukoseverbrauchsrate
h	Stunde
H+	Proton
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor-1 α
HPV	humane Papillomviren
HRE	hypoxia responsive element
HRP	Horseradish (Meerrettich) Peroxidase
k	Kilo-
K _i	Inhibitorkonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
L/G	Laktat/Glukose-Quotient
Lak	Laktat
LDH	Laktatdehydrogenase
LPR	Laktatproduktionsrate
m	Milli-
M	Molar
MCT	Monocarboxylat-Transporter
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minuten
MW	Mittelwert
N	Stickstoff
n	Anzahl
n	Nano-
N/A	nicht anwendbar
NAD ⁺ und NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ und NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NHE1	Na ⁺ -H ⁺ -Austauscher 1
O ₂	Sauerstoff
OC	OC316
OCR	Oxygen Consumption Rate
OP	Operation
Oxidat. Stoffw.	Oxidativer Stoffwechsel
p	Signifikanzwert
p	Piko-
PBS	Phosphor buffered saline
p-cMBS	p-chlomercuribenzene-Sulfat
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFK	Phosphofruktokinase
pH	power of hydrogen
PPi	Pyrophosphat
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
S	Schwarzwert
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
sh	small hairpin
SLC	sodium linked carrier
Tab.	Tabelle
UICC	Union internationale contre le cancer
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	Versus
Wdh.	Wiederholungen
XTT	2,3-bis(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxyanilide
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)
- Abbildung 2 Stoffwechselwege in Tumorzellen, metabolische Vorteile der aeroben Glykolyse und Ansatzpunkte von HIF-1 α und wichtiger Onkogene
- Abbildung 3 Vor- und Nachteile der aeroben Glykolyse für Tumorzellen
- Abbildung 4 Topologie der MCTs am Beispiel des MCT1 und seines Chaperons CD147
- Abbildung 5 Stoffwechselwege mit Beteiligung von MCT
- Abbildung 6 Modell zur Symbiose zwischen Tumor-Kompartimenten
- Abbildung 7 Analyte des Extracellular Flux Analyzers XF 24/3 im Kontext des Zellstoffwechsels
- Abbildung 8 Versuchsaufbau des Extracellular Flux Analyzers XF 24/3
- Abbildung 9 Schematische Darstellung des Prinzips der Immunfluoreszenz
Computerbasierte Auswertung der Immunfärbungen mittels imageJ
- Abbildung 10 Basale Laktatproduktionsraten (LPR) der verwendeten Zelllinien
- Abbildung 11 Laktatproduktionsraten von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an α -CHC
- Abbildung 12 Laktatproduktionsraten von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858
- Abbildung 13 Laktatproduktionsraten von OC316 shRNA und OC316 shMCT4 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858
- Abbildung 14 Änderung der Laktatproduktionsraten aller untersuchten Kombinationen aus Zelllinie und Inhibitor
- Abbildung 15 Basale Glukosverbrauchsraten (GVR) der verwendeten Zelllinien
- Abbildung 16 Glukoseverbrauchsraten von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an α -CHC
- Abbildung 17 Glukoseverbrauchsraten von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858
- Abbildung 18 Glukoseverbrauchsraten von OC316 shRNA und OC316 shMCT4 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858
- Abbildung 19 Änderung der Glukoseverbrauchsraten aller untersuchten Kombinationen aus Zelllinie und Inhibitor
- Abbildung 20 Basale Azidifizierungsraten (ECAR) der verwendeten Zelllinien
- Abbildung 21 Azidifizierungsraten von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an α -CHC

- Abbildung 22 Azidifizierungsraten von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858
- Abbildung 23 Azidifizierungsraten von OC316 shRNA und OC316 shMCT4 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858
- Abbildung 24 Änderung der Azidifizierungsraten aller untersuchten Kombinationen aus Zelllinie und Inhibitor
- Abbildung 25 Basale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) der verwendeten Zelllinien
- Abbildung 26 Sauerstoffverbrauchsrate von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an α -CHC
- Abbildung 27 Sauerstoffverbrauchsrate von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858
- Abbildung 28 Sauerstoffverbrauchsrate von OC316 shRNA und OC316 shMCT4 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858
- Abbildung 29 Änderung der Sauerstoffverbrauchsrate aller untersuchten Kombinationen aus Zelllinie und Inhibitor
- Abbildung 30 Überlebenskurven von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an α -CHC
- Abbildung 31 Überlebenskurven von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858
- Abbildung 32 Überlebenskurven von OC316 shRNA und OC316 shMCT4 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858
- Abbildung 33 Attribuierbare Toxizität der Inhibitoren auf die jeweiligen Zelllinien
- Abbildung 34 Repräsentative Bildausschnitte der Immunfluoreszenzanalyse auf MCT1
- Abbildung 35 Expression von MCT1 in den untersuchten Zelllinien
- Abbildung 36 Repräsentative Bildausschnitte der Immunfluoreszenzanalyse auf MCT4
- Abbildung 37 Expression von MCT4 in den untersuchten Zelllinien
- Abbildung 38 Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsrate im Verlauf über 24 Stunden
- Abbildung 39 Verlauf der Azidifizierungs- und Sauerstoffverbrauchsrate

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Die FIGO- und TNM-Klassifikation der Ovarialtumoren
Tab. 2	5-Jahres-Überlebensrate bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung
Tab. 3	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien
Tab. 4	Ablauf der Stoffwechselfmessungen mit dem Super-GL2-Analysator
Tab. 5	Ablauf der Stoffwechselfmessungen mit dem Extracellular Flux Analyzer XF 24/3
Tab. 6	Ablauf der automatisierten Vorgänge im Extracellular Flux Analyzer XF 24/3
Tab. 7	Ablauf der Viabilitätsbestimmung mittels XTT-Assay
Tab. 8	Ablauf der Immunfluoreszenzanalyse
Tab. 9	Übersicht über die Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsraten von IGROV-1 und OC316 mit daraus folgenden Laktat/Glukose-Quotienten
Tab. 10	Einzeldaten der Versuche mit IGROV-1 und α -CHC am GL-2-Analysator
Tab. 11	Einzeldaten der Versuche mit OC316 und α -CHC am GL-2-Analysator
Tab. 12	Einzeldaten der Versuche mit IGROV-1 und AR-C155858 am GL-2-Analysator
Tab. 13	Einzeldaten der Versuche mit OC316 und AR-C155858 am GL-2-Analysator
Tab. 14	Einzeldaten der Versuche mit OC316 shRNA und AR-C155858 am GL-2-Analysator
Tab. 15	Einzeldaten der Versuche mit OC316 shMCT4 und AR-C155858 am GL-2-Analysator
Tab. 16	ECAR-Einzeldaten der Messungen mit IGROV-1 und OC316 unter α -CHC am XF Analyzer 24/3
Tab. 17	OCR-Einzeldaten der Messungen mit IGROV-1 und OC316 unter α -CHC am XF Analyzer 24/3
Tab. 18	ECAR-Einzeldaten der Messungen mit IGROV-1 und OC316 unter AR-C155858 am XF Analyzer 24/3
Tab. 19	OCR-Einzeldaten der Messungen mit IGROV-1 und OC316 unter AR-C155858 am XF Analyzer 24/3
Tab. 20	ECAR-Einzeldaten der Messungen mit OC316 shRNA und OC316 shMCT4 unter AR-C155858 am XF Analyzer 24/3
Tab. 21	OCR-Einzeldaten der Messungen mit OC316 shRNA und OC316 shMCT4 unter AR-C155858 am XF Analyzer 24/3
Tab. 22	Einzeldaten der XTT-Assays für IGROV-1 unter α -CHC
Tab. 23	Einzeldaten der XTT-Assays für OC316 unter α -CHC
Tab. 24	Einzeldaten der XTT-Assays für IGROV-1 unter AR-C155858

- Tab. 25 Einzeldaten der XTT-Assays für OC316 unter AR-C155858
Tab. 26 Einzeldaten der XTT-Assays für OC316 shRNA unter AR-C155858
Tab. 27 Einzeldaten der XTT-Assays für OC316 shMCT4 unter AR-C155858
Tab. 28 Einzeldaten der Immunfluoreszenzanalyse

1 Einleitung

Die meisten malignen Tumoren gehen mit einer hohen Sterblichkeit der Patienten einher, weshalb sie im Allgemeinen wohl zu den meistgefürchteten Erkrankungen gehören und häufig einen drastischen, mitunter lebensbedrohlichen, Einschnitt für die Betroffenen darstellen. Mit der Diagnose gehen oft nicht nur körperliche Symptome, sondern auch eine enorme psychische Belastung für die Betroffenen und ihr Umfeld einher. Auch gesamtgesellschaftlich stellen Krebserkrankungen angesichts hoher Fallzahlen und teils langwieriger sowie arbeits- und kostenintensiver Therapien einen bedeutenden Faktor dar (Robert-Koch-Institut 2019). Daraus wird ersichtlich, warum der Erforschung der den Tumorerkrankungen zugrundeliegenden zellphysiologischen Mechanismen seit Jahrzehnten große Beachtung zukommt (Hiddemann et al. 2010).

Ein in diesem Zusammenhang intensiv erforschter Aspekt ist der Stoffwechsel maligner Zellen. Tumorzellen verstoffwechseln erheblich mehr Glukose als gesunde Zellen, unabhängig vom Sauerstoffangebot. Durch die erhöhte glykolytische Aktivität bilden die Tumorzellen verstärkt Laktat, welches sich im Tumorgewebe akkumuliert. Nachdem initial davon ausgegangen wurde, dass dieser Umstand aus einer Störung der Mitochondrien und der Mechanismen der aeroben Energiegewinnung resultiert, stellte sich die Bevorzugung der Glykolyse zur Energiegewinnung später als in vielerlei Hinsicht vorteilhaft für die Tumorzellen und deren Wachstum sowie Überleben heraus. Im Rahmen der Glykolyse entstehen dabei pro Glukose-Molekül neben zwei Molekülen des reduzierten Cofaktors NADH/H^+ sowie zwei ATP-Molekülen zwei Pyruvat-Moleküle. Um Cofaktoren für die Glykolyse weiterer Glukose-Moleküle zu oxidieren und dadurch zu regenerieren, werden die entstandenen Pyruvat-Moleküle anschließend zu Laktat reduziert. Um dieses aus der Zelle zu schleusen und damit eine zu starke Ansäuerung des intrazellulären Milieus zu verhindern, weisen Tumorzellen deshalb eine verstärkte Expression von Monocarboxylat-Transportern (MCT) auf der Oberfläche ihrer Membran auf, unter denen insbesondere die Isoformen MCT1 und MCT4 als für den Laktattransport von Tumorzellen von Bedeutung identifiziert werden konnten (Martinez-Outschoorn et al. 2017, Miranda-Goncalves et al. 2013, Halestrap & Wilson 2012, Pinheiro et al. 2008, Halestrap & Meredith 2004). Auf Basis dieser Erkenntnis wurden in der Vergangenheit verschiedene unspezifische

und spezifische Inhibitoren dieser Membrantransporter entwickelt und deren Potenzial zur Hemmung des Wachstums und Stoffwechsels von Tumorzellen in zahlreichen Studien nachgewiesen (Belouèche-Babari et al. 2020, Huang et al. 2020, Bola et al. 2014, Doherty et al. 2014, Polański et al. 2014, Diers et al. 2012, Colen et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen der Applikation des spezifischen MCT1-Inhibitors AR-C155858 auf den Stoffwechsel von Ovarialkarzinomzellen analysiert werden. Dazu sollten die Effekte von AR-C155858 auf verschiedene Stoffwechselfparameter (s.u.) zweier humaner Ovarialkarzinom-zelllinien mit unterschiedlicher Expression der MCT-Isoformen und unterschiedlich hoher glykolytischer Aktivität (IGROV-1 und OC316, vgl 3.2.1) untersucht und jenen des unspezifischen MCT-Hemmstoffs α -CHC (α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure) gegenübergestellt werden. Zudem sollte das Potenzial von AR-C155858 für eine kombinierte Anwendung gemeinsam mit einem spezifischen MCT4-Hemmstoff wie dem kürzlich entwickelten AZ93, zu dem jedoch noch keine präklinischen Daten vorliegen, oder dem erst kürzlich als spezifischem MCT4-Inhibitor identifizierten Bindarit exploriert werden (Marchiq & Pouyssegur 2016, Futagi et al. 2018; vgl 2.3.3). Hierzu sollten neben den nativen Zelllinien auch OC316-Zellen untersucht werden, bei denen mittels Transduktion eines shRNA enthaltenden lentiviralen Vektors die MCT4-Expression signifikant vermindert worden war („MCT4-Knockdown“). Als zu untersuchende Stoffwechselfparameter wurden Glukoseverbrauch, Laktatproduktion, Sauerstoffverbrauch sowie Azidifizierung des umgebenden Milieus gewählt und die Toxizität der Substanzen betrachtet. Die Ergebnisse hinsichtlich der Suszeptibilität der unterschiedlichen Zelllinien gegenüber den Inhibitoren sollten im Anschluss mithilfe einer immunhistologischen Darstellung der MCT-Expressionsmuster diskutiert werden, um auf diesem Weg Hemmwirkung des Glukosestoffwechsels und MCT-Expression miteinander in Verbindung bringen zu können.

Zusammenfassend wurde der Einfluss einer spezifischen MCT-1-Inhibition auf den Glukosemetabolismus in niedrigglykolytischen Zellen mit gering ausgeprägter MCT4-Expression und in hochglykolytischen Zellen mit stark ausgeprägter MCT4-Expression untersucht, sowie die Frage, ob letztere aufgrund ihrer höheren MCT4-Expression weniger suszeptibel für eine spezifische MCT1-Inhibition sind. Zudem wurde untersucht, ob unter gentechnischer Herabregulation der MCT4-Expression eine

Potenzierung der Hemmwirkung einer spezifischen MCT1-Inhibition beobachtet werden kann.

Auf diese Weise sollte das Potenzial von AR-C155858 für die Tumorforschung weiter exploriert sowie ein Ausblick gewagt werden auf die Möglichkeiten, die eine kombinierte Anwendung spezifischer MCT-1- und MCT4-Inhibitoren bieten könnte.

2 Literaturdiskussion

2.1 Tumorerkrankungen

Unter dem Begriff Tumor (lat. Geschwulst) fasst die medizinische Nomenklatur im weiteren Sinne jegliche Schwellung unabhängig ihrer Ätiologie zusammen. Obwohl demzufolge beispielsweise eine Sprunggelenksschwellung infolge eines Sportunfalls auch unter die Kategorie Tumor fällt, ist die Verwendung dieser Bezeichnung in der Regel neoplastischen Erkrankungen (Gewebsneubildungen) vorbehalten. Diese werden wiederum anhand verschiedener Charakteristika, zu denen etwa das Wachstumsverhalten und die Neigung zur Ausbildung von Tochtergeschwulsten (Metastasen) zählen, in benigne und maligne Tumoren unterteilt, wobei letztere gemeint sind, wenn von einer „Krebserkrankung“ die Rede ist (Aigner & Stephens 2016, Hiddemann et al. 2010, Pfeifer et al. 2006).

In Deutschland erkrankten im Jahr 2016 rund 233.570 Frauen und 258.520 Männer an Krebs, was einer Steigerung von 5% bzw. 2% gegenüber dem Jahr 2006 entsprach (Robert-Koch-Institut 2019). Die häufigsten Krebsneuerkrankungen bei Frauen waren 2016 Brustdrüsen-, Darm- und Lungenkrebs, während Männer am häufigsten an Prostatakrebs erkrankten, ebenfalls gefolgt von Lungen- und Darmkrebs (Robert-Koch-Institut 2019, vgl. Abb. 1). Mit einem Anteil von 25,3% stellten Krebserkrankungen 2015 nach Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt 2017).

Die für alle Krebserkrankungen zusammengefasste relative 5-Jahres-Überlebensrate lag 2015-2016 bei 65% für Frauen und 59% für Männer. Dabei existieren jedoch immense Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten: So wiesen etwa Prostata- und Hodenkrebs eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 90% auf, während weniger als 10% der an Bauchspeicheldrüsenkrebs erkrankten Patienten diesen Zeitraum überleben. Auch wenn die auslösenden Mechanismen der Karzinogenese immer besser verstanden und stetig Fortschritte bei den Therapiemöglichkeiten gemacht werden, wurden für das Jahr 2018 etwa 509.780 neue Krebsfälle in Deutschland erwartet (Robert-Koch-Institut 2019).

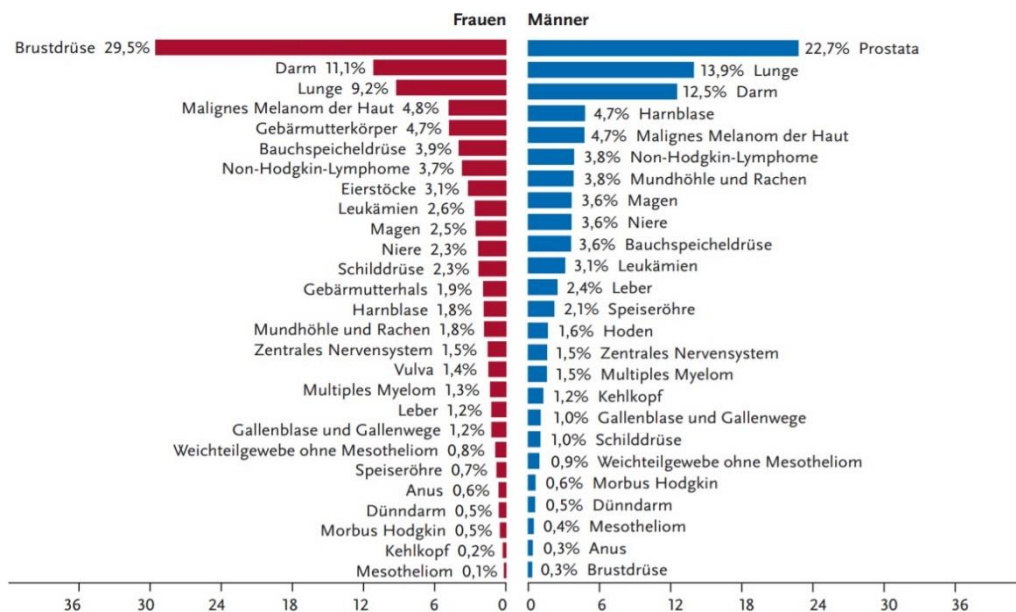


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)
 Übernommen vom Robert-Koch-Institut (2019)

Der Karzinogenese, also der Transformation einer gesunden Körperzelle in eine maligne, können verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Angeborenen genetischen Ursachen wird dabei ein Anteil von 5-10% an allen Krebsfällen zugesprochen, während der restliche Großteil der Fälle aus erworbenen Genaberrationen resultiert (Anand et al. 2008). Grundsätzlich lassen sich sowohl angeborene als auch erworbene Genveränderungen unterteilen in die Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Halazonetis et al. 2008, Pfeifer et al. 2006). Als wichtigste Auslöser für erworbene Abberationen gelten chemische (z.B. Zigarettenrauch beim Bronchialkarzinom) und physikalische (z.B. UV-Strahlung beim malignen Melanom) Noxen. Aber auch bakterielle und vor allem virale Erkrankungen können Triggerfaktoren für die Krebsentstehung sein, wie das Beispiel der humanen Papillomviren (HPV) deutlich macht, die für über 90% der Gebärmutterhalskrebserkrankungen verantwortlich gemacht werden. Schließlich scheinen auch allgemeine Faktoren wie Übergewicht oder Bewegungsmangel das Risiko für eine Krebserkrankung zu erhöhen (Anand et al. 2008, Kumar et al. 2012, Gallagher et al. 2010; Hunn & Rodriguez 2012; Reeves et al. 2007, Irigaray et al. 2008).

Infolge der Karzinogenese verfügt die maligne Zelle über einige typische Eigenschaften, die sie von gesunden Körperzellen unterscheiden und die von

Hanahan & Weinberg (2000; 2011) als die elf „hallmarks of cancer“ zusammengefasst wurden. Neben der Fähigkeit zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung oder der unbegrenzten Proliferation gehören zu diesen Meilensteinen auch Aspekte des Energiestoffwechsels, der in Kapitel 2.3 eingehender thematisiert wird und für die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit von großer Bedeutung ist.

2.2 Ovarialkarzinome

In der vorliegenden Arbeit wurde mit vier verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien gearbeitet, darunter zwei native und zwei gentechnisch modifizierte Zelllinien (vgl. 3.2.1).

2.2.1 Klassifikation und Epidemiologie

Maligne Tumoren der Ovarien zeichneten 2016 für ca. 3,1% der Krebsneuerkrankungen bei Frauen verantwortlich (Robert-Koch-Institut 2019). Unter den Ovarialtumoren sind die Tumoren epithelialen Ursprungs (Karzinome) mit ca. 65-75% die häufigsten. Deutlich seltener sind Keimzell- (ca. 15%) und gonadale Stromatumoren (ca. 7%) sowie Metastasen anderer Primärtumoren (6-10%; Hiddemann et al. 2010). Shih und Kurman (2004; 2011) führten ein dualistisches Modell zur Einteilung der Ovarialkarzinome anhand ihrer Pathogenese ein. Zum Typ 1 gehören dabei niedriggradig-seröse, niedriggradig-endometrioide, klarzellige und muzinöse Tumoren. Sie sind charakterisiert durch spezifische Mutationen, etwa in KRAS oder ErbB2, und werden als indolent und genetisch relativ stabil beschrieben. Typ 2 umfasst hingegen hochgradig-seröse, hochgradig-endometrioide und undifferenzierte Karzinome sowie mesodermale Mischtumoren. Sie werden als aggressiv und genetisch instabil beschrieben und weisen in den meisten Fällen eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 auf, jedoch keine der oben genannten Mutationen.

Die Stadieneinteilung für Ovarialtumoren erfolgt nach der FIGO-Klassifikation (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*) und definiert anhand der Krankheitsausbreitung vier - mit dem *Carcinoma in Situ* fünf - Stadien (vgl. Tabelle 1).

Sie ist weitestgehend analog zur TNM-Klassifikation der UICC (*Union internationale contre le cancer*), die ein einheitliches Klassifikationssystem für maligne Neoplasien unterschiedlichen Ursprungs darstellt (Wittekind 2017).

Tabelle 1: Die FIGO- und TNM-Klassifikation der Ovarialtumoren (modif. nach Wittekind 2017)

FIGO	TNM	Kriterien
0	Tis	Carcinoma in Situ; ausschließlich intraepitheliales Wachstum ohne Infiltrierung der Basallamina
I	T1	Tumor auf ein Ovar oder beide Ovarien begrenzt
II	T2	Ausbreitung ins kleine Becken
III	T3	Histologisch nachweisbare Peritonealmetastasen außerhalb des kleinen Beckens und/oder regionäre Lymphknotenmetastasierung
IV	M1	Fernmetastasen außerhalb der Peritonealhöhle

Laut dem Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut (2019) erkrankten im Jahr 2016 in Deutschland 7.350 Frauen an einem Ovarialtumor. Im Laufe ihres Lebens erkrankt etwa eine von 75 Frauen, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei ca. 68 Jahren liegt. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate betrug 2015-2016 ca. 43%, was im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen der Geschlechtsorgane einen niedrigen Wert darstellt, welcher auf das häufig erst späte Eintreten einer Symptomatik zurückgeführt wird. Sowohl Erkrankungs- als auch Sterberaten weisen in Deutschland seit der Jahrtausendwende jedoch einen Rückgang auf, was unter anderem in einen Zusammenhang mit der zunehmenden Einnahme von Hormonpräparaten zur Empfängnisverhütung gebracht wird (Robert-Koch-Institut 2019, Tumorzentrum München 2014).

2.2.2 Risikofaktoren

Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Robert-Koch-Institut 2019). Ein enger Zusammenhang besteht zwischen dem Erkrankungsrisiko und hormonellen Mechanismen: So steigt das Risiko etwa mit der

kumulativen Anzahl an Ovulationen im Verlauf des Lebens, was auf Verletzungen des Oberflächenepithels während des Eisprungs zurückgeführt wird (Hunn & Rodriguez 2012). Auf der Suche nach einer molekulargenetischen Erklärung für diese Hypothese postulieren Hakim et al. (2009) einen direkten Zusammenhang zwischen der Anzahl an Ovulationen und Veränderungen im Tumorsuppressorgen p53, die fehlerhafte Zellteilungen begünstigt. Entsprechend wirken Schwangerschaften ebenso protektiv wie die längerfristige Einnahme von Ovulationshemmern (Daly & Orams 1998) oder eine verlängerte Stillzeit (Su et al. 2013), während eine frühe Menarche oder ein spätes Klimakterium das Risiko erhöhen (Schildkraut et al. 1997).

Auch familiäre Disposition spielt insofern eine Rolle, als dass Frauen, in deren erstgradiger Verwandtschaft Fälle von Brust- oder Eierstockkrebs auftraten, ein erhöhtes Erkrankungsrisiko tragen (Hunn & Rodriguez 2012). Ein Aspekt dieser familiären Disposition ist die Keimbahnmutation im BRCA1-Gen. Eine Mutation innerhalb dieses Tumorsuppressorgens erhöht das Risiko zur Ausbildung einer malignen Neoplasie, besonders für Brust-, Ovarial- und Kolontumoren (Boulton 2006, Easton et al. 1995).

2.2.3 Symptome und Diagnose

Ovarialtumoren bleiben in den meisten Fällen lange klinisch stumm, was die Einleitung einer Therapie verschleppt und die Prognose verschlechtert. Erst in fortgeschrittenen Stadien kann es aufgrund der Tumorausdehnung zu Schmerzen und Kompressionserscheinungen wie Obstipation, Völlegefühl oder erhöhter Miktionsfrequenz kommen oder der Tumor wird im unteren Bauchraum ertastbar. Selten kann auch die sogenannte Facies ovarica beobachtet werden, die eine Tumorkachexie mit eingefallenem Gesicht in Kombination mit aufgrund des Aszites vorgewölbtem Bauch beschreibt (Bankhead et al. 2005, Leitlinienprogramm Onkologie 2019). Bei einer Metastasierung können vielfältige Symptome je nach Absiedlungsort auftreten, wobei Ovarialkarzinome am häufigsten über die Peritonealflüssigkeit in andere Bauchorgane bzw. lymphogen in die pelvinen und iliakalen Lymphknoten streuen (Hiddemann et al. 2010).

In den aktuellen Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft aus dem Jahr 2019

wird von einem generellen Screening mittels Bestimmung des Tumormarkers CA125 und transvaginalem Ultraschall abgeraten, was mit der niedrigen Inzidenz von Ovarialtumoren sowie dem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko operativer Eingriffe bei falsch-positiven Patientinnen erklärt wird und zudem im Zusammenhang mit einer unzureichenden Spezifität und Sensitivität von CA125 zu sehen ist (Leitlinienprogramm Onkologie 2019, Dong et al. 2014). Aus diesem Grund und infolge des späten Auftretens von Symptomen befinden sich 60-70% der an einem Ovarialkarzinom erkrankten Frauen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in FIGO-Stadium III oder IV (Colombo et al. 2012, Argento et al. 2008; vgl. Tabelle 1). Nur 23% der Ovarialkarzinome können durch entsprechende Screening-Untersuchungen im Frühstadium entdeckt werden, was umso dramatischer erscheint in Anbetracht der Zahlen für Gebärmutterhalskrebs, endometrialen Krebs und Brustkrebs, welche bei 83%, 77% bzw. 53% liegen (Taylor et al. 2009).

Die Diagnose beruht überwiegend auf transvaginaler Ultraschalluntersuchung, der Bestimmung des Serumspiegels an CA-125, explorativer Laparoskopie und zytologischen Untersuchungen (Lawrie et al. 2013, Fagotti et al. 2013, Testa et al. 2014). CA-125 wird zwar aktuell als bester und am weitest verbreitet eingesetzter Tumormarker für Ovarialkarzinome angesehen (Díaz-Padilla et al. 2012), weist jedoch vielfältige Limitationen auf. So kann auch bei anderen Krebserkrankungen, wie Brust-, Bauchspeicheldrüsen-, Lungen- und Leberkrebs (Szwedziak et al. 2013, Lu et al. 2013, Ahmadi et al. 2014, Partridge et al. 2013, Moore et al. 2012), oder gutartigen Erkrankungen wie Divertikulitis oder Endometriose (Qureshi et al. 2014, Chowdhury et al. 2014) und sogar während der Menstruation (Xie et al. 2014) ein erhöhter CA-125-Wert auftreten. Zudem ist CA-125 zwar stark assoziiert mit dem Auftreten seröser Ovarialkarzinome, jedoch nicht signifikant mit anderen Ovarialkarzinomen wie dem mukösen (van Altena et al. 2007). Entsprechend deutlich wird, dass dieser Tumormarker für sich genommen keine ausreichende Diagnostik zur Frühdiagnose des Ovarialkarzinoms darstellen kann (Braga et al. 2014) und Kombinationen der genannten diagnostischen Verfahren zum Einsatz kommen sollten (Zacharakis et al. 2013, Arun-Muthuvel & Jaya 2014). So erreicht die Kombination aus Ultraschalluntersuchung und CA-125-Bestimmung immerhin eine Sensitivität von 81,7% bei einer Spezifität von 100% (Roupa et al. 2004). Aktuelle Ansätze zur Identifizierung neuer, effektiverer Tumormarker umfassen Microarray-basierte Genexpressions-Studien (Chon & Lancaster 2011, Barton et al. 2008, Jazaeri 2009,

Koukoura et al. 2014, Wittenberger et al. 2014), Proteom-Analysen (Zhang et al. 2009, Petricoin et al. 2002, Tessitore et al. 2013, Ziganshin et al. 2008) und immunhistochemische Verfahren (Kim et al. 2003, Tang et al. 2010).

2.2.4 Therapie und Prognose

Die aktuellen Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft (Leitlinienprogramm Onkologie 2019) empfehlen als Goldstandard ein operatives Vorgehen in Kombination mit adjuvanter Chemotherapie in Form von Carboplatin/Paclitaxel. Der Therapieansatz ist dabei in den Stadien I und II als kurativ und im Stadium IV als palliativ anzusehen, während im Stadium III häufig immerhin eine zufriedenstellende Remission erreicht werden kann. Fertilitätserhaltend kann in der Regel nur im Stadium IA (Tumor auf ein einziges Ovar beschränkt) und bei histologisch gesichertem Grading von G1 operiert werden, ansonsten wird eine sogenannte Staging-OP durchgeführt. Diese umfasst neben Hysterektomie und Adnexektomie, also der Entfernung von Uterus, Ovarien, Tuben und Halteapparat, eine pelvine und paraaortale Lymphadenektomie, eine Deperitonealisierung sowie gegebenenfalls eine Appendektomie. Der Strahlentherapie kommt aktuell aufgrund der intraperitonealen Lage der Ovarien nur in palliativem Rahmen zur Bestrahlung von Knochenmetastasen Bedeutung zu.

Die 5-Jahres-Überlebensrate für das Ovarialkarzinom beträgt 41%, nach 10 Jahren leben noch 32% der Betroffenen. Die Prognose ist jedoch stark abhängig von verschiedenen Prognosefaktoren. Höheres Alter verschlechtert die Prognose ebenso wie ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Diagnose (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2: 5-Jahres-Überlebensrate bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Lasch & Fillenberg 2017)

FIGO-Stadium	5-Jahres-Überlebensrate
I	80-90 %
II	70 %
III	30 %
IV	5 %

2.3 Tumormetabolismus

2.3.1 Energiestoffwechsel solider Tumoren (aerobe Glykolyse)

Die Glykolyse bildet sowohl bei gesunden als auch bei Tumorzellen den Ausgangspunkt des Glukosemetabolismus. Sie umfasst eine Reihe enzymatisch katalysierter Reaktionen, durch die letztlich Glukose zu zwei Pyruvat-Molekülen umgesetzt wird, wobei insgesamt zwei ATP-Moleküle sowie zwei reduzierte Coenzyme NADH entstehen. Unter oxidischen Bedingungen kann Pyruvat anschließend durch den Pyruvatdehydrogenase-Komplex zu Acetyl-CoA oxidativ decarboxyliert werden, wobei pro Pyruvat-Molekül ein weiteres NADH-Molekül entsteht (und somit pro Glukose-Molekül zwei weitere NADH-Moleküle). Das entstandene Acetyl-CoA wird dem Zitratzyklus zugeführt und dort vollständig zu zwei Kohlenstoffdioxid-Molekülen oxidiert, wobei drei weitere NADH-Moleküle sowie ein FADH₂-Molekül entstehen. Die Elektronen der im Rahmen von Glykolyse, Pyruvatdehydrogenase-Komplex und Zitratzyklus entstandenen reduzierten Coenzyme (auch als Reduktionsäquivalente bezeichnet) werden in der Atmungskette in einer Reihe von Redoxreaktionen schrittweise auf Oxidationsmittel und dadurch auf niedrigere Energieniveaus übertragen. Das elektronegative Potenzial der Elektronentransportkette dient zum Transport von Protonen auf der Matrix (Innenraum) der Mitochondrien in deren Intermembranraum. Mit dem so aufgebauten Protonengradienten zwischen den beiden Kompartimenten geht die Ausbildung einer Potenzialdifferenz einher. Die ATP-Synthase schließlich ermöglicht den Protonen den Rückstrom und somit die Reaktion mit elektronegativem Sauerstoff zu Wasser. Die dabei freiwerdende Energie wird von der ATP-Synthase zur Phosphorylierung von ADP zu ATP und somit zur Speicherung der Energie genutzt (vgl. Abb. 1; Berg et al. 2018).

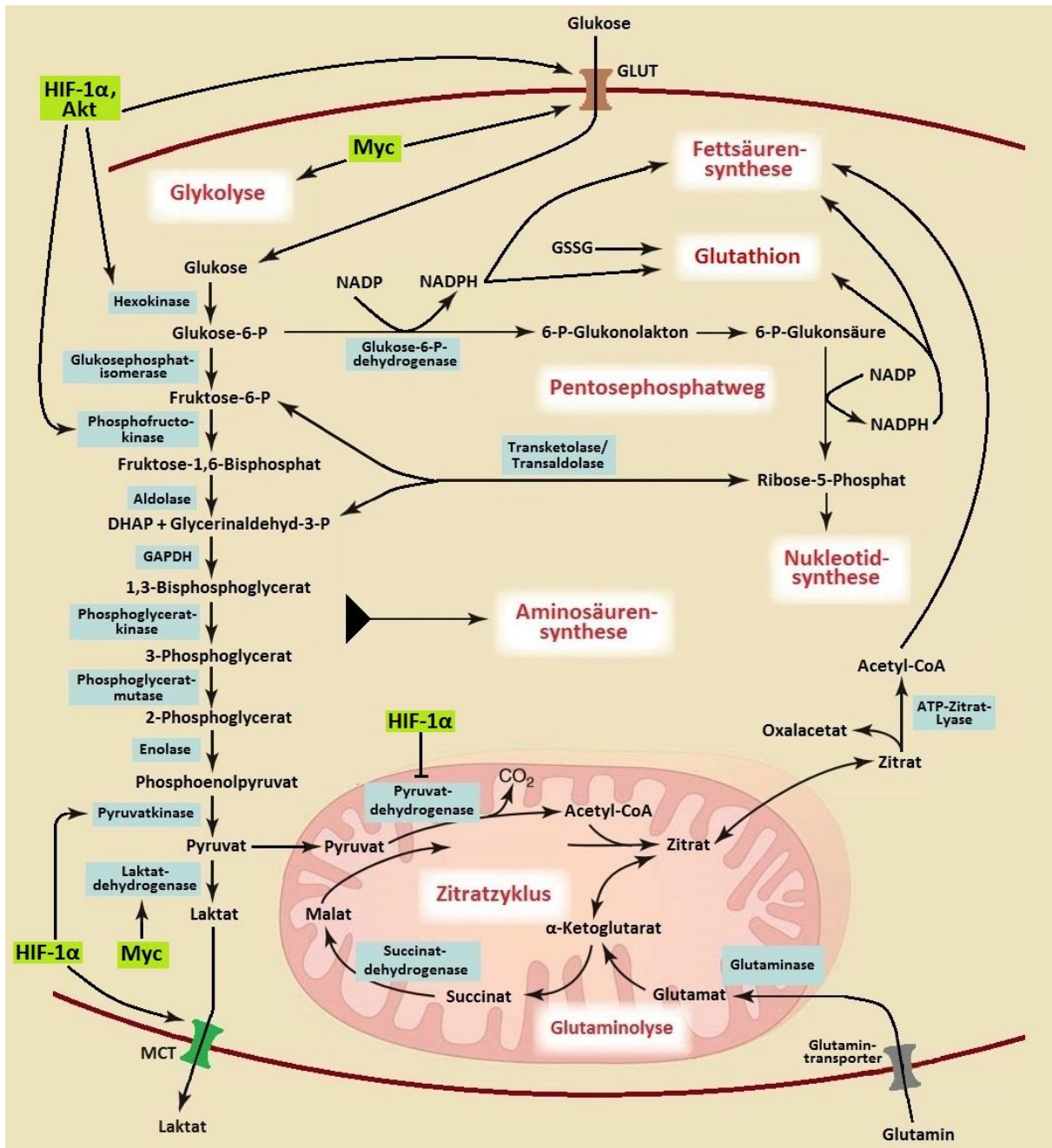


Abb. 1: Stoffwechselwege in Tumorzellen sowie Ansatzpunkte von HIF-1 α und wichtiger Onkogene.

Die Glykolyse liefert Bausteine für die Synthese von Aminosäuren und Fettsäuren. Zudem können Zwischenprodukte der Glykolyse im Rahmen des Pentosephosphatzyklus zur Bereitstellung von Ribosen für die Nukleotidsynthese abgezweigt werden. Im Pentosephosphatzyklus entsteht darüber hinaus reduziertes NADPH, ein Coenzym für die Fettsäurensynthese und die Regeneration reduzierten Glutathions. Des Weiteren sind Auswirkungen einer Aktivierung von HIF-1 α sowie der Onkogene Myc und Akt dargestellt. Grafik modifiziert nach Vander Heiden et al. (2009).

Schon Louis Pasteur beobachtete 1861, dass Hefen unter anaeroben Bedingungen ihre glykolytische Aktivität deutlich steigern (Nelson & Cox 2009). Dieser als Pasteur-Effekt bezeichnete Mechanismus ist praktisch analog zu den Vorgängen in überwiegend anaerob arbeitenden eukaryotischen Zellen. In menschlichen Muskelzellen etwa wird in Phasen hoher Aktivität vermehrt Laktat gebildet. Die erhöhte glykolytische Aktivität lässt sich zum einen durch den im Vergleich zur Atmungskette schnelleren Ablauf der Glykolyse erklären und zum anderen durch den Sauerstoffmangel: Steht nicht ausreichend Sauerstoff zur weiteren Verstoffwechslung des in der Glykolyse produzierten Pyruvats im Rahmen von Citratzyklus und Atmungskette zur Verfügung, muss die Zelle oxidierte Coenzyme (NAD^+) regenerieren, um die Glykolyse weiterer Glucose-Moleküle zu ermöglichen. Als Oxidationsmittel dient hierbei Pyruvat, welches durch die Laktatdehydrogenase zu Laktat reduziert wird (Porporato et al. 2011, Dang et al. 2011, Graham et al. 2014).

Otto Warburg (1924, 1926, 1956) beobachtete, dass Krebszellen auch unter aeroben Bedingungen viel Laktat bilden. Dieser Stoffwechselweg ist deshalb nicht nur unter dem Begriff Warburg-Effekt, sondern auch als „aerobe Glykolyse“ bekannt (Funes et al. 2007). Warburg erklärte die erhöhte glykolytische Aktivität der Krebszellen mit mitochondrialen Defekten, die eine vollständige aerobe Verstoffwechslung der Glukose-Moleküle mittels Atmungskette verhinderten. Während der Mechanismus der aeroben Glykolyse in zahlreichen Studien belegt werden konnte, konnte gezeigt werden, dass ein Defekt in den Mitochondrien nicht die alleinige Ursache für den veränderten Glukosestoffwechsel sein kann: Diverse Arbeitsgruppen konnten eine uneingeschränkte mitochondriale Funktionsfähigkeit in Krebszellen detektieren (Dietzen & Davis 1993, Weinhouse 1976, Fantin et al. 2006, Moreno-Sánchez et al. 2007). Gestützt wird Warburgs Erklärung hingegen von Arbeiten, die Mutationen in der mitochondrialen DNA von Krebszellen (Carew & Huang 2002, Singh 2004, Taylor & Turnbull 2005, Petros et al. 2005, Zhou et al. 2007, Ishikawa et al. 2008) feststellen konnten, sowie von der Beobachtung, dass Leber-, Nieren und Kolonkarzinome reduzierte mitochondriale Aktivität aufweisen (Cuezva et al. 2002).

Bei der Suche nach den treibenden Mechanismen für die hohe glykolytische Aktivität von Tumorzellen spielt der Hypoxie-induzierte Faktor 1α (HIF- 1α) eine Schlüsselrolle (Porporato et al. 2011; vgl. Abb. 1). In gesunden Zellen ist dieser Faktor unter normoxischen Bedingungen hydroxyliert und wird über Proteosomen abgebaut

(Maxwell et al. 1999, Masson et al. 2001, Yu et al. 2001). Bei Sauerstoffmangel (Hypoxie) ist die Hydroxylierung des Faktors erschwert, wodurch dieser nicht inaktiviert wird und stattdessen die Expression einer Reihe von Genen induzieren kann, die der Anpassung der Zelle an den Sauerstoffmangel dienen. Zu den entsprechenden Genprodukten gehören etwa Glykolyse-Enzyme wie die Laktatdehydrogenase und Transporter des Glukosemetabolismus wie die MCTs (vgl. 2.3.2), das Erythropoetin (EPO) oder der Vascular Endothelial Growth Fractor (VEGF) (Kaelin & Ratcliffe 2008, Moreno-Sánchez 2007, Greer et al. 2012, Maxwell et al. 1997, Salceda & Caro 1997; Sutter et al. 2000, Semenza 2001, 2010, Airley & Mobasher 2007). Außerdem hemmt HIF-1 α über die Transaktivierung der PDH-Kinase 1 die Pyruvatdehydrogenase und reduziert die Pyruvataufnahme in den Zitratzyklus (s.o.; Kim et al. 2006, Papandreou et al. 2006). HIF-1 α ist in vielen Tumorentitäten überexprimiert (Zhong et al. 1999, Bos et al. 2001, Aebersold et al. 2001, Talks et al. 2000, Birner et al. 2001), auch unter normoxischen Bedingungen (Robey et al. 2005, King et al. 2006).

Zu den Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, deren Aktivierung bzw. Inaktivierung eine wichtige Rolle in der Karzinogenese zugeschrieben wird, gehören Myc, Akt, KRAS und p53 (vgl. Abb. 1). Das Onkogen Myc induziert die Expression von VEGF (Kim et al. 2007), der meisten glykolytischen Enzyme und von Glukosetransportern sowie der LDH-A, der für die Reduktion von Pyruvat zu Laktat maßgeblichen Isoform der Laktatdehydrogenase (Osthus et al. 2000, Ahuja et al. 2010, Shim et al. 1997, Gordan et al. 2007). Die Gruppe der Akt-Onkogene fördert die Expression der Glykolyse-Enzyme Hexokinase 2 und Phosphofruktokinase 1 und 2 sowie die Translokation von Glukosetransportern in die Zellmembran (Elstrom et al. 2004, Robey & Hay 2009, Deprez et al. 1997, Manning & Cantley 2007, Pastorino et al. 2005). Diese direkte Stimulierung der aeroben Glykolyse läuft unabhängig von HIF-1 α ab (Arsham et al. 2002, 2004), wird jedoch zusätzlich verstärkt durch eine Erhöhung der Aktivität ebendieses Faktors (Laughner et al. 2001). Eine Aktivierung von KRAS erhöhte in einem Tumorigenese-Modell von Ramanathan et al. (2005) den glykolytischen Umsatz, möglicherweise über eine Stabilisierung des Myc-Onkogens und eine Erhöhung des HIF-1 α -Spiegels (Kikuchi et al. 2009; Sears et al. 1999). Das Tumorsuppressorgen p53, welches häufig als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird, induziert das SCO2-Gen und verstärkt auf diesem Weg die oxidative Phosphorylierung (Koppenol et al. 2011, Matoba et al. 2006). Zudem wirkt es indirekt

als Gegenspieler zum HIF-1 α , indem es einige der von ihm induzierten Transkriptionen reprimiert (Blagosklonny et al. 1998). Folglich äußert sich eine Inaktivierung von p53 in einer erhöhten glykolytischen Aktivität (Vousden & Ryan 2009, Cheung & Vousden 2010).

Bis dato sind noch nicht alle Mechanismen des Warburg-Effekts vollständig verstanden. Jedoch sind heute verschiedene Vorteile bekannt, die sich aus der erhöhten glykolytischen Aktivität für die Tumorzelle ergeben.

In einem Milieu, dass sich aufgrund des stetigen Tumorwachstums und der defizienten Angiogenese durch ein geringes Sauerstoffangebot kennzeichnet (Gatenby & Gillies 2004, Brahimi-Horn et al. 2011, Ide et al. 2007, Neesse et al. 2011, Dang 2010), können Tumorzellen ihren hohen Energiebedarf am schnellsten mittels aerober Glykolyse stillen (Hsu & Sabatini 2008). Zudem setzt der gesteigerte Protonen-Export die umliegenden nicht-adaptierten Zellen einem erniedrigten pH aus, was letztlich zum Tod dieser Zellen führen kann (Busk et al. 2011, Cairns et al. 2011).

Des Weiteren liefert die Glykolyse wichtige Intermediate für die Biosynthese verschiedener Zellbausteine und trägt somit zur hohen Proliferationsrate von Tumorzellen bei. Zu den durch die aerobe Glykolyse vermehrt bereitgestellten Bausteinen zählen etwa Dihydroxyacetonphosphat für die Synthese von Triacylglyceriden und Phospholipiden, Pyruvat für die Alanin- und Malat-Synthese sowie über den Pentosephosphatweg Ribose für Nukleotide und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), ein wichtiges Coenzym für die Fettsäure-Synthese und die Regenerierung von Glutathion (Gatenby & Gillies 2004, DeBerardinis 2008, Tennant et al. 2010, Vander Heiden et al. 2009, Levine & Puzio-Kuter 2010). Nach Kroemer & Pouyssegur (2008) kann Pyruvat in Tumorzellen in einen modifizierten Zitratzyklus eintreten, an dessen Ende Acetyl-CoA aus dem Mitochondrium ins Zytosol exportiert und der Synthese von Cholesterol und Fettsäuren bereitgestellt wird (vgl. Abb. 1 & 2).

Im Einklang mit den obigen Aspekten konnte bereits in zahlreichen Arbeiten eine Korrelation zwischen hoher glykolytischer Aktivität, hohen Laktatkonzentrationen innerhalb des Tumorgewebes und hohen Malignitätsgraden gezeigt werden (Walenta et al. 1997, 2000, Walenta & Müller-Klieser 2004, Ziebart et al. 2011, Saraswathy et al. 2009, Brizel et al. 2001, Kennedy & Dewhirst 2010, Yokota et al. 2007), auch speziell für Ovarialkarzinome (Chen et al. 2010).

So konnte beispielsweise dargelegt werden, dass ein hoher Laktatgehalt in

Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs mit verminderter Radiosensitivität korreliert (Blatt et al. 2016, Sattler et al. 2010, Quennet et al. 2006), was sich durch die antioxidative Funktion des Laktats erklären lässt (Groussard et al. 2000, Sattler & Müller-Klieser 2009) (vgl. Abb. 2). Auch das oben erwähnte NADPH trägt zur erhöhten Strahlenresistenz bei, indem es die Regeneration von Gluthation ermöglicht, welches mittels Elektronenübertragung ROS unschädlich macht (Simons et al. 2007, DeBerardinis 2008).

Zudem wurde entdeckt, dass ins extrazelluläre Milieu abgegebenes Laktat die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen ebenso hemmt wie die Abgabe von proinflammatorischen Zytokinen aus dendritischen Zellen und zytotoxischen T-Zellen (Gottfried et al. 2006, Fischer et al. 2007, Dietl et al. 2010) und so als wesentlicher Faktor des „Immune Escape“ von Tumorzellen erachtet werden kann (Hirschhäuser et al. 2011, Kroemer & Pouyssegur 2008; vgl. Abb. 2). Die Korrelation zwischen Metastasierung und Laktatgehalt in Tumoren beruht auf einer Laktat-bedingten Erhöhung der Zellmotilität durch eine Stimulation der Hyaluron-Produktion in Fibroblasten (Hirschhäuser et al. 2011; Müller-Klieser 2000).

Schließlich wurde in verschiedenen Publikationen die Hypothese erläutert, dass Laktat in Tumoren auch als parakrines Signalmolekül dient (Koukourakis et al. 2006, Philp et al. 2005, Hsu & Sabatini 2008; vgl. Abb. 2). Passend hierzu lässt die Beobachtung, dass die Azidose der Angiogenese häufig vorausgeht, den Schluss zu, dass Laktat die HIF-1 α -Expression Hypoxie-unabhängig stimuliert: So konnte etwa nachgewiesen werden, dass ein erniedrigter pH-Wert in humanen Gliomzellen zu einer Induktion der VEGF-Expression führt und zwar auf einem vom Sauerstoffpartialdruck unabhängigen Weg (Fukumura et al. 2001).

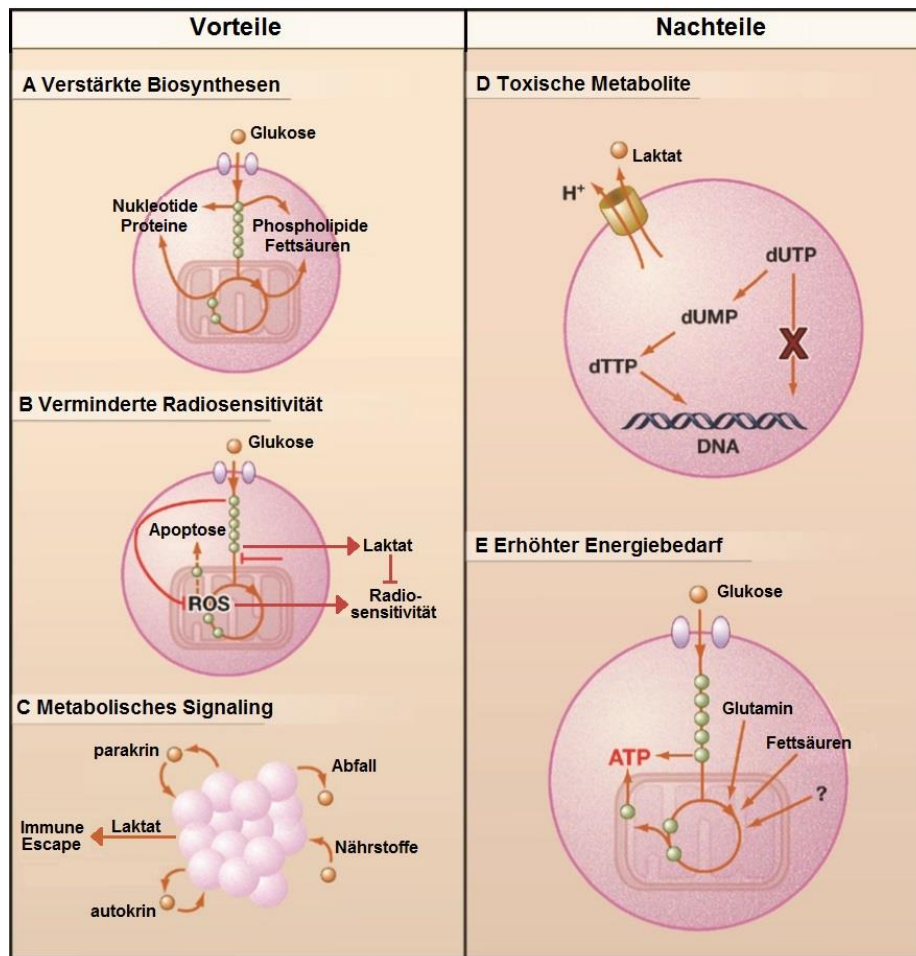


Abb. 2: Vor- und Nachteile der aeroben Glykolyse für Tumorzellen. Modifiziert nach Hsu & Sabatini (2008.)

2.3.2 Monocarboxylat-Transporter (MCT)

Dem Transport von Laktat über die Plasmamembran kommt in allen Säugetierzellen große Bedeutung zu. Glykolytische Zellen transportieren Laktat und die parallel dazu anfallenden Protonen aus der Zelle, um eine intrazelluläre Azidifizierung zu verhindern. Demgegenüber verwenden andere Zellen, insbesondere Herzmuskelzellen, Zellen des ZNS sowie solche in roten Muskelfasern, importiertes Laktat zur oxidativen Energiegewinnung oder aber zur Gluconeo- oder Lipogenese, wie es in Leber und Niere bzw. Fettgewebe der Fall ist (Halestrap & Price 1999, Halestrap & Meredith 2004, Halestrap & Wilson 2012, Juel & Halestrap 1999, Cairns et al. 2011). Eine Vielzahl maligner Tumoren weisen, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, ein glykolytisches Energieprofil auf. Folglich dominiert in Tumorzellen der Export von

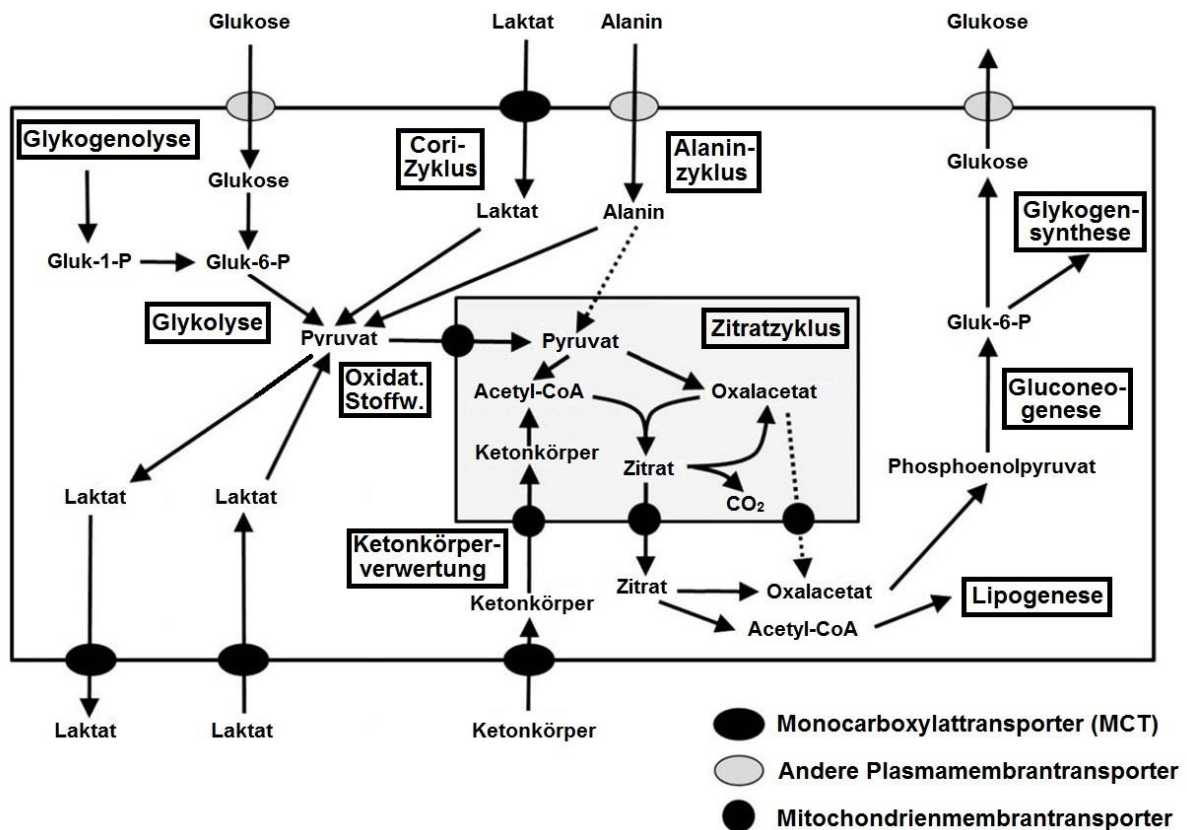


Abb. 3: Stoffwechselwege mit Beteiligung von MCTs. Modifiziert nach Halestrap & Wilson (2012).

Laktat und Protonen zur Aufrechterhaltung der Homöostase (Draoui & Feron 2011, Halestrap & Wilson 2012, Parks et al. 2013). Seit längerem ist in diesem Zusammenhang die zentrale Bedeutung der Monocarboxylattransporter (MCTs) bekannt (Bola et al. 2014; vgl. Abb. 3).

Die Monocarboxylattransporter (MCTs) gehören zur von der Human Genome Organization deklarierten SLC16-Genfamilie, welche nach aktuellem Stand aus vierzehn Mitgliedern besteht. Alle Isoformen transportieren ihre Substrate passiv. Je nach Konzentrationsgradienten und pH-Status können sie somit einen Influx oder Efflux ihrer Substrate vermitteln (Halestrap & Price 1999, Halestrap & Meredith 2004, Halestrap & Wilson 2012, Dimmer et al. 2000, Manning Fox et al. 2000, Meredith & Christian 2008).

Es handelt sich bei den MCTs um Transmembranproteine. Allen Isoformen ist gemein, dass sie zehn bis zwölf transmembrane α -Helices und eine lange zytosolische Schleife zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7 aufweisen und der N- und der C-Terminus intrazellulär liegen (Halestrap & Price 1999, Halestrap 2013). Variationen

der Aminosäuresequenzen im Vergleich zwischen den einzelnen Isoformen lassen sich vor allem Bereich des C-Terminus sowie der langen intrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7 finden. Demgegenüber ließen sich insbesondere in den Transmembrandomänen 1 und 5 in hoch konservierte Sequenzen finden, die also allen MCT-Isoformen gemein sind und damit als strukturelles Charakteristikum der MCT-Familie gelten (Halestrap 2013; vgl Abb. 4). Für die MCT 1-4 sind Ankerproteine beschrieben, ohne deren Hilfe keine korrekte Membran-Integration und Aktivität der Transporter erreicht wird, sodass die Transporter im Golgi-Apparat akkumulieren (Kirk et al. 2000, Wilson et al. 2005). Im Falle der Isoformen 1, 3 und 4 dient Basigin (CD147) als Chaperon, während MCT2 mit Embigin (gp-70) interagiert (Wilson et al. 2005, Ovens et al. 2010, Le Floch et al. 2011, Schneiderhan et al. 2009). Dieser Unterschied sowie die oben genannten Sequenz-Variationen werden als Erklärung für die Spezifität verschiedener MCT-Inhibitoren für einzelne Isoformen herangezogen (Halestrap & Wilson 2012).

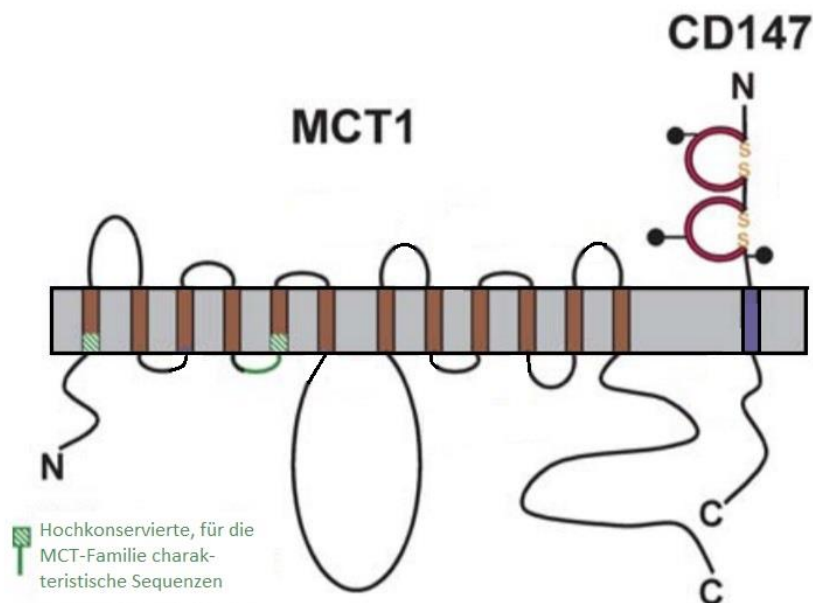


Abb. 4: Topologie der MCTs am Beispiel des MCT1 und seines Chaperons CD147. Modifiziert nach Halestrap (2013).

Neben den unten näher beschriebenen und für diese Arbeit in besonderem Maße bedeutenden MCT1 und MCT4 konnte bis dato nur für die Isoformen MCT2 und MCT3 ein protonengekoppelter Laktat-Transport nachgewiesen werden (Halestrap & Wilson 2012).

Die Expression von MCT2 ist weitestgehend beschränkt auf jene Zellpopulationen, die Laktat als oxidative Energiequelle oder für die Gluconeogenese importieren, also vor allem Neuronen, Leberparenchymzellen und Zellen der proximalen Nierentubuli. Dort dient der Transporter gemeinsam mit MCT1 dem Laktat-Import, für den es aufgrund seiner hohen Substrataffinität gut geeignet ist. Allerdings sprechen Northern-Blot-Untersuchungen und Expressionsanalysen für einen relativ geringen Stellenwert des MCT2 in humanen Zellen im Vergleich zu Zellen von Mäusen oder Ratten (Halestrap & Wilson 2012, Garcia et al. 1995, Jackson et al. 1997).

MCT3 wurde bis dato ausschließlich im retinalen Pigmentepithel und im Epithel der choroidalen Plexus detektiert. Untersuchungen zeigen, dass der MCT3 in diesen Geweben gemeinsam mit MCT1 den Export von Laktat aus der Retina vermittelt (Philp et al. 1998, Bergersen et al. 1999). Es konnte bereits gezeigt werden, dass während eines Laktat-Transportvorgangs des MCT1 auch Wasser mittransportiert wird. Auf diese Weise kann sowohl die pH- als auch die osmotische Homöostase der Retina reguliert werden (Halestrap & Wilson 2012).

Von den übrigen bis dato bekannten MCT-Isoformen sind vor allem MCT8 und MCT10 bereits eingehend charakterisiert worden. MCT8 ist im Gehirn am Import von Schilddrüsenhormonen beteiligt und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Gehirnentwicklung. MCT10 wird vornehmlich in Epithelien in Niere, Darm und Leber exprimiert und ist dort für die Reabsorption von Aminosäuren zuständig (Visser et al. 2011).

Für die Homöostase von Tumorzellen wurden hingegen MCT1 und MCT4 als entscheidend identifiziert. Studien legen eine verstärkte Expression dieser Isoformen in verschiedenen Tumorentitäten offen (Pinheiro et al. 2008, 2010, Chiche et al. 2011, Parks et al. 2011, Fang et al. 2006, Birsoy et al. 2013, Doherty et al. 2014, Polanski et al. 2014, Chen et al. 2010, Martinez-Outschoorn et al. 2012). Für MCT4 konnte gezeigt werden, dass diese Überexpression auf die Wirkung von HIF-1 α an HRE (hypoxia responsive elements) zurückzuführen ist (Ullah et al. 2006, Moreira et al. 2009, Thomas et al. 2007; vgl. 2.3.1). Allerdings existieren zwischen einzelnen

Tumorentitäten deutliche Unterschiede hinsichtlich ihres MCT-Expressionsmusters. Dabei geht eine starke Dolenz häufig mit einer hohen Expression an MCTs, insbesondere MCT4, einher (Pinheiro et al. 2010, Baek et al. 2014, Parks et al. 2011, Chiche et al. 2012, Witkiewicz et al. 2012).

Für MCT1 wurde eine Affinität zu Laktat von $K_m = 4,5$ mM bestimmt. Dieser Transporter ist ubiquitär verbreitet und vermittelt unter anderem den Import von Laktat in Zellen des Leberparenchyms und der proximalen Nierentubuli zur Gluconeogenese (Halestrap & Wilson 2012). Auch in Herz und roten Muskelfasern findet sich ein MCT1-abhängiger Laktat-Import, hier zum Zweck der oxidativen Energiegewinnung (Juel & Halestrap 1999, Bonen 2001). Schließlich ist MCT1 auch für den Transport von Laktat und Ketonkörpern über die Blut-Hirn-Schranke verantwortlich und ermöglicht dadurch dessen oxidative Verstoffwechslung in den Neuronen (Pierre & Pellerin 2005). Unter hypoxischen Bedingungen und konsekutiv glykolytisch geprägtem Metabolismus vermittelt MCT1 hingegen den Export von Laktat, beispielsweise in der Akutphase einer myokardialen Ischämie (Halestrap et al. 1997, Halestrap & Wilson 2012). Zellen, die auch bei ausreichender Oxygenierung ein dauerhaft glykolytisches Profil aufweisen, exprimieren teils ebenfalls vermehrt MCT1 zum Export von Laktat. Dazu zählen etwa Erythrozyten und T-Lymphozyten. Dies erklärt, warum MCT1-Inhibitoren nicht nur in der Krebsforschung, sondern auch in der Entwicklung immunsuppressiver Therapien Beachtung finden (Halestrap & Wilson 2012, Murray et al. 2005, Kroemer & Pouyssegur 2008; vgl. Kap. 2.3.3).

Die geringe Affinität von MCT4 zu Pyruvat ($K_m = 153$ mM) begünstigt in hochglykolytischen Zellen, dass der Export von Pyruvat auf ein Minimum reduziert wird. Dadurch steht das Pyruvat zur Regeneration von oxidiertem NAD^+ durch die LDH zur Verfügung und die Glykolyse kann aufrechterhalten werden (Halestrap & Wilson 2012). Entsprechend wird MCT4 vor allem in weißen Muskelfasern, Astrozyten und einigen Leukozyten-Reihen gefunden (Halestrap & Price 1999, Halestrap & Meredith 2004, Bonen 2001, Juel & Halestrap 1999). Die ebenfalls relativ geringe Affinität zu Laktat ($K_m = 28$ mM) mag zunächst als ungünstig für den Laktat-Export erscheinen. Sie lässt sich aber damit begründen, dass auf diese Weise bei intensiver körperlicher Aktivität ein intrazellulärer pH-Abfall eintritt, der zu Ermüdung führt und dadurch eine weitere Aufrechterhaltung der Aktivität mit folgender systemischer Azidose verhindert (Halestrap & Meredith 2004, Juel & Halestrap 1999).

Eine andere Hypothese von Sonveaux et al. (2008) beschreibt ein Symbiose-

Modell hinsichtlich des Laktattransports in Tumoren (vgl. Abb. 5). Die Autoren beziehen sich dabei auf den Umstand, dass Tumoren aus verschiedenen Kompartimenten bestehen, die sich bezüglich Energiemetabolismus miteinander grundlegend unterscheiden. So existieren schlechter vaskularisierte und somit schlechter oxygenierte Bereiche, in erster Linie im gefäßfernen Zentrum des Tumors, in denen der Warburg-Effekt in seiner vollen Ausprägung in Form eines hochglykolytischen Stoffwechsels zu beobachten ist und stärker vaskularisierte Bereiche, in denen die oxidative Energiegewinnung überwiegt. Sonveaux et al. postulierten, dass zwischen diesen Kompartimenten ein Laktat-Shuttle besteht, wodurch das in schlechter oxygenierten Arealen gebildete Laktat von den besser oxygenierten Zellen metabolisiert werden kann. Entscheidend für die Funktionsfähigkeit dieses Shuttles ist die unterschiedliche MCT-Expression: So wird den glykolytischen Zellen eine hohe MCT4-Expression und den oxidativen Zellen eine hohe MCT1-Expression zugeschrieben. Das Modell entspricht damit im Wesentlichen den Abläufen in Muskel und Gehirn, in denen rote Muskelfasern bzw. Neuronen das von weißen Muskelfasern bzw. Astrozyten abgegebene Laktat zur oxidativen Energiegewinnung importieren (Juel & Halestrap 1999, Bonen 2001, Pierre & Pellerin 2005, Brooks 2009, Bergersen 2007).

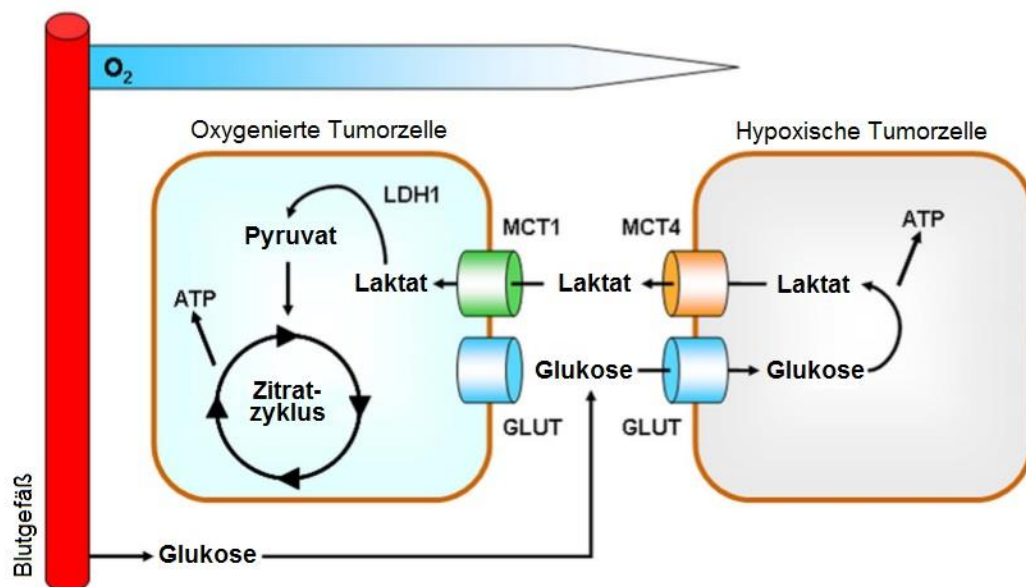


Abb. 5: Modell zur Symbiose zwischen Tumor-Kompartimenten.

Zellen im Zentrum des Tumors sind weiter von den Blutgefäßen entfernt, erhalten dadurch weniger Sauerstoff und müssen verstärkt Glykolyse betreiben. Das dabei anfallende Laktat wird über MCT4 abgegeben, von besser oxygenierten Zellen in der Tumorperipherie über MCT1 aufgenommen und oxidativ verstoffwechselt. Modifiziert nach Porporato et al. (2011).

Ogleich die Funktion der MCTs als Laktat- und Protonen-Transporter in Tumorzellen für die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse ist, erfüllen die MCTs auch andere Aufgaben und stehen im Zusammenhang mit den Pathomechanismen anderer Erkrankungen. Zu diesen gehört der belastungsabhängige Hyperinsulinismus, bei dem es bedingt durch Mutationen zu einer inadäquaten MCT1-Expression in den β -Zellen des endokrinen Pankreas kommt. Dies verhindert den Import von Laktat zur oxidativen Energiegewinnung, wodurch der ATP-Spiegel steigt und eine Glukose-unabhängige Insulinsekretion verursacht wird. Vermutlich liegt dieser Mechanismus auch dem chronischen Erschöpfungssyndrom (Fatigue) zugrunde (Otonkoski et al. 2007, Zhao et al. 2001, Halestrap & Wilson 2012, Hollingsworth et al. 2010). Zudem sind die MCTs nicht für Laktat spezifisch, sondern können auch Pyruvat oder Ketonkörper über Zellmembranen transportieren (Halestrap 2013). Entsprechend ihrer jeweiligen Substrataffinitäten und ihrer Verteilung im Organismus bestehen deshalb erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Funktionen der einzelnen Isoformen (Halestrap & Wilson 2012; s.o.).

2.3.3 Inhibitoren der Monocarboxylat-Transporter (MCT)

In Anbetracht der Bedeutung der Monocarboxylat-Transporter für die Homöostase von Tumorzellen (vgl. 2.3.2) weckt die Entwicklung von Substanzen zur gezielten Inhibition dieser Transporter zunehmend Interesse für die Behandlung von Tumoren. Vor allem in hochglykolytischen Tumorzellen lässt sich durch eine Inhibition der MCT eine Hemmung des Exports von Laktat und Protonen erzielen, was eine Reihe an kompensatorischen Mechanismen nach sich ziehen und langfristig eine metabolische Krise provozieren soll. Angesichts der bedeutenden Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorentitäten hinsichtlich des Expressionsmusters der einzelnen MCT-Isoformen erscheint die Entwicklung spezifischer Inhibitoren für die einzelnen Isoformen als besonders vielversprechend, da dies die Möglichkeiten zur Individualisierung der Krebstherapie erheblich steigern würde (Ovens et al. 2010, Halestrap & Meredith 2004).

Die bis dato am eingehendsten erforschten MCT-Hemmstoffe erfüllen diese Idealvorstellung jedoch nicht: Sowohl die α -Zyanozimtsäure (α -CHC) und ihre Derivate, als auch die Stilbene-Derivate wie DIDS (Di-Isothiocyano-stilbene-Disulfonat) sowie Phloretin, Quercetin und die organischen Quecksilberverbindungen wie p-cMBS (p-chlomercuribenzene-Sulfat) wurden zwar als MCT-Inhibitoren identifiziert, zeigen aber keine ausreichende Spezifität, um sie für klinische Studien an menschlichen Probanden heranzuziehen (Poole et al. 1990, Poole & Halestrap 1990, 1993, Halestrap 1975, 2013, Halestrap et al. 1990, Halestrap & Denton 1975, Halestrap & Meredith 2004, Meredith & Christian 2008, Wilson et al. 2005, 2009).

Der K_i -Wert von MCT4 für eine Inhibition durch α -CHC liegt bei 991 $\mu\text{mol/l}$ und damit deutlich höher als jener des MCT1 (Manning Fox et al. 2000). Der Inhibitor weist folglich eine höhere Affinität zu MCT1 als zu MCT4 auf. α -CHC induzierte in diversen Tumorzelllinien den Zelltod, verminderte deren Zellviabilität und Glukosemetabolismus und beeinflusste in in-vivo-Untersuchungen das Tumorzellvolumen und die Glukoseverteilung zwischen einzelnen Tumorregionen (Kim et al. 2012, Miranda-Gonçalves et al. 2013, 2016, Colen et al. 2011, Kennedy et al. 2013, Amorim et al. 2015, Morais-Santos et al. 2013, Busk et al. 2011, Hanson et al. 2015). Kumar et al. (2013) publizierten eine Minderung der Laktatproduktion sowie der Expression von HIF-1 α , GLUT1, GLUT3 und MCT4 in mit α -CHC behandelten Zellen eines kolorektalen Karzinoms und eine daraus folgende Sensitivierung für die Behandlung mit Cisplatin, was konsistent ist mit der von Amorim et al. (2015) beobachteten Verstärkung des zytotoxischen Effekts von 5-FU auf kolorektale Karzinomzellen durch α -CHC. Zudem konnte nach α -CHC-Applikation in vitro an Gliomzelllinien sowie in vivo an Mäusen mit Lewis-Lungenkarzinom eine erhöhte Radiosensitivität beobachtet werden (Colen et al. 2006, Sonveaux et al. 2008). Kennedy et al. (2013) detektierten jedoch eine vom Laktat-Metabolismus unabhängige zytotoxische Aktivität von α -CHC auf Brustkrebszellen, was die unzureichende Spezifität und das Vorhandensein von Off-target-Effekten unterstreicht. Dies steht somit im Widerspruch zu Arbeiten anderer Autoren unter der Prämisse, α -CHC sei ein spezifischer MCT-Hemmstoff (Sonveaux et al. 2008, Fang et al. 2006, Erlichman et al. 2008). Diese Annahme einer spezifischen Hemmung des MCT1 durch α -CHC lässt sich jedoch angesichts der um zwei Größenordnungen stärkeren Affinität des Hemmstoffs zum mitochondrialen Pyruvat-Carrier als zu MCT1 widerlegen (Halestrap & Denton 1974, Halestrap 1975, 1976, Carpenter & Halestrap 1994). Obgleich α -CHC

seit vielen Jahren als unspezifischer MCT-Hemmstoff in der Forschung Verwendung findet, erscheint sein therapeutisches Potenzial angesichts hoher benötigter Konzentrationen in in-vivo-Studien zum Erzielen signifikanter Antitumoreffekte beschränkt (Nelson et al. 2019). Ein vielversprechender Ansatz ist hier die Modifikation von α -CHC durch Ergänzung von Dialkyl/Diaryl- sowie Methoxygruppen: Für die daraus resultierenden α -CHC-Derivate konnte eine signifikante Erhöhung der inhibitorischen Potenz auf MCT1 und MCT4 detektiert werden (Jonnalagadda et al. 2019, Gurrupu et al. 2015). Durch weitere Modifikation in Form einer Ergänzung einer Silylethergruppe konnte anschließend eine weitere Verbesserung der inhibitorischen Eigenschaften des α -CHC-Derivats erreicht werden, die sich schließlich auch in Form einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums in in-vivo-Untersuchungen niederschlug (Nelson et al. 2019).

In der jüngeren Vergangenheit hat zudem AstraZeneca einzelne spezifische MCT-Inhibitoren entwickelt (Guan et al. 2019, Murray et al. 2005, Guile et al. 2006, Ekberg et al. 2007). Diese wurden ursprünglich als immunsuppressiv wirksame Hemmstoffe der T-Lymphozyten-Proliferation entwickelt - ein Zusammenhang, der auf der glykolytischen Präferenz aktivierter T-Lymphozyten beruht. Murray et al. (2005) konnten eine hohe Affinität zu MCT1 und MCT2, aber nicht zu MCT4, festhalten.

Ein Vertreter dieser ersten Generation spezifischer MCT-Inhibitoren, der kommerziell erhältliche spezifische MCT-Inhibitor AR-C155858, wird in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zum etablierten unspezifischen MCT-Hemmstoff α -CHC hinsichtlich seiner metabolischen Einwirkungen auf Ovarialkarzinomzelllinien untersucht. Er bindet nichtkompetitiv und hochaffin an MCT1 (K_i in Ratten-Erythrozyten, die ausschließlich MCT1 exprimierten = 2,3 nM), jedoch nicht an MCT4. Eine Affektierung von MCT2 erfolgt nur, wenn dieser Transporter mit Basigin und nicht wie üblich mit Embigin als Ankerprotein assoziiert ist (Ovens et al. 2010). Die für die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit bedeutendere Bindung an MCT1 erfolgt von der zytosolischen Seite an einer Domäne zwischen den Transmembranhelices 7 bis 10 und ist nicht reversibel (Ovens et al. 2010). Nancolas et al. (2015) präzisieren diese Bindungsstelle durch die Identifizierung einzelner Aminosäuren in der Sequenz von MCT1, die maßgeblich für die Spezifität des Hemmstoffs für MCT1 und MCT2 gegenüber MCT4 sind. AR-C155858 verringerte Laktattransport und Zellviabilität und induzierte den Zelltod in verschiedenen malignen Zelllinien (Hanson 2015 et al., Kong

et al. 2016, Lee et al. 2016). Zudem hemmte der Wirkstoff das Wachstum von Brustkrebszellen in einer 3D-Zellkultur ebenso wie die in-vivo-Tumorgenese von Magenkarzinomen (Andersen et al. 2016, Lee et al. 2016). Le Floch et al. (2011) detektierten nach Applikation von AR-C155858 eine Reduktion von Laktatexport, Glykolyse und Wachstum sowohl in vitro als auch in vivo im Mausmodell.

Das Interesse an AR-C155858 beschränkt sich jedoch nicht ausschließlich auf Krebsforschung und Immunsuppression, ebenso wird ihm Potenzial zur Behandlung von GHB-Überdosierungen (Gamma-Hydroxybuttersäure) zugeschrieben (Vijay et al. 2015). Beim GHB handelt es sich um eine endogene kurzkettige Fettsäure, die vor allem im Gehirn von Bedeutung ist und die zur Therapie von Narkolepsien eingesetzt wird (Maitre 1997, Wong et al. 2004). Bei Überdosierungen oder missbräuchlicher Anwendung als Rauschmittel hemmt AR-C155858 die renale Reabsorption mittels MCT1 und steigert dadurch die renale Clearance. Zudem beeinflusst es wahrscheinlich den MCT1-vermittelten Uptake des GHB ins Gehirn über die Blut-Hirn-Schranke (Vijay et al. 2015).

Im Rahmen der intensiven Bemühungen zur Erforschung spezifischer MCT-Inhibitoren befindet sich ein Mitglied der zweiten Hemmstoff-Generation, AZD-3965, bereits in klinischen Studien zur Behandlung von Tumoren mit überwiegender MCT1-Expression (Polański et al. 2014).

Da ein spezifischer MCT4-Inhibitor angesichts der starken Korrelation zwischen der Expression dieser Isoform und der Dolenz von Tumoren (vgl. 2.3.2) einen besonders aussichtsreichen Therapieansatz darstellen könnte, wurden in der jüngeren Vergangenheit verstärkt Anstrengungen zur Erforschung eines solchen unternommen (Gerlinger et al. 2012). Dem Pharmakonzern AstraZeneca gelang dabei die Entwicklung des spezifischen MCT4-Inhibitors AZ93, zu dem jedoch bis dato keine präklinischen Daten veröffentlicht wurden (Marchiq & Pouyssegur 2016). Darüber hinaus konnte kürzlich Bindarit, ein Indazol-Derivat, das bislang in erster Linie als anti-inflammatorischer Wirkstoff im Zusammenhang mit dem NF- κ B-Signalweg betrachtet wurde, als hochselektiver, nicht-kompetitiver MCT4-Hemmstoff identifiziert werden (Futagi et al. 2018).

Um die Wirkung eines derartigen Inhibitors imitieren und dadurch die duale Hemmung sowohl von MCT1 als auch von MCT4 simulieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit auch mit einer Zelllinie gearbeitet, bei der durch gentechnische

Modifikation eine Verminderung der MCT-4-Expression erzielt wurde (MCT4-Knockdown) (vgl. 3.2.1). Dass ein derartiges MCT-4-Silencing mittels RNA-Interferenz zu einer intrazellulären Laktatakkumulation und zu einer Verminderung des Zellwachstums sowie in vivo zu einer Verminderung des Tumorwachstums führen kann, konnten Todenhöfer et al. (2018) am Beispiel von Urothelkarzinomzellen belegen. Auch Cheng et al. (2018) detektierten nach erfolgtem MCT-4-Knockdown eine Inhibition der Zellproliferation sowie eine erhöhte Apoptose-Aktivität in Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

3.1.1.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalie	Hersteller	Ort
Aceton	Roth	Karlsruhe
AR-C155858	Adooq	Irvine, USA
CASYton	Roche	Mannheim
CASYclean	Roche	Mannheim
DAPI	Dianova	Hamburg
DMSO	Sigma-Aldrich	Steinheim
EDTA	AppliChem	Darmstadt
Glukose	Merck	Darmstadt
Hämolytischer-Systemlösung	Dr. Müller	Freital
Isopropanol	Theo Seulberger	Karlsruhe
Luciferase	Roche	Karlsruhe
Milchsäure	Sigma-Aldrich	Steinheim
Nagellack (durchsichtig)	Rossmann	Burgwedel
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth	Karlsruhe
OXA (NatriumOXA)	Sigma-Aldrich	Steinheim
PBS	AppliChem	Darmstadt
Puromycin	PAA	Cölbe
Salzsäure, 37%	Sigma-Aldrich	Steinheim
Trypsin/EDTA	PAN™ Biotech	Aidenbach
XF24 Calibrant Solution	Seahorse Bioscience	Billerica, USA

3.1.1.2 Medien und Zusätze

Produkt	Hersteller	Best.-Nr.	Ort
D5030	Sigma-Aldrich	D5030	Steinheim
FCS GOLD	PAA	A15-151	Cölbe
HEPES	Roth	6763	Karlsruhe
Natriumpyruvat	AppliChem	A1530	Darmstadt
RPMI 1640	Thermo Fisher	11875-093	Schwerte

3.1.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Best.-Nr.	Ort
rabbit anti-human MCT-1	Santa Cruz	sc-50324	Heidelberg
rabbit anti-human MCT-4	Santa Cruz	sc-50329	Heidelberg
donkey anti rabbit	Dianova	711-486-152	Hamburg

3.1.1.4 Kommerzielle Kits

Produkt	Hersteller	Best.-Nr.	Ort
DAPI	Dianova	SCR-38448	Hamburg
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza	LT07-218	Köln
PapPen	Linaris	H-4000	Dossenheim
XTT – Zellzytotoxizitätstest	Sigma-Aldrich	TOX2	Steinheim

3.1.2 Geräte

Produkt	Hersteller	Ort
Absauganlage Vacusafe	Integra Biosciences	Fernwald
Abzug	Waldner	Wangen
Autoklav, 5050	ELV Tuttnauer	New York, USA
Brutschrank HERA Cell 150	Thermo Fisher	Schwerte
CASY® TT	Schärfe	Reutlingen
Digitalwaage	Sartorius	Göttingen
Feinwaage	Mettler-Toledo	Gießen
Fluoreszenzmikroskop BZ-8000	Keyence	Neu-Isenburg
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand	Wertheim
Mehrfachdispenser HandyStep®	Brand	Wertheim
Heizplatte H22	Gerhardt	Bonn
Inkubator HERAcell 240	Thermo Fisher	Schwerte
Kühl-/Gefrierschränke		
3 °C	Privileg	Stuttgart
-20 °C	Privileg	Stuttgart
-80 °C	Thermo Fisher	Schwerte
Magnetrührer IKAMAG® RH	IKA®-Werke	Staufen
Lichtmikroskope		
BH-2	Olympus	Hamburg
Axiophot	Zeiss	Göttingen
Multiplate Reader DTX 880	Beckmann Coulter	Krefeld
pH-Meter	Schott	Mainz
Extracellular Flux Analyzer XF 24/3	Seahorse Bioscience	Billerica, USA

Sterilbank CA/REV 3	Clean Air Engineering	Palatine, USA
Stickstoffanlage	Air Liquide	Düsseldorf
Super GL2-Analysator	Dr. Müller Gerätebau	Freital
Vortexer	Bender und Hobein	Bruchsal
Wärmebad Aqualine AL25	LAUDA	Königshofen
Wasserbad	GFL GmbH	Burgwedel
Zentrifuge Heraeus sepatech	Thermo Fisher	Schwerte

3.1.3 Materialien

Produkt	Hersteller	Ort
Deckgläser	Thermo Fisher	Schwerte
Einfrierbehälter	Thermo Fisher	Schwerte
Färbeschiffchen	VWR	Darmstadt
Federpinzette	VWR	Darmstadt
Feuchte Kammer	VWR	Darmstadt
Filterpapier	Sartorius Stedim Biotech	Aubagne, Frankreich
flexiPERM® micro 12	Sarstedt	Nümbrecht
Glasgefäße	Schott	Mainz
Kryo-Röhrchen 1,8 ml	Nalgene	Rochester, USA
Küvetten	VWR	Darmstadt
Mikroplatten	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Multiwellplatten	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Objektträger	Menzel Gläser	Braunschweig
Parafilm	Roth	Karlsruhe
Petrischalen	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg
Pipetten	VWR	Darmstadt
Reaktionsgefäße 0,5 - 2,0 ml	Eppendorf	Hamburg
Reaktionsgefäße 15 - 50 ml	Greiner BioOne	Frickenhausen
Sterilfilter 0,22 µm	Roth	Karlsruhe
Untersuchungshandschuhe	VWR	Darmstadt
Wischtücher	VWR	Darmstadt
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Zellkulturplatten XF24 V7PS	Seahorse Bioscience	Billerica, USA

3.1.4 Software

Software	Hersteller	Ort
Citavi 5.2.0.8	Swiss Academic	Wädenswil, Schweiz

BZ Observation
Photoshop CS5
Microsoft Office 2016
ImageJ 2
Multimode Analysis Software
Origin 8G

Keyence
Adobe Systems
Microsoft
National Institutes of Health
Beckman Coulter
OriginLab Corporation

Neu-Isenburg
München
München
Bethesda, USA
Krefeld
Northampton, USA

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zelllinien

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden insgesamt vier verschiedene humane Ovarialkarzinomzelllinien verwendet. Dabei handelte es sich zum einen um die aus Ovarialkarzinomen gewonnenen Zelllinien IGROV-1 und OC316. Zum anderen wurde eine gentechnisch veränderte OC316-Zelllinie (shMCT-4), bei der die Expression des MCT4-Gens herunterreguliert wurde, sowie deren Kontrollzellen (OC316 shRNA), verwendet.

Die Zelllinie IGROV-1 wurde 1982 aus einem unbehandelten Adenokarzinom (FIGO III) des Ovars einer 47-jährigen Patientin etabliert (Bénard et al. 1985). Sie wurde für die vorliegende Arbeit von Herrn Dr. Indraccolo (Insituto Oncologico Veneto IRCCS, Padua, Italien) zur Nutzung bereitgestellt.

Aus Aszites eines mit Zytostatika anbehandelten ovarialen Adenokarzinoms (FIGO IV) einer 60-jährigen Patientin wurde 1994 die Zelllinie OC316 konstituiert (Alama et al. 1996). Auch diese Zelllinie wurde von Herrn Dr. Indraccolo zur Verfügung gestellt.

Die gentechnisch veränderte Tumorzelllinie OC316 shMCT-4 wurde von Herrn Dr. Indraccolo ausgehend von OC316 erzeugt. Zu diesem Zweck wurde die für MCT-4-shRNA codierende DNA-Sequenz in das Genom von Lentiviren kloniert. Der Begriff shRNA steht dabei für sogenannte "small-hairpin-RNA", die eine Haarnadelstruktur ausbilden und auf diese Weise die Expression eines Zielgens, in diesem Falle die des MCT-4-Gens, stilllegen kann. Der erzeugte Lentivektor wurde durch Transduktion in die OC316-Zellen überführt. Die zur Kontrolle mitgeführten OC316 shRNA wurden durch Transfektion mit dem gleichen lentiviralen Vektor, jedoch ohne die DNA-Sequenz für shMCT-4, erzeugt.

Die Zelllinien wurden auf Trockeneis nach Mainz transportiert und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Alle verwendeten Zelllinien wiesen ein adhärentes Wachstum in Zellkulturgefäßen auf und werden in Tabelle 3 hinsichtlich Herkunft und Histologie charakterisiert.

Tabelle 3: Charakterisierung der vier verwendeten Zelllinien

Angeführt sind Lokalisation und histologische Einteilung gemäß den Vorgaben der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO).

Zelllinie	Herkunft	Histologie
IGROV-1	Ovariales Adenokarzinom, Primärtumor	FIGO III
OC316	Ovariales Adenokarzinom, Aszites	FIGO IV
OC316 shMCT-4	Ovariales Adenokarzinom, Aszites	N/A
OC316 shRNA	Ovariales Adenokarzinom, Aszites	N/A

3.2.2 Kultivieren und Passagieren

Sämtliche Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Sterilbank in einem Labor der Schutzstufe 1, wobei ausschließlich sterile Materialien, Lösungen und Medien eingesetzt wurden. Sowohl die Flüssig- als auch die Feststoffabfälle wurden gesammelt und vor ihrer Entsorgung autoklaviert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturgefäßen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² in einem Brutschrank, der eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ gewährleistete.

Alle vier verwendeten Zelllinien wurden in 5 ml RPMI 1640 (2,0 g/l Glukose und 2 mM L-Glutamin) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS GOLD), 10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure) und 1 mM Natriumpyruvat versetzt kultiviert. Das Medium für die modifizierten Zelllinien OC316 shMCT-4 und OC316 shRNA wurde zusätzlich mit 0,5 µg/ml Puromycin zur Selektion versetzt, um eine Selektion der transfizierten Zellen zu erzielen (vgl. 5.1.1). Die verwendeten Medien und Zusätze wurden bei 2°C aufbewahrt und vor dem Gebrauch im Steine- oder Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Alle vier bis fünf Tage wurden Zellen aus ihrem Kulturgefäß extrahiert und in unterschiedlichen Konzentrationen in mehrere andere Kulturgefäße überführt (Passagieren). Zwischen zwei solcher Passagen wurde das verbrauchte Medium durch neues ersetzt, um die ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten.

Zum Zweck des Passagierens wurde das Nährmedium aus dem Kulturgefäß verworfen und der Zellrasen mit 2 ml 20 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) gelöst in 1x PBS pH 7,4 (phosphate buffered saline) gewaschen sowie anschließend

mithilfe von 1 ml Trypsin/EDTA vom Kulturgefäß abgelöst. Das EDTA hatte hier die Aufgabe, Kalzium- und Magnesium-Ionen zu komplexieren, die eine wichtige Rolle für die Adhäsion der Zellen spielen. Trypsin wiederum ist in der Lage, extrazelluläre Proteine zu spalten und trug so ebenfalls zur Lösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche bei. Nach dreiminütiger Inkubation im Brutschrank wurden 4 ml Nährmedium ins Kulturgefäß zugegeben, um die Reaktion abzustoppen. Es erfolgte daraufhin eine visuelle Erfolgskontrolle des Ablösevorgangs mithilfe eines Lichtmikroskops. Anschließend konnte die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellzahl bestimmt werden (vgl. 3.2.3). Aus letzterer ließen sich schließlich entsprechende Volumina zur Aussaat der Zellen in neue Kulturgefäße mit frischem Medium errechnen.

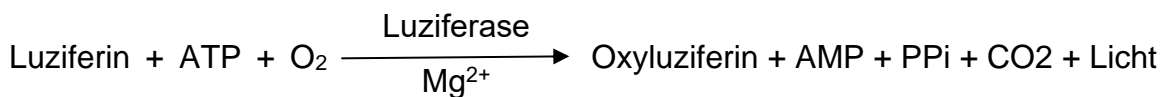
3.2.3 Automatisierte Zellzählung

Zur automatisierten Zellzählung wurde das Zellzählgerät CASY® TT verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst wie unter 3.2.2 beschrieben vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 100 µl dieser Zellsuspension in 10 ml Isotonlösung (Casy®ton) suspendiert und vom Gerät durch eine dünne Kapillare geleitet. Das dabei durchlaufene Spannungsfeld erfuhr bei jedem Zelldurchtritt eine Erhöhung des Widerstands, die vom Gerät detektiert wird. Der Messbereich des Gerätes lässt sich manuell so eingrenzen, dass Zellartefakte und tote Zellen erfasst und ausgeschlossen werden. Auf diese Weise kann die Zahl lebender Zellen /ml direkt ablesen werden.

3.2.4 Mykoplasmentest

Die äußerst kleinen intra- und extrazellulär vorkommenden Mykoplasmen stellen aufgrund ihrer geringen Größe und des Umstands, dass eine Kontamination lichtmikroskopisch nicht festgestellt werden kann, ein besonderes Risiko für Zellkulturversuche dar, da sie den Stoffwechsel und das Wachstum der Zellen in erheblichem Ausmaß beeinflussen (Uphoff & Drexler 2013). Aus diesem Grund wurden in regelmäßigen Abständen Kontrollen mithilfe des kommerziellen Kits

Mycoplasma Detection Assay MycoAlert® durchgeführt. Dieser Test bedient sich der Aktivität Mykoplasmen-spezifischer Enzyme zum Nachweis von deren Anwesenheit in einer flüssigen Probe. Um zunächst den ATP-Gehalt der Probe zu ermitteln, wird der Probe ein Reagens zugesetzt, das das Enzym Luziferase sowie Luziferin enthält. Das Enzym katalysiert die Umsetzung von Luziferin unter ATP-Verbrauch zu Oxyluziferin, wobei es zu einer Lichtemission kommt, die nach fünf Minuten Inkubation luminometrisch gemessen werden kann und proportional zum ATP-Gehalt der Probe ist. Die folgende Formel beschreibt diese Biolumineszenz-Reaktion:



Im Anschluss wird das MycoAlert® Substrat zugesetzt, welches nur von Mykoplasmen in weitere ATP-Moleküle umgesetzt werden kann. Nach erneuter zehnmütiger Inkubation wurde erneut der ATP-Gehalt indirekt luminometrisch bestimmt und der Quotient aus den beiden Ergebnissen vor und nach Zugabe des Substrats gebildet. Ein Quotient > 1 spricht dabei für eine Kontamination mit Mykoplasmen, während eine solche bei einem Quotienten < 1 praktisch ausgeschlossen werden kann.

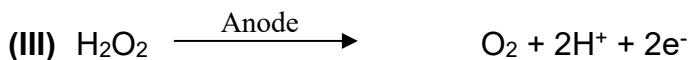
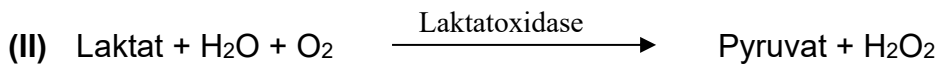
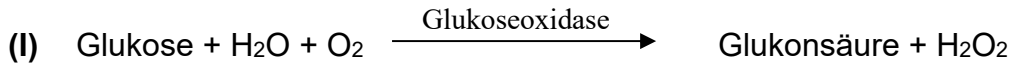
3.3 Bestimmung metabolischer Parameter

3.3.1 Super-GL2-Analysator

Beim Super-GL2-Analysator der Firma Dr. Müller Gerätebau handelt es sich um ein Gerät zur enzymatisch amperometrischen Bestimmung von Glukose und Laktat in Probenmaterial.

Dabei durchläuft die flüssige Probe eine Kapillare, die von einer semipermeablen Membran mit einer Sperrschicht umgeben ist, die den Analyten von umgebenden Platinelektroden trennt. Die Sperrschicht trägt immobilisierte Enzyme, die Glukoseoxidase und Laktatoxidase, welche in Anwesenheit von Wasser (H₂O) und Sauerstoff (O₂) eine Redoxreaktion mit ihrem jeweiligen Substrat katalysieren. Diese besteht aus der Oxidation von Glukose bzw. Laktat zu Glukonsäure (Reaktion I) bzw. Pyruvat (Reaktion II) sowie der Reduktion von Sauerstoff (O₂) zu Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Das entstandene H₂O₂ diffundiert zur Anode und wird dort erneut zu Sauerstoff

oxidiert (Reaktion III). Der dabei fließende elektrische Strom ist proportional zum Glukose- bzw. Laktatgehalt in der Probe, weshalb seine Messung die Bestimmung letzterer ermöglicht. Im Folgenden sind die beschriebenen Reaktionsschritte I-III dargestellt:



Zur Gewährleistung kontinuierlich korrekter Messwerte führte das Gerät vor jeder Messung eine automatische Kalibrierung durch. Im Anschluss an die Messung wurden die Ergebnisse für Glukose sowie Laktat jeweils in mM angegeben.

Für die Bestimmung der Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten der adhärent wachsenden Tumorzellen wurden diese auf 12-Well-Platten mit einer Wachstumsfläche von 3,9 cm² pro Well ausgesät. Dabei wurden die Anfangszellzahlen so gewählt, dass bis zur Messung nach 72 Stunden eine Konfluenz von 80-90 % zustande kam. Die Kulturplatten wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator gelagert.

Für jede Kombination aus Zelllinie, Hemmstoff, Konzentration des Hemmstoffes sowie Messzeitpunkt wurden Dreifachbestimmungen deklariert. 72 Stunden nach der Aussaat wurde das alte Medium durch frisches ersetzt. Für die betreffenden Wells wurde dabei Medium verwendet, dem der jeweilige Hemmstoff in entsprechender Menge nach Lösung in DMSO hinzugefügt worden war. Unmittelbar nach diesem Medienwechsel wurden aus den Überständen die Glukose- und Laktatkonzentrationen bestimmt und dieser Zeitpunkt als 0 h definiert. Die Messung wurde 2, 4 und 24 Stunden später wiederholt. Um aus dem zeitlichen Verlauf der gemessenen Glukose- und Laktatkonzentrationen die Glukoseverbrauchs- bzw. Laktatproduktionsraten pro Zelle berechnen zu können, musste zusätzlich in jedem Well die Zellzahl bestimmt werden. Die Bestimmung der Zellzahl nach Abnahme der Überstände wurde wiederum nach dem unter 3.2.3 beschriebenen Prinzip durchgeführt.

Tab. 4: Ablauf der Stoffwechsellmessungen mit dem Super-GL2-Analysator

Zeitpunkt	Ablauf
-72 h	Aussaat der Zellen auf 12-Well-Platten, anschließend Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂
0 h	<ol style="list-style-type: none">1. Ersetzen des verbrauchten Kulturmediums durch frisches Medium mit entsprechender Konzentration an Inhibitor, anschließend erneute Inkubation2. Entnahme der Überstände der 0h-Zellkammern3. Messung der Zellzahl nach dem in 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Vorgehen4. Messung der Glukose- und Laktatkonzentrationen aus den Überständen am Super-GL2-Analysator
2 h	<ol style="list-style-type: none">1. Entnahme der Überstände der 2h-Zellkammern2. Messung der Zellzahl nach dem in 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Vorgehen3. Messung der Glukose- und Laktatkonzentrationen aus den Überständen am Super-GL2-Analysator
4 h	<ol style="list-style-type: none">1. Entnahme der Überstände der 4h-Zellkammern2. Messung der Zellzahl nach dem in 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Vorgehen3. Messung der Glukose- und Laktatkonzentrationen aus den Überständen am Super-GL2-Analysator
24 h	<ol style="list-style-type: none">1. Entnahme der Überstände der 24h-Zellkammern2. Messung der Zellzahl nach dem in 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Vorgehen3. Messung der Glukose- und Laktatkonzentrationen aus den Überständen am Super-GL2-Analysator

3.3.2 Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3

Der Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 der Firma Seahorse Bioscience ist ein Gerät zur simultanen und repetitiven Messung verschiedener Stoffwechsellparameter in Medienüberständen adhärent wachsender Zellen mit der Möglichkeit mehrfacher automatisierter Injektionen von Hemmstoffen in definierten Konzentrationen zu definierten Zeitpunkten. Für die vorliegende Arbeit wurde das Gerät zur Bestimmung von Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate; [OCR] = pmol/min) sowie der Azidifizierungsrate (Extracellular Acidification Rate; [ECAR] = mpH/min) in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Hemmstoffs genutzt. Dabei wurden jeweils die gleichen Hemmstoffkonzentrationen untersucht, die auch bei den Messungen am GL-2-Analysator Verwendung gefunden hatten (vgl. 3.3.1).

Das Messprinzip basiert auf verschiedenen, für den jeweiligen Analyten (O₂ bzw. H⁺) spezifischen Fluorophoren, deren Fluoreszenz-Signale in Anwesenheit des

entsprechenden Analyten eine Abschwächung erfahren. Eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Medienüberstand der Messkammer spiegelt dabei die Reduktion von Sauerstoff (O_2) zu Wasser (H_2O) im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette) wider. Der Anstieg des H^+ -Gehalts in der Messkammer lässt sich durch die Dissoziation von Milchsäure zu Laktat und H^+ erklären und ist dementsprechend ein Indikator für die glykolytische Aktivität der sich in der Messkammer befindenden Zellen.

Auf diese Weise lassen sich anhand beobachteter Änderungen der OCR sowie der ECAR, infolge der Zugabe von Hemmstoffen, Rückschlüsse ziehen auf das Ausmaß der Beeinflussung des Energiestoffwechsels der Zellen. Diese Überlegung wird in Abbildung 6 graphisch verdeutlicht.

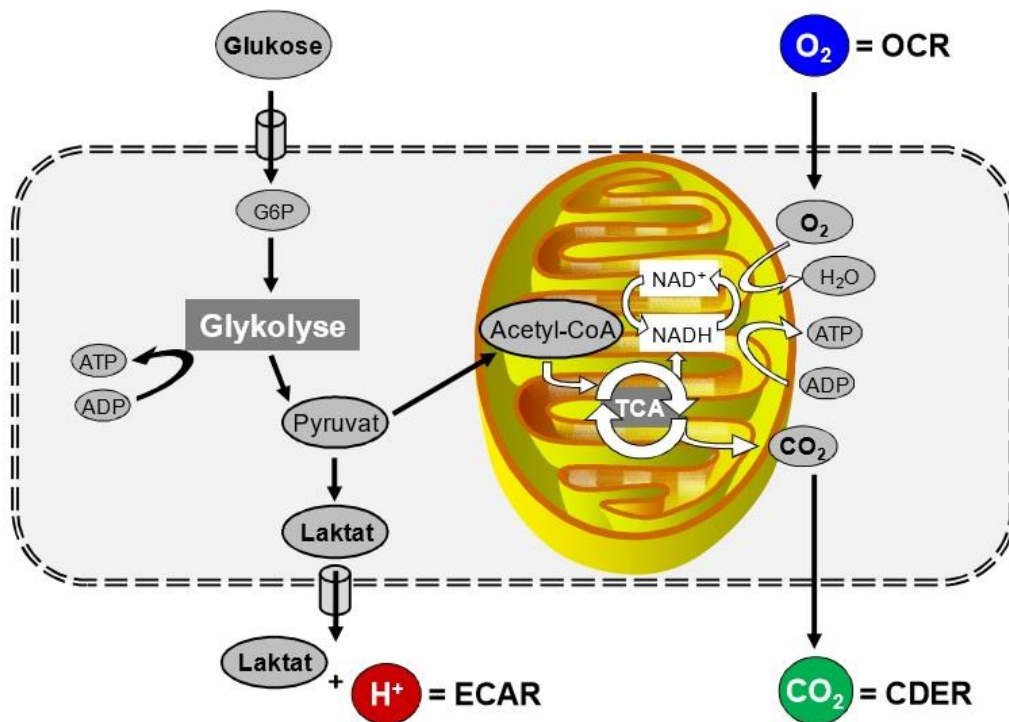


Abb. 6: Analyte des Extracellular Flux Analyzers XF 24/3 im Kontext des Zellstoffwechsels

Die Abbildung zeigt schematisch vereinfacht den Energiestoffwechsel einer Zelle. Die oxidative Phosphorylierung der Zelle verbraucht O_2 (blau) aus dem Medium, wodurch der O_2 -Gehalt in der Messkammer sinkt. Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration wird vom Gerät als OCR ausgegeben. H^+ (rot) wird im Symport mit Laktat aus der Zelle geschleust, welches ein Rückschlüsse auf die glykolytische Aktivität erlaubt. Das abgegebene H^+ erzeugt im extrazellulären Milieu eine Veränderung des pH-Wertes, welche vom Gerät detektiert und als ECAR ausgegeben wird (Abbildung aus Fabian 2013).

Der Versuchsaufbau besteht im Wesentlichen aus der XF-Sensorenplatte (Seahorse Bioscience) und der Zellkulturplatte XF24 V7PS (Seahorse Bioscience) mit 24 konisch zulaufenden Wells mit einer Wachstumsfläche von jeweils 34 mm². Die Sensorenplatte ist mit fluoreszierenden Biosensoren ausgestattet, die für den jeweiligen Analyten (hier O₂ bzw. H⁺) spezifisch sind. Die Fluoreszenzsignale der Sensoren werden über einen Lichtwellenleiter aus Fiberglas an einen Photodetektor weitergeleitet und daraufhin computerbasiert ausgewertet.

Zu Beginn jeder Messung werden Sensor- und Kulturplatte vom Gerät aufeinander gesteckt, sodass eine Messkammer mit einem Volumen von 7 µl entsteht. Innerhalb dieser Kammer detektiert das Gerät dann die Konzentrationsänderungen der Analyte. Die folgende Abbildung 7 illustriert den Versuchsaufbau:

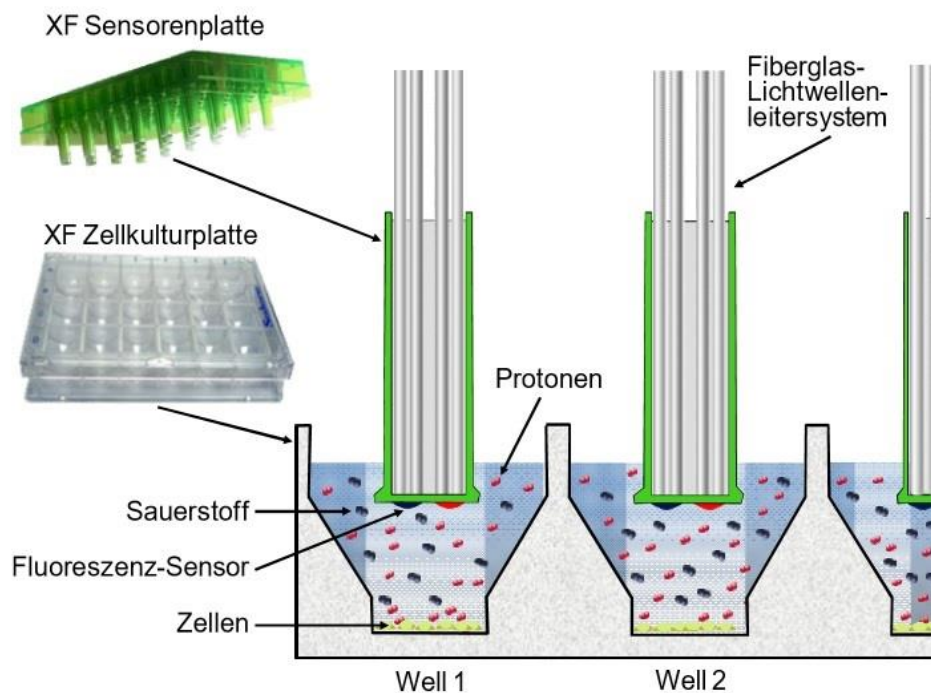


Abb. 7: Versuchsaufbau des Extracellular Flux Analyzers XF 24/3

Die Abbildung zeigt Sensorenplatte (grün) und Kulturplatte (grau). Die Kammern der Kulturplatte weisen am Boden adhärenente Zellen (gelb) sowie Medium mit darin gelöstem Sauerstoff (blau) und Protonen (rot) auf. Die Anwesenheit der Analyte wird durch analyt-spezifische Biosensoren der Sensorplatte detektiert. Die in den Sensoren enthaltenen Fluorophoren wandeln die Information über die Analytenkonzentration in ein Lichtsignal um, welches über ein Leitungssystem aus Fiberglas zu einem Photodetektor geleitet wird und daraufhin computerbasiert ausgewertet werden kann (Abbildung aus Fabian 2013).

Ein wichtiger Aspekt der Funktionsweise des Extracellular Flux Analyzers XF 24/3 besteht in der Möglichkeit der automatisierten Injektion von bis zu vier Substanzen zu definierten Zeitpunkten.

Die Sensorplatte verfügt über je vier Ports für jedes Well, in die der zu untersuchende Hemmstoff zugegeben werden kann. Mithilfe der zugehörigen Software lässt sich definieren, zu welchen Zeitpunkten die einzelnen Ports durch das Gerät in die Wells injiziert werden sollen. Dabei können für jeden Port unterschiedliche Konzentrationen und Volumina gewählt werden. Diese wurden jeweils so gewählt, dass nach Injektion und Vermischung mit dem schon im Well befindlichen Medium die zu untersuchende Hemmstoffkonzentration erreicht wurde. Die Ports der Kontrollzellen wurden mit Medium befüllt.

24 Stunden vor Versuchsdurchführung wurden die zu untersuchenden Zellen in einer Zahl von 60.000/Well in 450 µl Nährmedium (s. 3.2.2) ausgesät und die Kulturplatte anschließend bei 37°C und 5 % CO₂ gelagert. In der Zeit zwischen Aussaat und Versuchsdurchführung wurde außerdem die Sensorplatte in XF24 Calibrant Solution (Seahorse Bioscience) hydriert und im Inkubator bei 37°C ohne CO₂-Begasung gelagert.

Eine Stunde vor Versuchsbeginn erfolgte der Austausch des Nährmediums in den Wells gegen ungepuffertes Minimalmedium D5030, dem vor Verwendung 1 g/l Glukose hinzugefügt wurde. Das gleiche Minimalmedium wurde auch zur Herstellung der benötigten Hemmstoffverdünnungen verwendet, welche anschließend zu den entsprechenden Injektionsports der Sensorplatte zugegeben wurden. Beide Platten wurden anschließend bis zum Versuchsbeginn ohne CO₂-Begasung inkubiert.

Nach Positionierung der Kultur- und der Sensorplatte im Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 führte dieser eine automatische Kalibrierung der Biosensoren durch. Darauf folgte eine zehnminütige Äquilibrationsphase zum Zweck der Minimierung von Temperaturschwankungen innerhalb des Versuchsaufbaus. Daran anschließend erfolgte die automatische Zusammenführung von Kultur- und Sensorplatte, woraufhin die mithilfe der zugehörigen Software definierten Messzyklen begonnen. Vor jedem Messzyklus (2 min) erfolgte ein Misch- (5 min) sowie ein Wartevorgang (1 min), um möglichst exakte Ergebnisse zu gewährleisten. Dieser Zyklus wiederholte sich sieben Mal bis zur Injektion des Port 1 und anschließend nach jeder Injektion weitere sieben Mal, was bei drei verwendeten Ports eine Gesamtdauer des Versuchs von ca. vier

Stunden ergab. Auf die Nutzung des vierten Ports wurde verzichtet, da auch bei den Messungen am GL-2-Analysator aus praktischen Gründen nur mit drei Hemmstoffkonzentrationen gearbeitet worden war.

Aus den Steigungen der durch die Biosensoren detektierten O₂- und H⁺-Konzentrationen errechnete der Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 die OCR bzw. ECAR, deren Verlauf das Gerät in Echtzeit graphisch darstellte.

Tab. 5: Ablauf der Stoffwechselfmessungen mit dem Extracellular Flux Analyzer XF 24/3.

Zeitpunkt	Ablauf
-24 h	1. Aussaat der Zellen auf Zellkulturplatte XF24 V7PS in Normalmedium, anschl. Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂ 2. Hydrierung der Sensorplatte in Kalibrierlösung, Inkubation bei 37°C und 0% CO ₂
-1 h	1. Austausch des Normalmediums gegen ungepuffertes Minimalmedium D5030 (+ 1g/l Glukose), anschließend Inkubation bei 37°C und 0% CO ₂ 2. Befüllung der Injektionsports der Sensorplatte mit den entsprechenden Inhibitor-Verdünnungen, anschließend Inkubation bei 37°C und 0% CO ₂
0 h	1. Positionierung der Kultur- sowie der Sensorplatte im Gerät 2. Start der automatisierten Vorgänge (vgl. Tab. 6)

Tab. 6: Ablauf der automatisierten Vorgänge im Extracellular Flux Analyzer XF 24/3

Wdh.	Dauer	Vorgang
1x		Kalibrierung der Biosensoren
1x	10 min	Äquilibrierung
7x	5 min	Mischvorgang
	1 min	Wartephase
	2 min	Messvorgang
1x		Injektion von Port 1
7x	5 min	Mischvorgang
	1 min	Wartephase
	2 min	Messvorgang
1x		Injektion von Port 2
7x	5 min	Mischvorgang
	1 min	Wartephase
	2 min	Messvorgang
1x		Injektion von Port 3
7x	5 min	Mischvorgang
	1 min	Wartephase
	2 min	Messvorgang

3.4 Toxizitätsbestimmung mittels XTT-Assay

Beim XTT-Assay handelt es sich um ein Verfahren zur Messung der Zellviabilität mithilfe der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität. Die den Zellen zugesetzte Lösung enthält dabei XTT, ein Molekül mit einem Tetrazolring. Dieser wird von den mitochondrialen Dehydrogenasen der Zellen zu orangefarbenen Formazankristallen reduziert. Da diese Reduktion nur in vitalen Zellen vonstattengehen kann, lässt ihr Ausmaß Rückschlüsse auf die Zellviabilität (Proliferationsrate und metabolische Aktivität) zu. Der durch die Reduktion erzeugte Farbumschlag lässt sich mithilfe des Multiplate Reader DTX 880 (Beckmann Coulter) messen.

Für die Untersuchung der Zellviabilität wurden Dreifachbestimmungen in 96-well-Platten in jeweils 200 µl Nährmedium zu einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen/Well ausgesät und für 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte der Austausch des Vollmediums gegen 200 µl ungepuffertes Minimalmedium D5030 pro Well, dem vor Verwendung 1 g/l Glukose sowie die entsprechenden Mengen an Hemmstoff hinzugefügt wurden. Hierbei wurden die gleichen Hemmstoffkonzentrationen wie in den vorherigen Stoffwechselfmessungen verwendet, um zu untersuchen, wie sich ebenjene Konzentrationen auf die Viabilität der Zellen auswirken. Da die Hemmstoffe in Pulverform vorlagen und zur Lösung im Medium zunächst in DMSO gelöst werden mussten, wurde für jedes mit Hemmstoff versehene Well ein Kontrollwell mitgeführt, dem die äquivalente Menge an DMSO zugegeben wurde. Auf diese Weise ließ sich durch eine Subtraktion der Werte der DMSO-Wells von jenen der Wells mit Hemmstoff und DMSO der Einfluss des DMSO auf die Zellviabilität herausrechnen.

Anschließend wurden in jedes Well 40 µl des nach Herstellerangaben in PBS gelösten XTT zugegeben. Daraufhin erfolgte die erste Messung der Zellviabilität im Multiplate Reader DTX 880 bei 450 nm und 655 nm. Die Extinktion bei 450 nm spiegelte dabei die Eigenabsorption der Platte wider und wurde vom bei 655 nm gemessenen Wert abgezogen. Die Messung wurde im weiteren Verlauf nach zwei, vier und sechs Stunden wiederholt, in den Zwischenzeiten wurden die Kulturplatten jeweils bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Tab. 7: Ablauf der Viabilitätsbestimmung mittels XTT-Assay.

Zeitpunkt	Ablauf
-72 h	Aussaat der Zellen auf 96-Well-Platten, anschl. Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂
0 h	1. Austausch des Normalmediums gegen Minimalmedium D5030 (+ 1 g/l Glukose) mit den jeweiligen Inhibitor-Konzentrationen 2. Zugabe von 40 µl des in PBS gelösten XTT 3. Messung der Zellviabilität im Multiplate Reader DTX 880 4. Erneute Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂
2 h	1. Messung der Zellviabilität im Multiplate Reader DTX 880 2. Erneute Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂
4 h	1. Messung der Zellviabilität im Multiplate Reader DTX 880 2. Erneute Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂
6 h	Messung der Zellviabilität im Multiplate Reader DTX 880

3.5 Immunhistologische Darstellung der MCT1- und MCT4-Expression

Um die Unterschiede der untersuchten Zelllinien hinsichtlich der Expression von MCT-1 sowie MCT-4 bestimmen zu können, wurden immunhistologische Fluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dabei wurde mit einem Primärantikörper, der spezifisch an das zu detektierende Protein bindet, sowie einem Sekundärantikörper, der mit einem Fluorochrom versehen ist und wiederum spezifisch an den Primärantikörper bindet, gearbeitet. Das Fluorochrom des so erzeugten Antigen-Antikörper-Komplexes absorbiert Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittiert einen Teil des absorbierten Lichts wieder in Form langwelliger Strahlung. Letztere kann schließlich mithilfe eines geeigneten Fluoreszenzmikroskops sowie eines geeigneten Bildbearbeitungsprogramms quantifiziert werden. Abb. 8 veranschaulicht das der Untersuchung zugrundeliegende Prinzip.

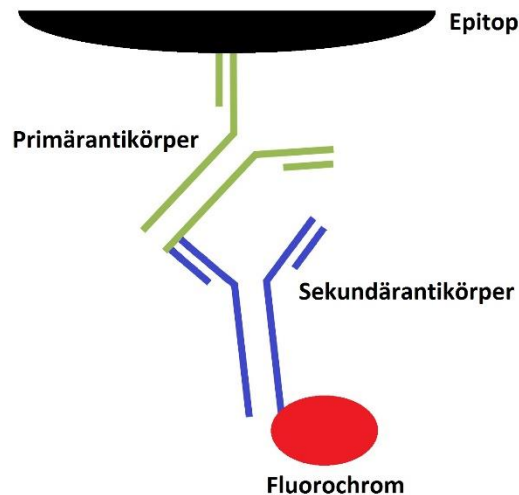


Abb. 8: Schematische Darstellung des Prinzips der Immunfluoreszenz.

Der Primärantikörper (grün) bindet spezifisch an das Epitop des nachzuweisenden Moleküls. Der Sekundärantikörper (blau) bindet ebenso spezifisch an den Primärantikörper und trägt ein Fluorochrom.

Zur Visualisierung von MCT-1 und MCT-4 wurden zunächst gläserne Objektträger mit jeweils einem flexiPERM micro 12 Silikoneinsatz versehen, welcher der Kompartimentierung des Objektträgers in zwölf Zellkammern diente. Anschließend erfolgte die Aussaat von Zellen in einer Zellzahl von 6×10^4 Zellen/Zellkammer in je 200 μ l Medium. Für jede untersuchte Zelllinie wurde dabei ein eigener Objektträger vorbereitet, sodass jeweils fünf Zellkammern zur Detektion des MCT-1 und des MCT-4 zur Verfügung standen sowie zwei Zellkammern für Negativkontrollen, bei denen im weiteren Verlauf auf die Zugabe des Primärantikörpers verzichtet wurde um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers im Gewebe berücksichtigen zu können. Die Objektträger wurden anschließend 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Medium abgegossen und die Silikoneinsätze entfernt. Die Objektträger wurden zunächst mit 1 x PBS gewaschen, anschließend für fünf Minuten mit Aceton fixiert und schließlich unter dem Abzug für 20 Minuten luftgetrocknet. Im Anschluss erfolgte die Umrandung der Zellspots auf den Objektträgern mit einem hydrophoben PapPen. Nach Trocknen der Umrandung wurden die Objektträger weitere zwei Minuten in 1 x PBS gelagert, welches anschließend durch vorsichtiges Klopfen vom Objektträger entfernt wurde.

Die anschließenden Schritte wurden, um ein Austrocknen der Zellspots zu vermeiden, in einer wasserdampfgesättigten Kammer durchgeführt. Zunächst wurden

unspezifische Bindungsstellen der Zellspots mit je 60 µl 2%-igem donkey Serum in 1 x PBS für 45 Minuten geblockt. Anschließend wurde das Serum durch vorsichtiges Klopfen entfernt und es erfolgte die Zugabe und einstündige Inkubation von je 60 µl des Primärantikörpers (in einer Verdünnung von 1:100) in 1%-igem donkey Serum/PBS. Die Negativkontrollen erhielten erneut je 60 µl 2%-iges donkey Serum/PBS. Für den Zeitraum der Inkubation wurden die Proben auf einem Schüttler platziert, um eine gleichmäßige Inkubation zu gewährleisten.

Nach Inkubation wurden die nicht gebundenen Primärantikörper durch dreimaliges Waschen für je drei Minuten in 1 x PBS vom Objektträger entfernt. Während jeder Waschphase wurden die Objektträger erneut auf einem Schüttler platziert und anschließend das PBS durch vorsichtiges Klopfen entfernt. Im Anschluss erfolgte mittels Pipettierens die Zugabe des Sekundärantikörpers (1:800) sowie seine einstündige Inkubation, welche aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluorochrome in Dunkelheit durchgeführt wurde. Auch nach dieser Inkubation wurden die Objektträger drei Mal je drei Minuten lang mit 1 x PBS auf dem Schüttler gewaschen, um überschüssige Sekundärantikörper zu entfernen. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde jedem Zellspot ein Tropfen des DNA-interkalierenden und fluoreszierenden ImmunoSelect Antifading Mounting Medium 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) zugesetzt. Daraufhin erfolgte die Abdeckung der Zellspots mit Deckgläschen unter weitestmöglicher Vermeidung der Erzeugung von Luftblasen. Die Objektträger wurden anschließend über Nacht im Kühlschrank gelagert und schließlich mit Nagellack versiegelt, um eine Austrocknung zu verhindern.

Die Detektion der Färbung wurde letztlich mithilfe des Fluoreszenzmikroskops BZ-8000 (Keyence) durchgeführt, wobei das Programm "BZ Observation Application" genutzt wurde. Die Messung erfolgte unter weitestmöglicher Abdunklung der Umgebung. Für jeden Objektträger wurde diejenige Belichtungszeit ermittelt, bei der im Bereich der Zellspots der Negativkontrollen kein Signal des Sekundärantikörpers mehr zu sehen war. Die Aufnahme erfolgte letztlich mithilfe des Objektivs PlanApo 20x. Für jeden Zellspot erfolgten anschließend bei 800-facher Vergrößerung insgesamt fünf Aufnahmen in verschiedenen, zufällig gewählten Regionen des Spots. Die gemachten Aufnahmen bestanden dabei aus zwei Komponenten, dem zu detektierenden Proteinsignal sowie dem DAPI-Signal.

Im Rahmen der computergestützten Auswertung mittels des Programms

imageJ erfolgte zunächst eine Binärisierung des DAPI-Signals zur Vermeidung möglicher Intensitätsunterschiede, wodurch ein Schwarz-Weiß-Bild entstand. Mithilfe des Plugin-Befehls "Batch-Values-0-and-255" ließ sich die Pixelzahl der nun schwarz dargestellten Zellkerne ermitteln, welche als Schwarzwert (S) festgehalten wurde. Das Proteinsignal wurde hingegen dem Plugin-Befehl "Batch-RGB-Measure" unterzogen, welcher einen Grünwert (G) lieferte. Die Verrechnung (G/S) mit dem Schwarzwert ermöglichte auf diese Weise eine Normalisierung des Grünwerts auf die Anzahl der im Bildausschnitt eingefangenen Zellen (vgl. Abb. 9).

Die Intensitäten aller zusammengehörigen Zellspots wurden abschließend gemittelt.

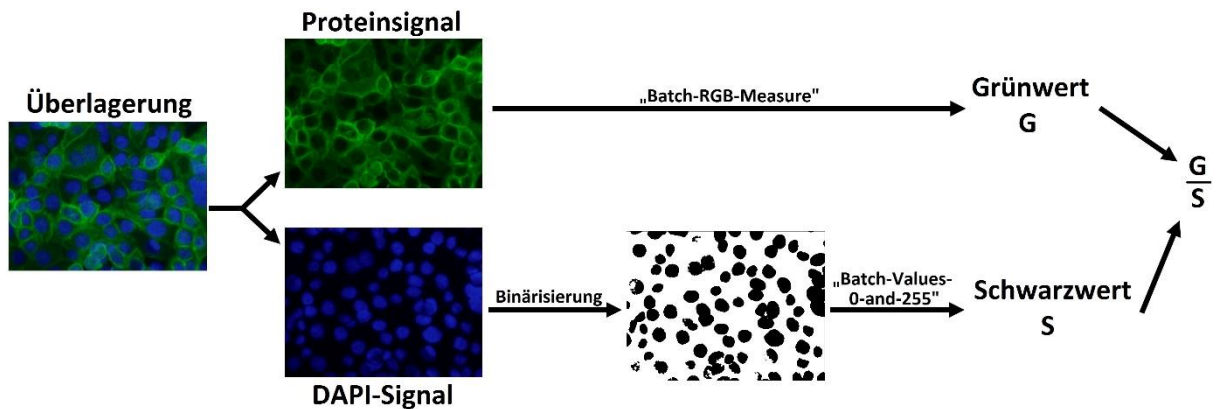


Abb. 9: Computerbasierte Auswertung der Immunfärbungen mittels imageJ.

Das DAPI-Signal wird binärisiert und im dadurch erhaltenen Schwarz-Weiß-Bild die Pixelzahl ermittelt, welche einen Schwarzwert (S) liefert. Der Plugin-Befehl "Batch-RGB-Measure" bestimmt den Grünwert (G) des Proteinsignals. Die Verrechnung beider Werte (G/S) ergibt die normalisierte Intensität des Proteinsignals. (Nach Binz 2012).

Tab. 8: Ablauf der Immunfluoreszenzanalyse.

Zeitpunkt	Ablauf
-24 h	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kompartimentierung der Objektträger mittels flexiPERM micro 12 Silikoneinsätzen 2. Aussaat der Zellen in die Kompartimente, anschl. Inkubation bei 37°C und 5% CO₂
0 h	<ol style="list-style-type: none"> 1. Abgießen des Mediums 2. Entfernen der Silikoneinsätze 3. Waschen der Objektträger mit 1x PBS 4. Fixierung mit Aceton 5. Lufttrocknung unter dem Abzug 6. Umrandung der Zellspots mittels PapPen, anschl. trocknen lassen 7. Lagerung der Objektträger in 1x PBS (2 min), anschl. Entfernen des PBS durch vorsichtiges Abklopfen 8. Blocken der Zellspots mit 2% donkey Serum in 1x PBS, anschl. 45 min Inkubation 9. Entfernen des PBS durch vorsichtiges Abklopfen 10. Zugabe des Primärantikörpers (1:100) in 1% donkey Serum in 1x PBS, anschl. 1h Inkubation 11. Waschen der Objektträger in 1x PBS (3 x 3 min) auf dem Schüttler 12. Zugabe des Sekundärantikörpers (1:800), anschl. 1h Inkubation in Dunkelheit 13. Waschen der Objektträger in 1x PBS (3 x 3 min) auf dem Schüttler 14. Zugabe eines Tropfens DAPI zu jedem Zellspot 15. Abdeckung der Zellspots mit Deckgläschen, anschl. Lagerung im Kühlschrank
max. 24 h	<ol style="list-style-type: none"> 1. Versiegelung der Objektträger mit Nagellack 2. Ermittlung der Belichtungszeit für jeden Objektträger mithilfe der Negativkontrollen 3. Erstellung von fünf Aufnahmen je Zellspot (800-x Vergrößerung) mithilfe des Fluoreszenzmikroskops BZ-8000 und des Programms BZ Observation Application 4. Computergestützte Auswertung der Aufnahmen (vgl. Abb. 9)

3.6 Statistische Auswertung

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Stoffwechselversuchen am Super-GL2-Analysator sowie den Toxizitätsmessungen mittels XTT-Assay wurden jeweils Dreifachbestimmungen in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt (N=3, n=3). Aus den erhaltenen Werten wurden die Mittelwerte (MW) und die Standardabweichungen (SD) berechnet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Versuche am Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 wurden aus den Daten dreier unabhängiger Versuche mit Siebenfachbestimmung errechnet (N=3, n=7). Bei der Immunfluoreszenzanalyse wurde eine Fünffachbestimmung vorgenommen, wobei in jedem der fünf korrespondierenden Zellspots jeweils fünf unterschiedliche Bereiche gemessen wurden. Folglich wurden Mittelwerte und Standardabweichungen hier aus einer Stichprobenanzahl $n = 25$ berechnet.

Für die Überprüfung signifikanter Unterschiede wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt und Signifikanzen mit einem $p < 0,05$ entsprechend kenntlich gemacht.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von α -CHC und AR-C155858 auf ausgewählte metabolische Parameter

Für die vier in der vorliegenden Arbeit behandelten Zelllinien wurden verschiedene metabolische Parameter und deren Änderung unter dem Einfluss von MCT-Inhibitoren untersucht. Im Folgenden werden zunächst die mithilfe von Metabolitmessungen am Super-GL2-Analysator bestimmten Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsrate (LPR bzw. GVR) dargestellt und im Anschluss die mit dem Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 ermittelten Azidifizierungs- und Sauerstoffverbrauchsrate. Die beiden nativen Zelllinien IGROV-1 und OC316 wurden dabei auf beide verwendeten Inhibitoren, α -CHC sowie AR-C155858, hin untersucht. Für die gentechnisch veränderten OC316-Zelllinien shMCT1 und shRNA wurden die gleichen Konzentrationen des spezifischen MCT1-Inhibitors AR-C155858 untersucht, mit denen auch bei den nativen OC316-Zellen gearbeitet worden war. Zur besseren Übersichtlichkeit werden nachfolgend die über 24 Stunden gemittelten Umsatzrate analysiert. Auf die Darstellung der Messwerte und Umsatzrate der 2- bzw. 4-Stunden-Messungen wird angesichts geringer Konzentrations- und Zellzahlunterschiede zu den 0-Stunden-Messungen verzichtet. Die Gleichmäßigkeit der Umsatzrate im zeitlichen Verlauf wird in Kapitel 5.1.1 erläutert und graphisch dargestellt (vgl. Abb. 38).

4.1.1 Laktatproduktionsraten

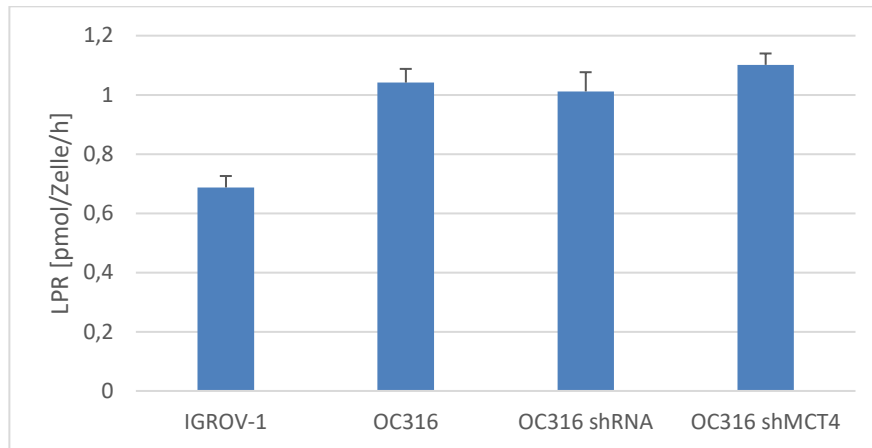


Abb. 10: Basale Laktatproduktionsraten (LPR) der verwendeten Zelllinien. Dargestellt sind für IGROV-1 und OC316 jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus sechs unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=6, n=3), da die Werte der jeweiligen unbehandelten Zellen aus den Versuchen mit α -CHC und AR-C155858 zusammengefasst wurden. Für OC316 shRNA und OC316 shMCT4 sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung dargestellt (N=3, n=3).

Die im Rahmen der Messungen mit dem Inhibitor α -CHC mitgeführten unbehandelten IGROV-1-Zellen wiesen eine über 24 Stunden gemittelte Laktatproduktionsrate von $0,68 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h auf (vgl. Abb. 10). Unter dem Einfluss von 10 ($0,58 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h), 20 ($0,48 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h) und 30 mM α -CHC ($0,35 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Laktatproduktionsrate im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 11). Im Vergleich zwischen unbehandelten und den mit 30 mM α -CHC behandelten Zellen betrug diese Reduktion $48,32 \pm 4,93$ % (vgl. Abb. 14).

Für die unbehandelten OC316-Zellen ergab sich eine Laktatproduktionsrate von $1,06 \pm 0,05$ pmol/Zelle/h (vgl. Abb. 10). Unter dem Einfluss von 10 ($0,86 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h), 20 ($0,66 \pm 0,05$ pmol/Zelle/h) und 30 mM α -CHC ($0,53 \pm 0,05$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Laktatproduktionsrate im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 11). Im Vergleich zwischen unbehandelten und den mit 30 mM α -CHC behandelten Zellen betrug diese Reduktion $49,93 \pm 5,67$ % (vgl. Abb. 14).

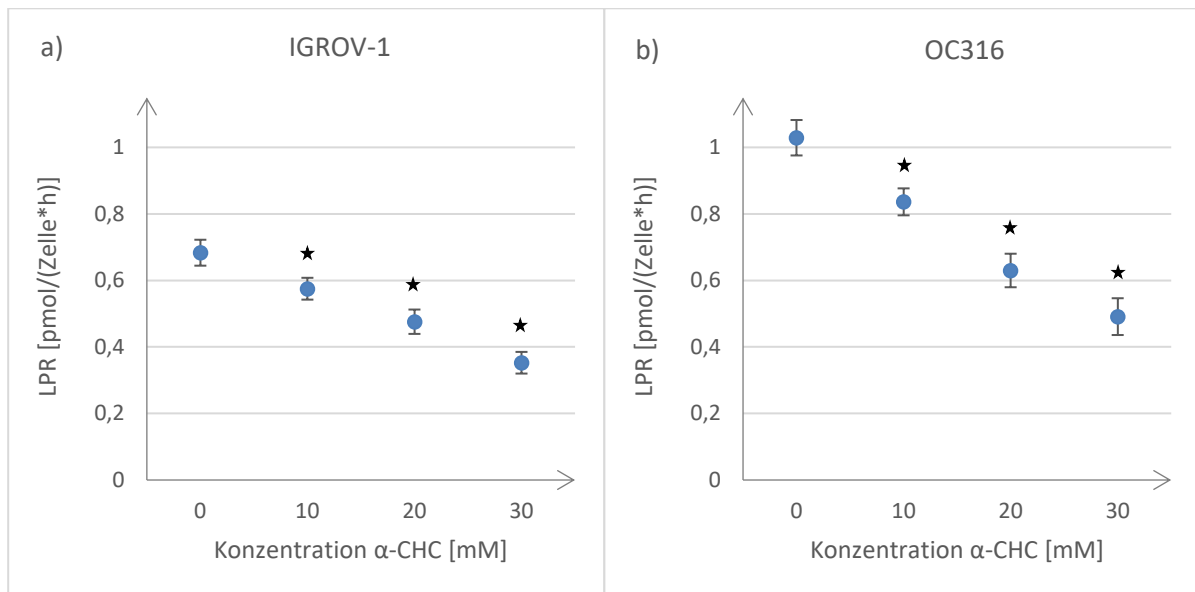


Abb. 11: Laktatproduktionsraten (LPR) von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an α -CHC. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3). a) IGROV-1. b) OC316

Die im Rahmen der Messungen mit dem Inhibitor AR-C155858 mitgeführten unbehandelten IGROV-1-Zellen wiesen eine über 24 Stunden gemittelte Laktatproduktionsrate von $0,69 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h auf (vgl. Abb. 10). Unter dem Einfluss von 10 ($0,59 \pm 0,05$ pmol/Zelle/h), 50 ($0,49 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h) und 300 nM AR-C155858 ($0,32 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Laktatproduktionsraten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 12). Im Vergleich zwischen unbehandelten Zellen und den mit 300 nM AR-C155858 behandelten Zellen betrug diese Reduktion $53,51 \pm 5,46$ % (vgl. Abb. 14).

Für die unbehandelten OC316-Zellen ergab sich eine Laktatproduktionsrate von $1,02 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h (vgl. Abb. 10). Unter dem Einfluss von 10 ($0,84 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h) und 100 nM ($0,66 \pm 0,05$ pmol/Zelle/h) sowie 1 μ M AR-C155858 ($0,53 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Laktatproduktionsraten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 12). Im Vergleich zwischen unbehandelten Zellen und den mit 1 μ M AR-C155858 behandelten Zellen betrug diese Reduktion $47,99 \pm 4,34$ % (vgl. Abb. 14).

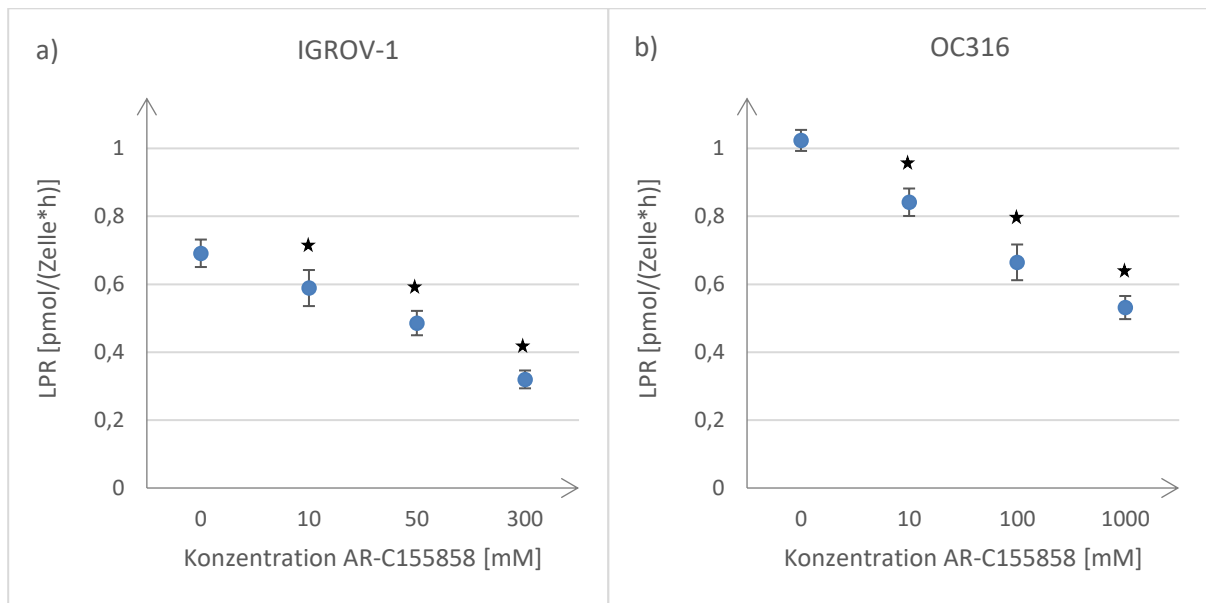


Abb. 12: Laktatproduktionsraten von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3). a) IGROV-1. b) OC316.

Die gentechnisch modifizierten Kontrollzellen der OC316-Linie shRNA wiesen unbehandelt eine über 24 Stunden gemittelte Laktatproduktionsrate von $1,01 \pm 0,06$ pmol/Zelle/h auf und damit in dieser Hinsicht keinen signifikanten Unterschied zu den nativen OC316-Zellen auf (vgl. Abb. 10). Unter dem Einfluss von 10 ($0,83 \pm 0,05$ pmol/Zelle/h) und 100 nM ($0,68 \pm 0,06$ pmol/Zelle/h) sowie 1 μ M AR-C155858 ($0,52 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Laktatproduktionsraten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 13). Im Vergleich zwischen unbehandelten Zellen und den mit 1 μ M AR-C155858 behandelten Zellen betrug diese Reduktion $50,16 \pm 5,87$ % (vgl. Abb. 14).

Die einem gentechnischen MCT4-Knockout unterzogenen OC316-Zellen shMCT4 wiesen unbehandelt eine über 24 Stunden gemittelte Laktatproduktionsrate von $1,10 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h auf (vgl. Abb. 10). Unter dem Einfluss von 10 ($0,85 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h) und 100 nM ($0,59 \pm 0,06$ pmol/Zelle/h) sowie 1 μ M AR-C155858 ($0,37 \pm 0,05$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Laktatproduktionsraten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 13). Im Vergleich zwischen unbehandelten Zellen und den mit 1 μ M AR-C155858 behandelten Zellen betrug diese Reduktion $66,8 \pm 3,95$ % (vgl. Abb. 14).

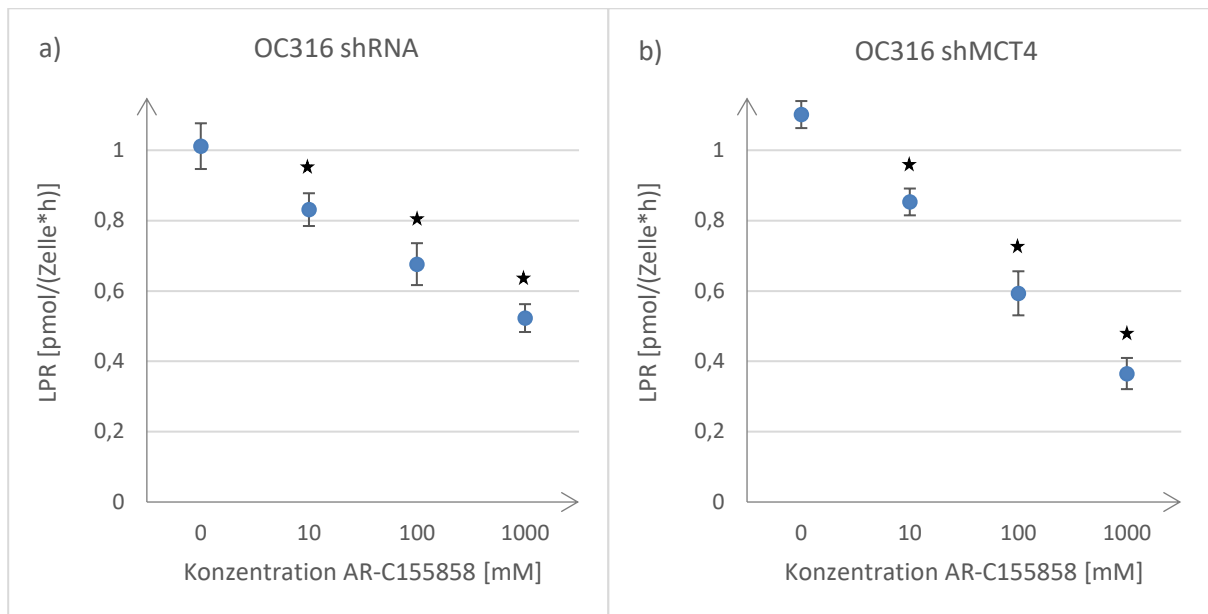


Abb. 13: Laktatproduktionsraten von OC316 shRNA und OC316 shMCT4 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung. (N=3, n=3). a) OC316 shRNA. b) OC316 shMCT4.

In der zusammenfassenden Betrachtung der Änderungen der Laktatproduktionsraten ergibt sich demnach folgendes Bild (vgl. Abb. 14): 30 mM α -CHC verringerten die Laktatproduktionsrate von IGROV-1- und OC316-Zellen um einen äquivalenten, also nicht signifikant unterschiedlichen, prozentualen Anteil im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Zellen ($48,32 \pm 4,93$ bzw. $49,93 \pm 5,67$ %). Diese prozentualen Reduktionen waren jedoch nicht nur zueinander äquivalent, sondern auch zu den Reduktionen durch 300 nM (IGROV-1) bzw. 1 μ M (OC316) AR-C155858 ($53,51 \pm 5,46$ % bzw. $47,99 \pm 4,34$). Auch die Reduktionen der Laktatproduktionsrate von nativen OC316-Zellen und shRNA-Zellen durch 1 μ M AR-C155858 wiesen keinen signifikanten Unterschied auf ($47,99 \pm 4,34$ % bzw. $50,16 \pm 5,87$ %). Abbildung 14 illustriert in Form von Säulen die Äquivalenz dieser Änderungen. Einen signifikanten Unterschied lieferte jedoch der Vergleich von shRNA- und shMCT4-Zellen: Bei letzteren löste 1 μ M AR-C155858 mit $-66,85 \pm 3,95$ % eine signifikant stärkere Reduktion der Laktatproduktionsrate aus als bei shRNA ($p < 0,05$) (vgl. Abb. 14).

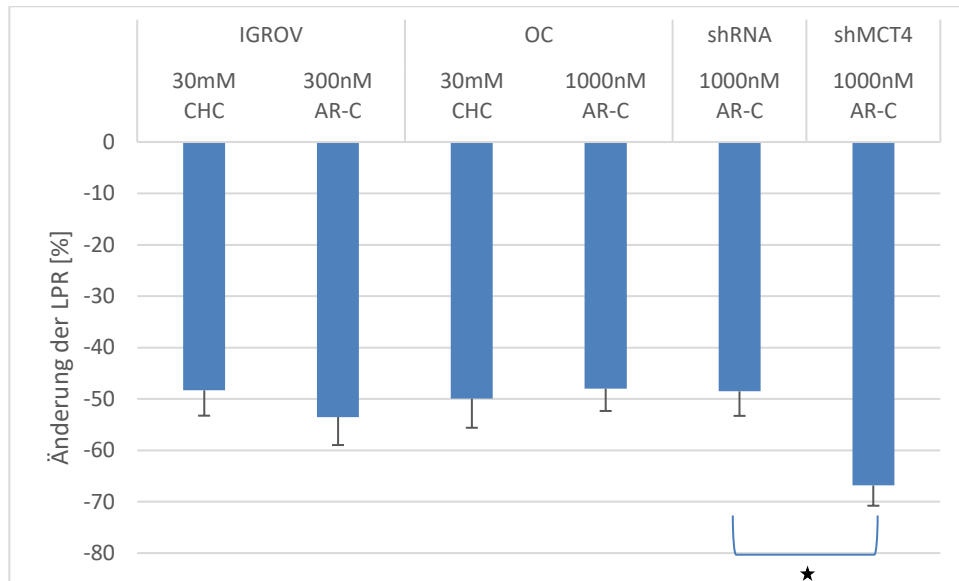


Abb. 14: Änderung der Laktatproduktionsraten aller untersuchten Kombinationen aus Zelllinie und Hemmstoff unter der jeweils höchsten Inhibitor-Konzentration. Gezeigt wird die Reduktion der LPR unter maximaler Inhibitor-Konzentration im Vergleich zur LPR der jeweiligen unbehandelten Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3). CHC = α -CHC. AR-C = AR-C155858.

4.1.2 Glukoseverbrauchsraten

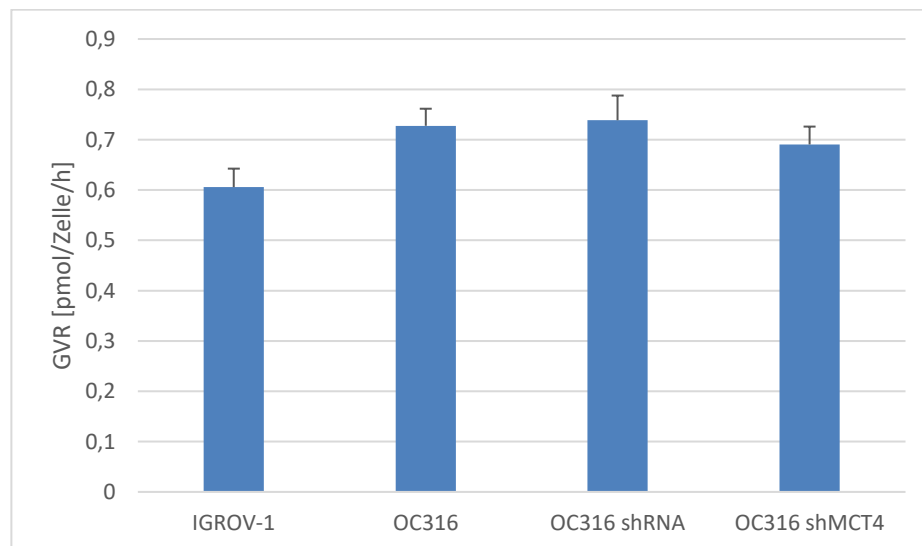


Abb. 15: Basale Glukoseverbrauchsraten (GVR) der verwendeten Zelllinien. Dargestellt sind für IGROV-1 und OC316 jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus sechs unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=6, n=3), da die Werte der jeweiligen unbehandelten Zellen aus den Versuchen mit α -CHC und AR-C155858 zusammengefasst wurden. Für OC316 shRNA und OC316 shMCT4 sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung dargestellt (N=3, n=3).

Die im Rahmen der Messungen mit dem Inhibitor α -CHC mitgeführten unbehandelten IGROV-1-Zellen wiesen eine über 24 Stunden gemittelte Glukoseverbrauchsrate von $0,61 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h auf (vgl. Abb. 15). Unter dem Einfluss von 10 ($0,49 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h), 20 ($0,43 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h) und 30 mM α -CHC ($0,30 \pm 0,02$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Glukoseverbrauchsraten (GVR) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 16). Im Vergleich zwischen unbehandelten und den mit 30 mM α -CHC behandelten Zellen betrug diese Reduktion $51,14 \pm 2,67$ % (vgl. Abb. 19).

Für die unbehandelten OC316-Zellen ergab sich eine Glukoseverbrauchsrate von $0,74 \pm 0,04$ pmol/Zelle*h (vgl. Abb. 15). Unter dem Einfluss von 10 ($0,60 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h), 20 ($0,47 \pm 0,05$ pmol/Zelle/h) und 30 mM α -CHC ($0,35 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Glukoseverbrauchsraten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 16). Im Vergleich zwischen unbehandelten und den mit 30 mM α -CHC behandelten Zellen betrug diese Reduktion $52,65 \pm 5,09$ % (vgl. Abb. 19).

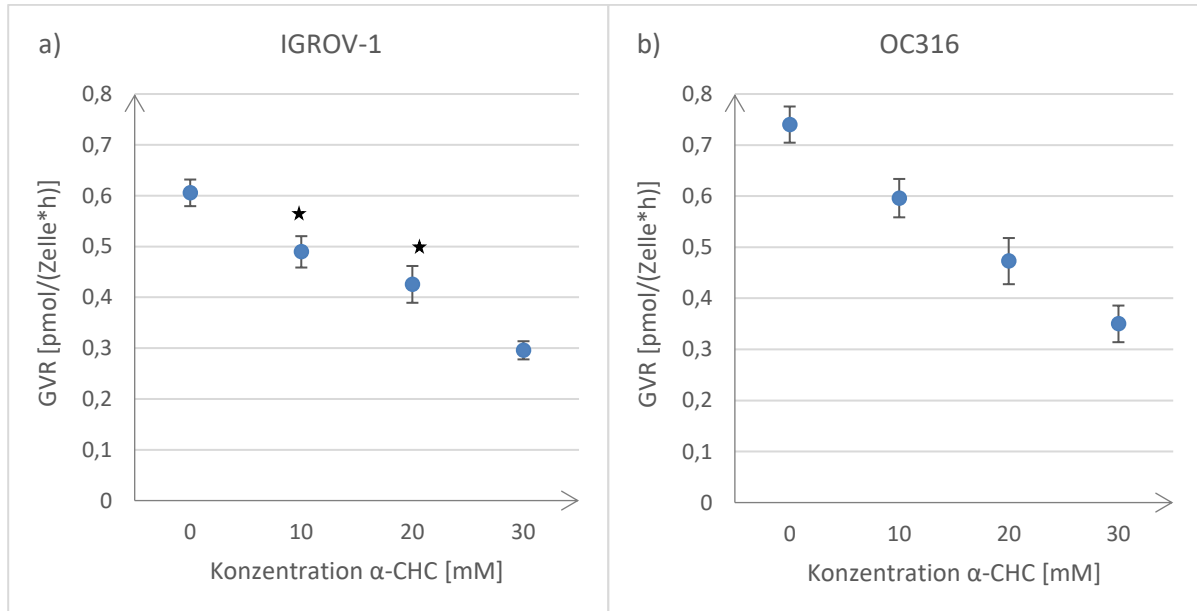


Abb. 16: Glukoseverbrauchsraten (GVR) von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an α -CHC. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3). a) IGROV-1. b) OC316.

Die im Rahmen der Messungen mit dem Inhibitor AR-C155858 mitgeführten unbehandelten IGROV-1-Zellen wiesen eine über 24 Stunden gemittelte Glukoseverbrauchsrate von $0,61 \pm 0,05$ pmol/Zelle/h auf (vgl. Abb. 15). Unter dem Einfluss von 10 ($0,52 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h), 50 ($0,42 \pm 0,02$ pmol/Zelle/h) und 300 nM AR-C155858 ($0,29 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Glukoseverbrauchsraten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 17). Im Vergleich zwischen den unbehandelten Zellen und den mit 300 nM AR-C155858 behandelten Zellen betrug diese Reduktion $52,63 \pm 4,71$ % (vgl. Abb. 19).

Für die unbehandelten OC316-Zellen ergab sich eine Glukoseverbrauchsrate von $0,71 \pm 0,03$ pmol/Zelle*h (vgl. Abb. 15). Unter dem Einfluss von 10 ($0,62 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h) und 100 nM ($0,46 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h) sowie 1 μ M AR-C155858 ($0,34 \pm 0,02$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Glukoseverbrauchsraten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 17). Im Vergleich zwischen unbehandelten Zellen und den mit 1 μ M AR-C155858 behandelten Zellen betrug diese Reduktion $51,89 \pm 4,90$ % (vgl. Abb. 19).

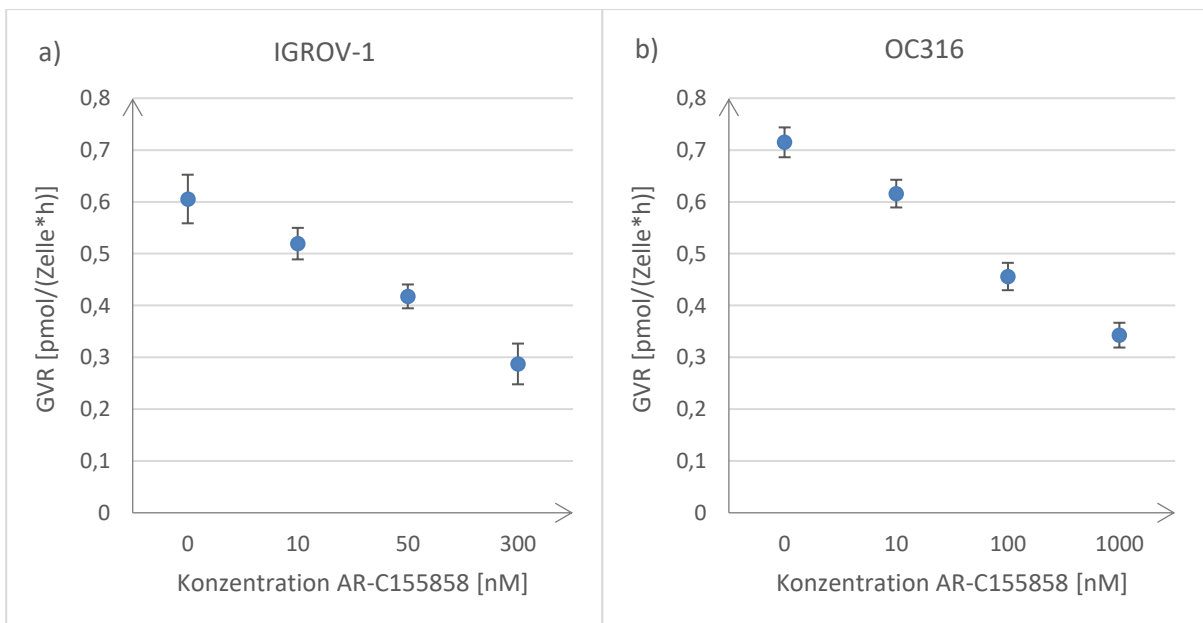


Abb. 17: Glukoseverbrauchsraten von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3). a) IGROV-1. b) OC316.

Die gentechnisch modifizierten Kontrollzellen der OC316-Linie shRNA wiesen unbehandelt eine über 24 Stunden gemittelte Glukoseverbrauchsrate von $0,74 \pm 0,05$ pmol/Zelle*h auf (vgl. Abb. 15). Unter dem Einfluss von 10 ($0,62 \pm 0,08$ pmol/Zelle/h) und 100 nM ($0,48 \pm 0,06$ pmol/Zelle/h) sowie 1 μ M AR-C155858 ($0,39 \pm 0,04$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Glukoseverbrauchsraten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 18). Im Vergleich zwischen unbehandelten Zellen und den mit 1 μ M AR-C155858 behandelten Zellen betrug diese Reduktion $47,12 \pm 5,80$ % (vgl. Abb. 19).

Die OC316 MCT4-Knockout-Zellen (OC316) shMCT4 wiesen unbehandelt eine über 24 Stunden gemittelte Glukoseverbrauchsrate von $0,69 \pm 0,04$ pmol/Zelle*h auf (vgl. Abb. 15). Unter dem Einfluss von 10 ($0,56 \pm 0,05$ pmol/Zelle/h) und 100 nM ($0,41 \pm 0,06$ pmol/Zelle/h) sowie 1 μ M AR-C155858 ($0,27 \pm 0,03$ pmol/Zelle/h) waren signifikante Verminderungen der Glukoseverbrauchsraten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$; vgl. Abb. 18). Im Vergleich zwischen unbehandelten Zellen und den mit 1 μ M AR-C155858 behandelten Zellen betrug diese Reduktion $60,80 \pm 4,00$ % (vgl. Abb. 19).

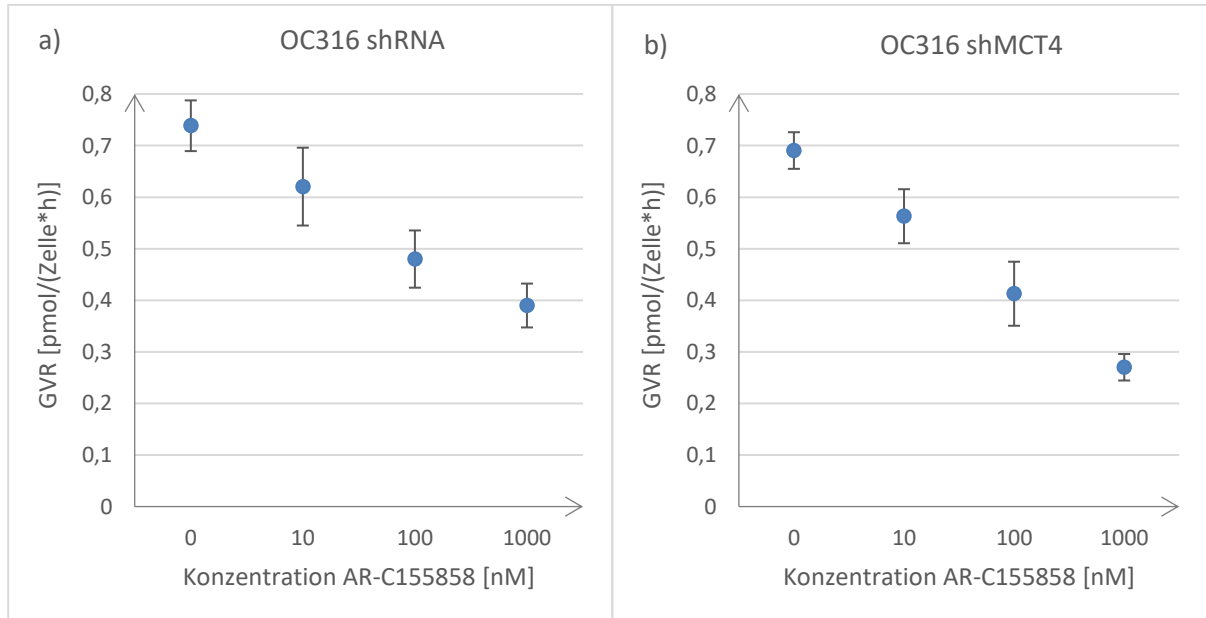


Abb. 18: Glukoseverbrauchsrate von OC316 shRNA und OC316 shMCT4 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3). a) OC316 shRNA. b) OC316 shMCT4.

In der zusammenfassenden Betrachtung der Änderungen der Glukoseverbrauchs-raten ergibt sich demnach folgendes Bild (vgl. Abb. 19): 30 mM α -CHC verringerten die Glukoseverbrauchsrate von IGROV-1- und OC316-Zellen um einen äquivalenten, also nicht signifikant unterschiedlichen, prozentualen Anteil ($51,14 \pm 2,67$ % bzw. $52,65 \pm 5,09$ %). Diese Reduktion war sowohl zueinander äquivalent, sondern auch zu den Reduktionen durch 300 nM (IGROV-1) bzw. 1 μ M (OC316) AR-C155858 ($52,63 \pm 4,71$ % bzw. $51,89 \pm 4,90$ %). Auch die Reduktionen der Glukoseverbrauchsrate von nativen OC316-Zellen und shRNA-Zellen wiesen keinen signifikanten Unterschied auf ($52,65 \pm 5,09$ % bzw. $47,12 \pm 5,80$ %). Abbildung 19 illustriert in Form der ersten fünf Balken die Äquivalenz dieser Änderungen. Einen signifikanten Unterschied zeigt jedoch der Vergleich von OC316 shRNA- und OC316 shMCT4-Zellen: Bei letzteren übte die Applikation von 1 μ M AR-C155858 mit $-60,80 \pm 4,00$ % eine signifikant höhere Reduktion der Glukoseverbrauchsrate aus als bei shRNA ($p < 0,0001$) (vgl. Abb. 19).

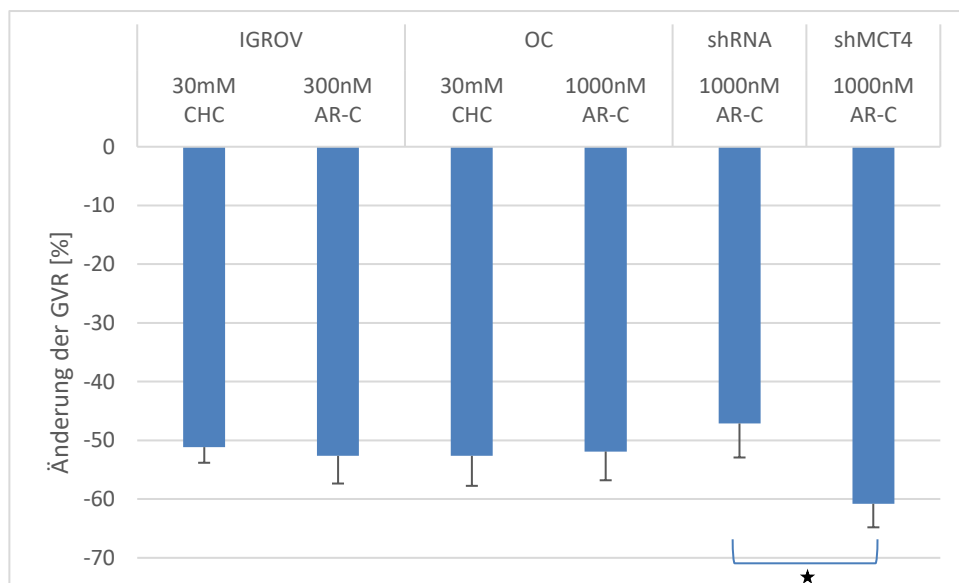


Abb. 19: Änderung der Glukoseverbrauchs-raten aller untersuchten Kombinationen aus Zelllinie und Hemmstoff unter der jeweils höchsten Inhibitor-Konzentration. Gezeigt wird die Reduktion der GVR unter maximaler Inhibitor-Konzentration im Vergleich zur GVR der unbehandelten Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3).

4.1.3 Extrazelluläre Azidifizierungsraten

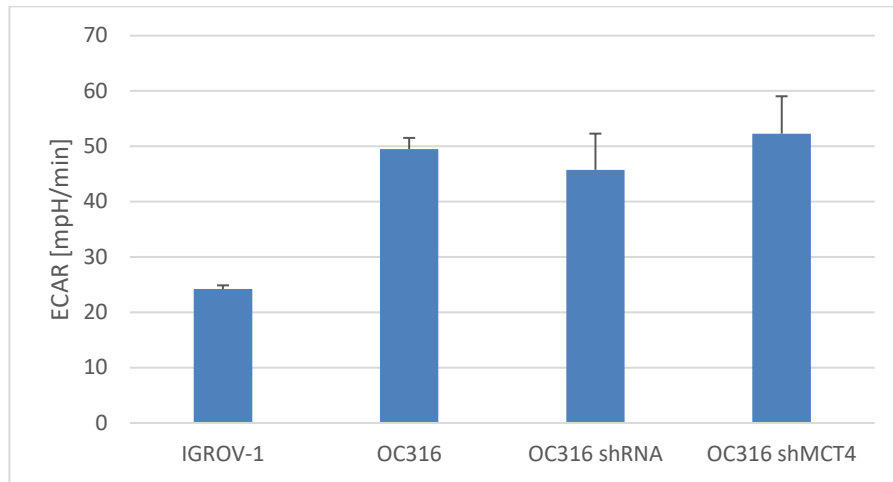


Abb. 20: Basale Azidifizierungsraten (ECAR) der verwendeten Zelllinien. Dargestellt sind für IGROV-1 und OC316 jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus sechs unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung (N=6, n=7), da die Werte der jeweiligen unbehandelten Zellen aus den Versuchen mit α -CHC und AR-C155858 zusammengefasst wurden. Für OC316 shRNA und OC316 shMCT4 sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung dargestellt (N=3, n=7).

Im Rahmen der Versuche mit dem unspezifischen MCT-Hemmstoff α -CHC wiesen IGROV-1-Zellen unbehandelt eine ECAR von $23,87 \pm 0,56$ mpH/min auf (vgl. Abb. 20). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoff-Konzentration von 10, 20 bzw. 30 mM) wurden signifikante Verminderungen der ECAR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 21). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von 30 mM betrug diese noch $13,25 \pm 1,32$ mpH/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte Minderung der ECAR lag bei $-44,43 \pm 5,96$ % (vgl. Abb. 24).

Im Rahmen der Versuche mit dem unspezifischen MCT-Hemmstoff α -CHC wiesen OC316-Zellen unbehandelt eine ECAR von $48,91 \pm 1,84$ mpH/min auf (vgl. Abb. 20). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoff-Konzentration von 10, 20 bzw. 30 mM) wurden signifikante Verminderungen der ECAR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 21). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von 30 mM betrug die ECAR $26,96 \pm 3,65$ mpH/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte Minderung der ECAR lag bei $-44,74 \pm 8,27$ % (vgl. Abb. 24).

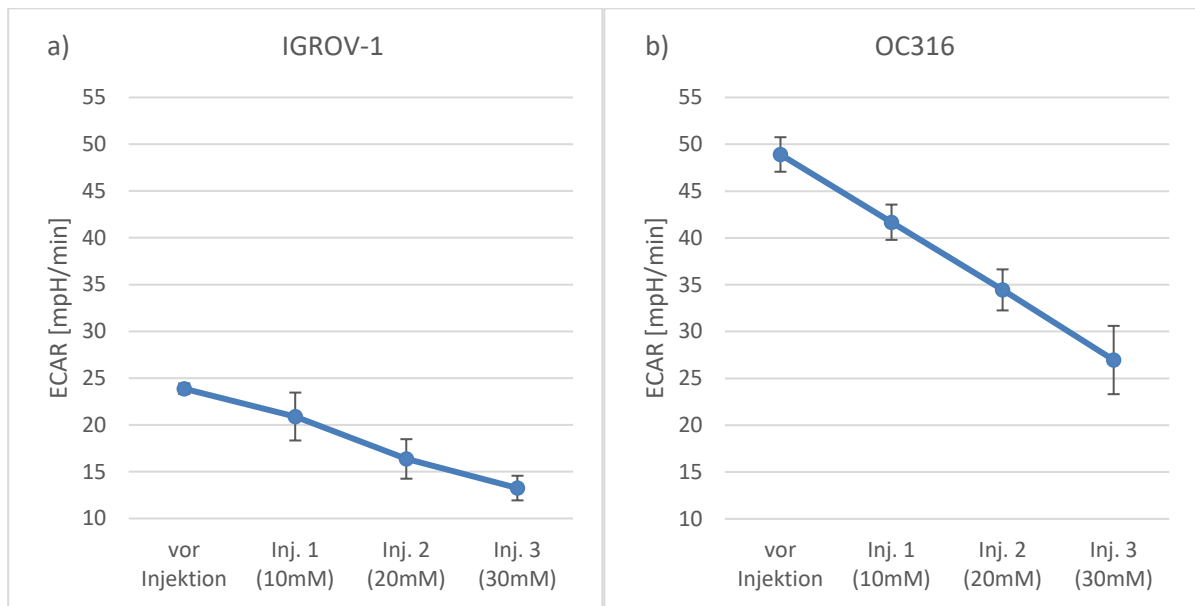


Abb. 21: Extrazelluläre Azidifizierungsraten (ECAR) von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an α -CHC. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung (N=3, n=7). a) IGROV-1. b) OC316.

Im Rahmen der Versuche mit dem spezifischen MCT1-Hemmstoff AR-C155858 wiesen IGROV-1-Zellen unbehandelt eine ECAR von $24,53 \pm 0,62$ mpH/min auf (vgl. Abb. 20). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoff-Konzentration von 10, 50 bzw. 30 nM) wurden signifikante Verminderungen der ECAR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 22). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von 300 nM betrug diese noch $13,85 \pm 1,28$ mpH/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte Minderung der ECAR lag bei $-43,54 \pm 5,09$ % (vgl. Abb. 24).

Im Rahmen der Versuche mit dem spezifischen MCT1-Hemmstoff AR-C155858 wiesen OC316-Zellen unbehandelt eine ECAR von $50,11 \pm 2,03$ mpH/min auf (vgl. Abb. 20). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoff-Konzentration von 10, 100 bzw. 1000 nM) wurden signifikante Verminderungen der ECAR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 22). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von 1 μ M betrug diese noch $26,26 \pm 1,15$ mpH/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte Minderung der ECAR lag bei $-47,46 \pm 4,08$ % (vgl. Abb. 24).

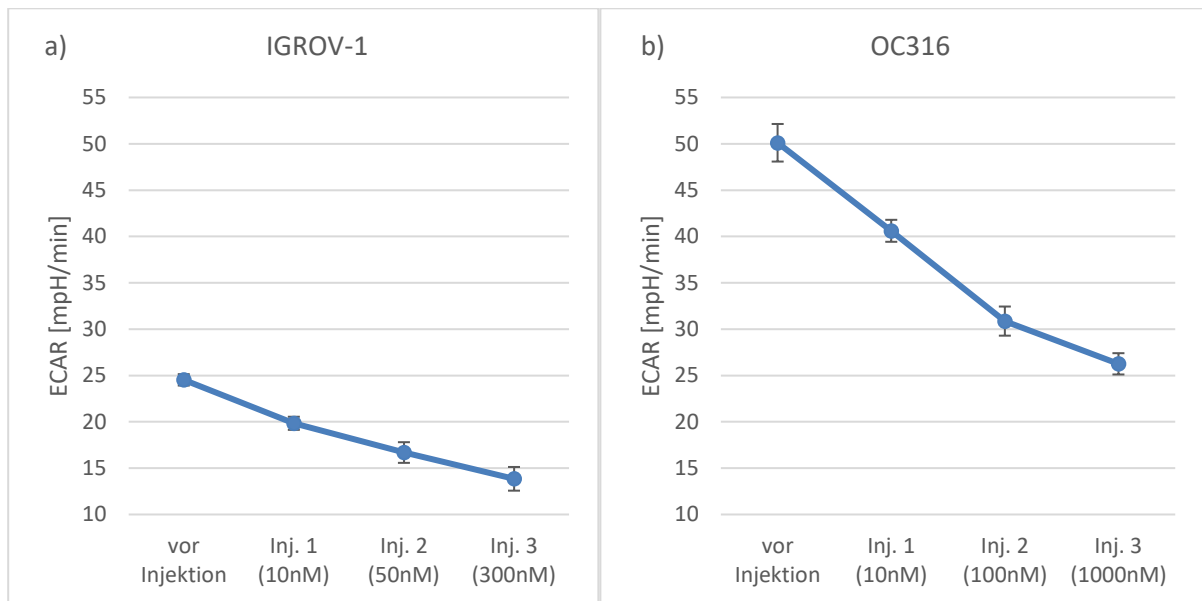


Abb. 22: Extrazelluläre Azidifizierungsraten von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung (N=3, n=7). a) IGROV-1. b) OC316.

Im Rahmen der Messungen mit dem spezifischen MCT1-Hemmstoff AR-C155858 wiesen shRNA-Zellen unbehandelt eine ECAR von $45,76 \pm 6,53$ mpH/min auf (vgl. Abb. 20). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoff-Konzentration von 10, 100 bzw. 1000 nM) wurden signifikante Verminderungen der ECAR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 23). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von $1 \mu\text{M}$ betrug diese noch $26,81 \pm 2,88$ mpH/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte Minderung der ECAR lag bei $-40,57 \pm 9,36$ % (vgl. Abb. 24).

Im Rahmen der Messungen mit dem spezifischen MCT1-Hemmstoff AR-C155858 wiesen shMCT4-Zellen unbehandelt eine ECAR von $52,29 \pm 6,76$ mpH/min auf (vgl. Abb. 20). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoff-Konzentration von 10, 100 bzw. 1000 nM) wurden signifikante Verminderungen der ECAR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 23). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von $1 \mu\text{M}$ betrug diese noch $20,03 \pm 1,72$ mpH/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte Minderung der ECAR lag bei $-61,09 \pm 5,93$ % (vgl. Abb. 24).

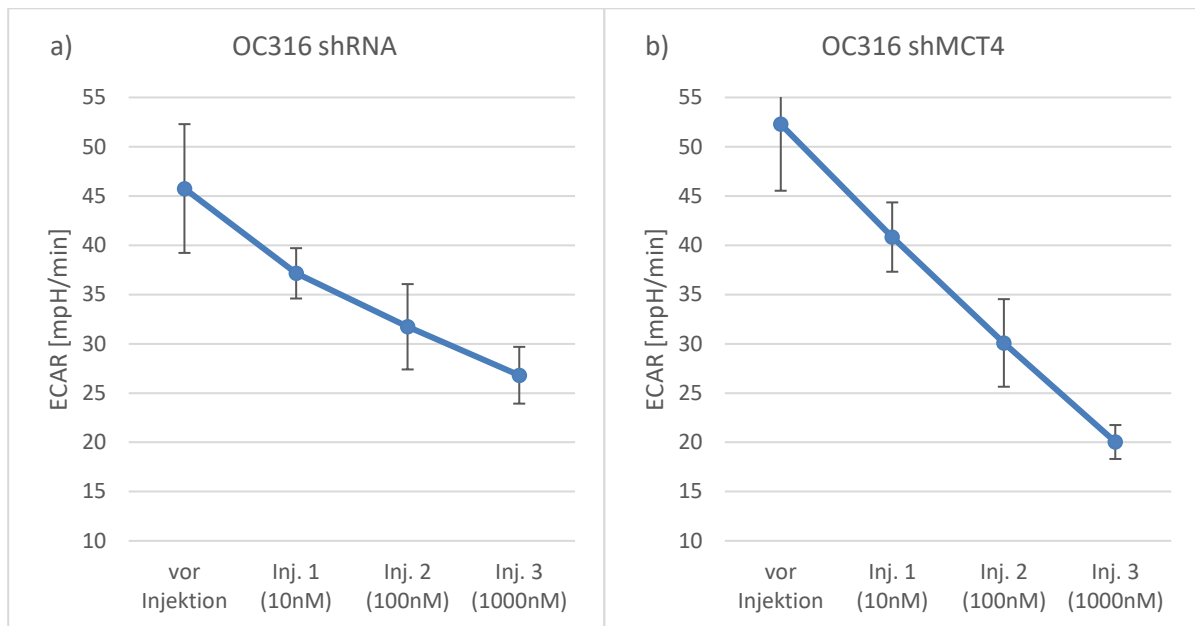


Abb. 23: Extrazelluläre Azidifizierungsraten von OC316 shRNA und OC316 shMCT4 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung (N=3, n=7). a) OC316 shRNA. b) OC316 shMCT4.

In der zusammenfassenden Betrachtung der ECAR-Änderungen ergibt sich demnach folgendes Bild (vgl. Abb. 24): 30 mM α -CHC verringerten die ECAR von IGROV-1- und OC316-Zellen um einen äquivalenten, also nicht signifikant unterschiedlichen, prozentualen Anteil ($-44,43 \pm 5,96$ % bzw. $-44,74 \pm 8,27$ %). Diese prozentualen Reduktionen der ECAR waren jedoch nicht nur zueinander äquivalent, sondern auch zu den Reduktionen durch 300 nM (IGROV-1) bzw. 1 μ M (OC316) AR-C155858 ($-43,54 \pm 5,09$ % bzw. $-47,46 \pm 4,08$ %). Auch die Reduktionen der ECAR von nativen OC316-Zellen und shRNA-Zellen wiesen keinen signifikanten Unterschied auf ($-47,46 \pm 4,08$ % bzw. $-40,57 \pm 9,36$ %). Einen signifikanten Unterschied lieferte jedoch der Vergleich von shRNA- und shMCT4-Zellen: Bei letzteren übte die Applikation von 1 μ M AR-C155858 mit $-61,09 \pm 5,93$ % eine signifikant höhere Reduktion der ECAR aus als bei shRNA ($p < 0,05$; vgl. Abb. 24).

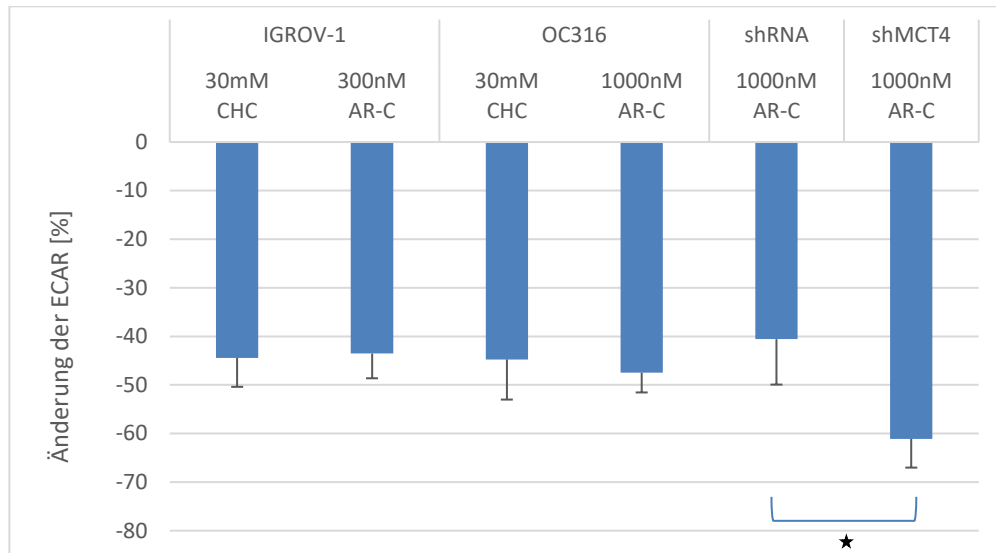


Abb. 24: Änderung der extrazellulären Azidifizierungsraten aller untersuchten Kombinationen aus Zelllinie und Hemmstoff unter der jeweils höchsten Inhibitor-Konzentration. Gezeigt wird die Reduktion der ECAR unter maximaler Inhibitor-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung (N=3, n=7).

4.1.4 Sauerstoffverbrauchsrate

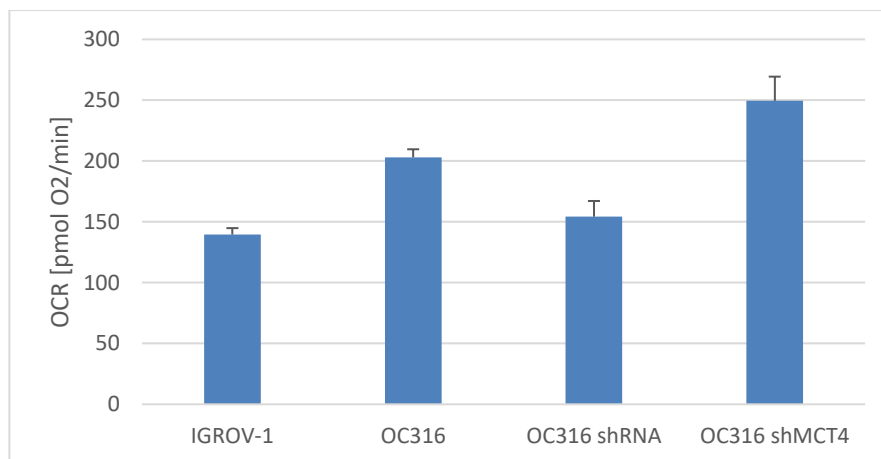


Abb. 25: Basale Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) der verwendeten Zelllinien. Dargestellt sind für IGROV-1 und OC316 jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus sechs unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung (N=6, n=7), da die Werte der jeweiligen unbehandelten Zellen aus den Versuchen mit α -CHC und AR-C155858 zusammengefasst wurden. Für OC316 shRNA und OC316 shMCT4 sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung dargestellt (N=3, n=7).

Im Rahmen der Versuche mit dem unspezifischen MCT-Hemmstoff α -CHC wiesen IGROV-1-Zellen unbehandelt eine OCR von $139,49 \pm 3,73$ pmol O₂/min auf (vgl. Abb. 25). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoffkonzentration von 10, 20 bzw. 30 mM) wurden signifikante Verminderungen der OCR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 26). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von 30 mM betrug diese noch $84,84 \pm 2,49$ pmol O₂/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte Minderung der OCR lag bei $-39,12 \pm 2,68$ % (vgl. Abb. 29).

Im Rahmen der Versuche mit dem unspezifischen MCT-Hemmstoff α -CHC wiesen OC316-Zellen unbehandelt eine OCR von $205,00 \pm 7,37$ pmol O₂/min auf (vgl. Abb. 25). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoffkonzentration von 10, 20 bzw. 30 mM) wurden signifikante Verminderungen der OCR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 26). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von 30 mM betrug diese noch $122,29 \pm 3,21$ pmol O₂/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte Minderung der OCR lag bei $-40,24 \pm 3,45$ % (vgl. Abb. 29).

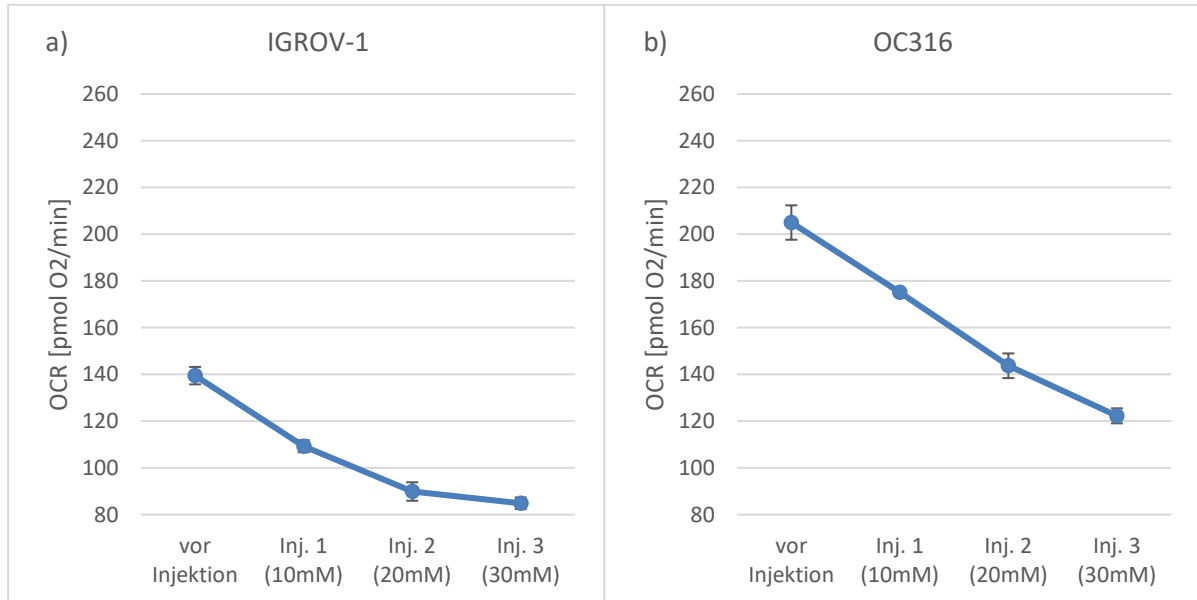


Abb. 26: Sauerstoffverbrauchsraten (OCR) von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an α -CHC. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung (N=3, n=7). a) IGROV-1. b) OC316.

Im Rahmen der Versuche mit dem spezifischen MCT-Hemmstoff AR-C155858 wiesen IGROV-1-Zellen unbehandelt eine OCR von $139,59 \pm 6,61$ pmol O₂/min auf (vgl. Abb. 25). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoffkonzentration von 10, 50 bzw. 300 nM) wurden signifikante Verminderungen der OCR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 27). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von 300 nM betrug diese noch $84,28 \pm 1,67$ pmol O₂/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte Minderung der OCR lag bei $-39,48 \pm 3,27$ % (vgl. Abb. 29).

Im Rahmen der Versuche mit dem spezifischen MCT-Hemmstoff AR-C155858 wiesen OC316-Zellen unbehandelt eine OCR von $201,01 \pm 5,33$ mol O₂/min auf (vgl. Abb. 25). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoffkonzentration von 10, 100 bzw. 1000 nM) wurden signifikante Verminderungen der OCR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 27). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von 1 µM betrug diese noch $117,42 \pm 1,95$ pmol O₂/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte Minderung der OCR lag bei $-41,55 \pm 1,76$ % (vgl. Abb. 29).

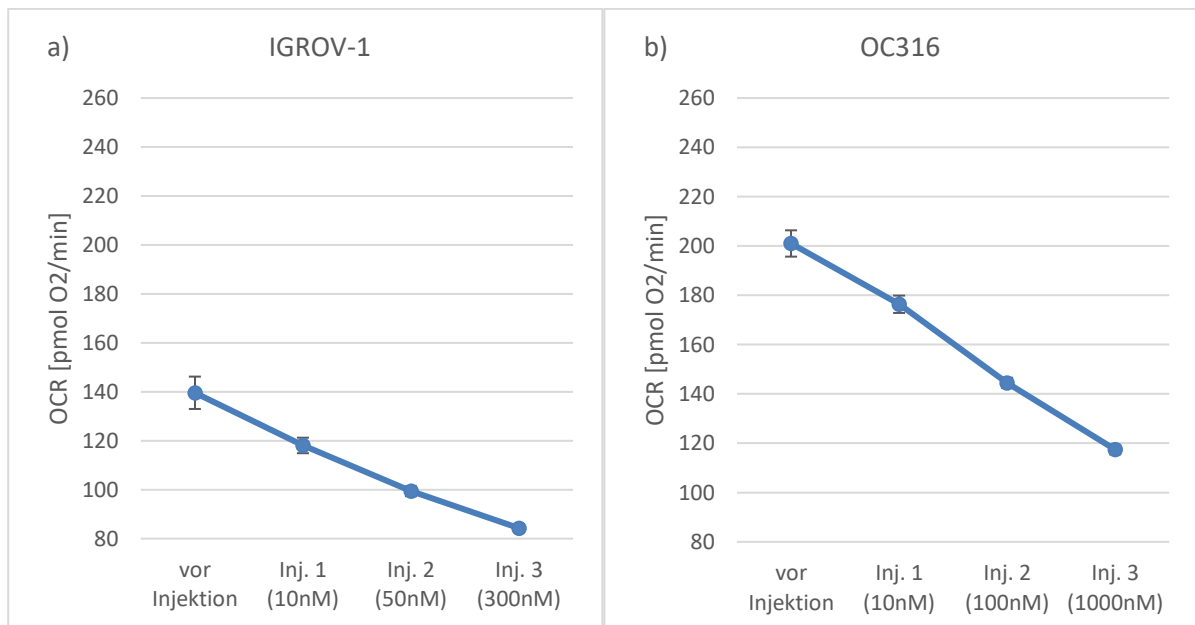


Abb. 27: Sauerstoffverbrauchsraten von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung (N=3, n=7). a) IGROV-1. b) OC316.

Im Rahmen der Messungen mit dem spezifischen MCT1-Hemmstoff AR-C155858 wiesen shRNA-Zellen unbehandelt eine OCR von $154,25 \pm 12,90$ pmol O₂/min auf (vgl. Abb. 25). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoff-Konzentration von 10, 100 bzw. 1000 nM) wurden signifikante Verminderungen der OCR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 28). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von 1 μ M betrug diese noch $84,53 \pm 4,52$ pmol O₂/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte OCR-Reduktion lag bei $-44,92 \pm 4,49$ % (vgl. Abb. 29).

Im Rahmen der Messungen mit dem spezifischen MCT1-Hemmstoff AR-C155858 wiesen shMCT4-Zellen unbehandelt eine OCR von $249,46 \pm 19,92$ pmol O₂/min auf (vgl. Abb. 25). Nach Injektion der Ports 1 bis 3 (und damit einhergehender Hemmstoff-Konzentration von 10, 100 bzw. 1000 nM) wurden signifikante Verminderungen der OCR detektiert ($p < 0,05$; vgl. Abb. 28). Im Anschluss an die Injektion des dritten Ports und das damit einhergehende Erreichen einer Hemmstoffkonzentration von 1 μ M betrug diese noch $102,83 \pm 9,46$ pmol O₂/min. Die aus allen einzelnen derart behandelten Wells gemittelte OCR-Reduktion lag bei $-58,44 \pm 5,94$ % (vgl. Abb. 29).

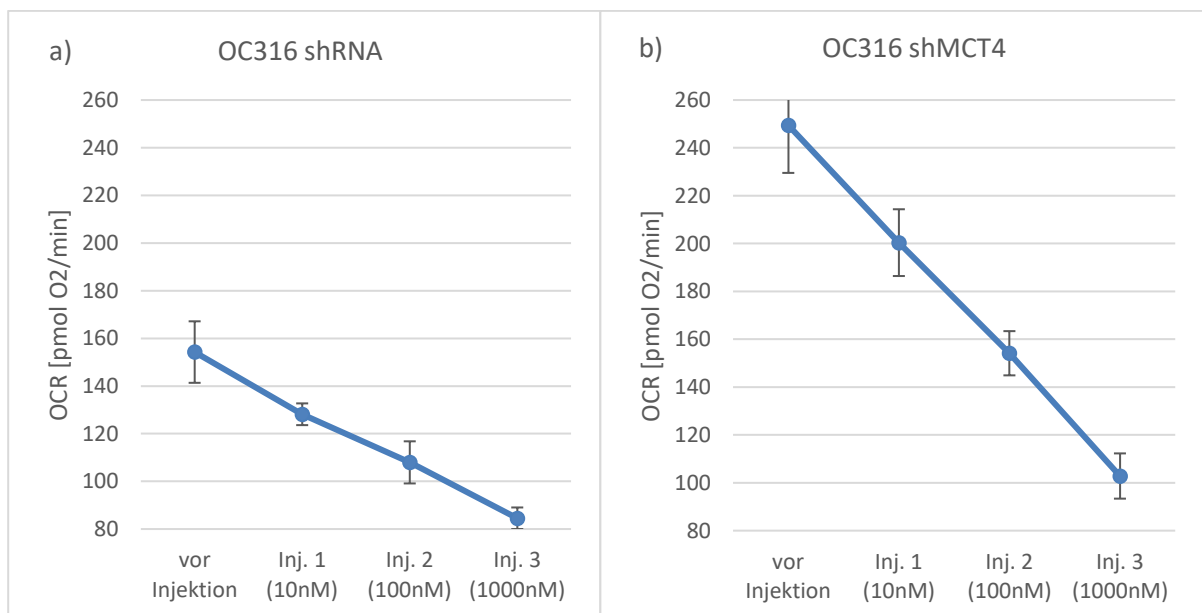


Abb. 28: Sauerstoffverbrauchsraten von OC316 shRNA und OC316 shMCT4 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung (N=3, n=7). a) OC316 shRNA. b) OC316 shMCT4.

In der zusammenfassenden Betrachtung der OCR-Änderungen ergibt sich demnach folgendes Bild (vgl. Abb. 29): 30 mM α -CHC verringerten die OCR von IGROV-1- und OC316-Zellen um einen äquivalenten, also nicht signifikant unterschiedlichen, prozentualen Anteil ($-39,12 \pm 2,68$ % bzw. $-40,24 \pm 3,45$ %). Diese prozentualen Reduktionen der OCR waren jedoch nicht nur zueinander äquivalent, sondern auch zu den Reduktionen durch 300 nM (IGROV-1) bzw. 1 μ M (OC316) AR-C155858 ($-39,48 \pm 3,27$ % bzw. $-41,55 \pm 1,76$ %). Auch die Reduktionen der OCR von nativen OC316-Zellen und shRNA-Zellen wiesen keinen signifikanten Unterschied auf ($41,55 \pm 1,76$ % bzw. $-44,92 \pm 4,49$ %). Einen signifikanten Unterschied lieferte jedoch der Vergleich von shRNA- und shMCT4-Zellen: Bei letzteren übte die Applikation von 1 μ M AR-C155858 mit $-58,44 \pm 5,94$ % eine signifikant höhere Reduktion der OCR aus als bei shRNA ($p < 0,05$; vgl. Abb. 29).

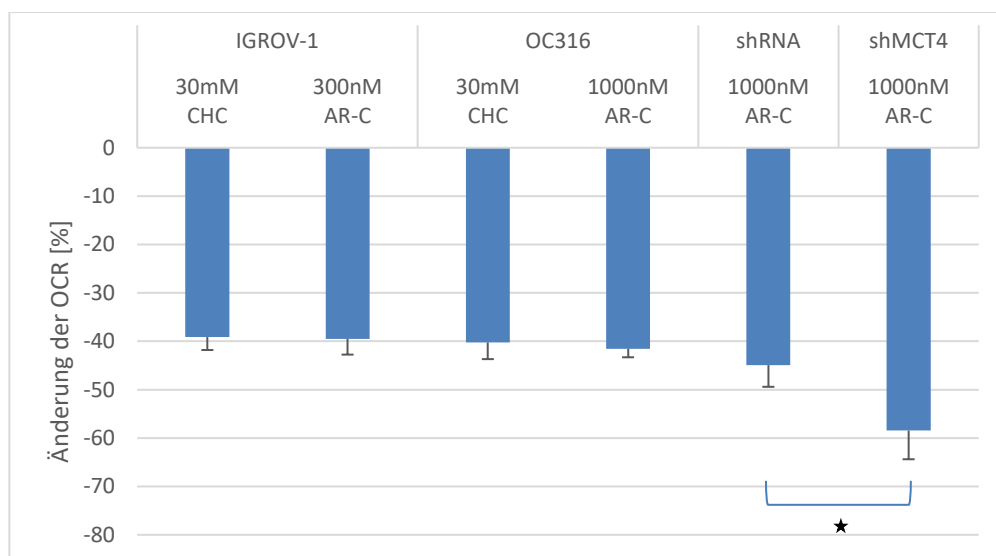


Abb. 29: Änderung der Sauerstoffverbrauchsraten aller untersuchten Kombinationen aus Zelllinie und Hemmstoff unter der jeweils höchsten Inhibitor-Konzentration. Gezeigt wird die Reduktion der OCR unter maximaler Inhibitor-Konzentration im Vergleich zur OCR der unbehandelten Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Siebenfachbestimmung (N=3, n=7).

4.2 Toxizität von α -CHC und AR-C155858

Mithilfe von XTT-Assays wurde die von den beiden verwendeten MCT-Inhibitoren auf die verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien ausgeübte Toxizität analysiert. Dabei wurden diejenigen Konzentrationen untersucht, die auch bei den metabolischen Analysen Verwendung gefunden hatten. Die Toxizitätsbestimmung basiert auf der Detektion eines Farbumschlags, dem eine enzymkatalysierte Reaktion zugrunde liegt, die nur in vitalen Zellen abläuft. Die gemessenen Extinktionen der jeweiligen unbehandelten Kontrollzellen wurden als Referenzwert herangezogen und die Zellviabilität der dem Hemmstoff ausgesetzten Zellen darauf aufbauend in Prozent angegeben. Um die potenzielle toxische Wirkung des Lösungsmittels DMSO zu berücksichtigen, wurden Zellen mitgeführt, deren Medium nur die entsprechende Menge an DMSO ohne Hemmstoff enthielt. Auf diese Weise ließ sich aus den ermittelten Zellviabilitäten derjenige Anteil errechnen, der ausschließlich dem Hemmstoff zuzuschreiben war. Dieser Anteil wird im Folgenden jeweils als attribuierbare Toxizität bezeichnet.

Alle untersuchten Konzentrationen des unspezifischen MCT-Inhibitors α -CHC übten nach sechsständiger Inkubation auf IGROV-1-Zellen einen toxischen Effekt in Form einer signifikanten Minderung der Zellviabilität aus ($p < 0,05$). Unter Einfluss von 30 mM α -CHC betrug die Zellviabilität noch $40,55 \pm 4,70$ %, unter der entsprechenden DMSO-Konzentration von 1,2 % hingegen $79,61 \pm 1,63$ % (vgl. Abb. 30a). Aus der Verrechnung aller derart behandelten Wells ergab sich eine attribuierbare Toxizität der 30 mM α -CHC von $49,05 \pm 5,96$ % (vgl. Abb. 33).

Sämtliche untersuchten Konzentrationen des unspezifischen MCT-Inhibitors α -CHC übten auf OC316-Zellen einen toxischen Effekt in Form einer signifikanten Minderung der Zellviabilität aus ($p < 0,05$). Unter Einfluss von 30 mM α -CHC betrug die Zellviabilität noch $36,03 \pm 2,97$ %, unter der entsprechenden DMSO-Konzentration von 1,2 % hingegen $77,85 \pm 2,66$ % (vgl. Abb. 30b). Aus der Verrechnung aller derart behandelten Wells ergab sich eine attribuierbare Toxizität der 30 mM α -CHC von $53,62 \pm 4,72$ % (vgl. Abb. 33).

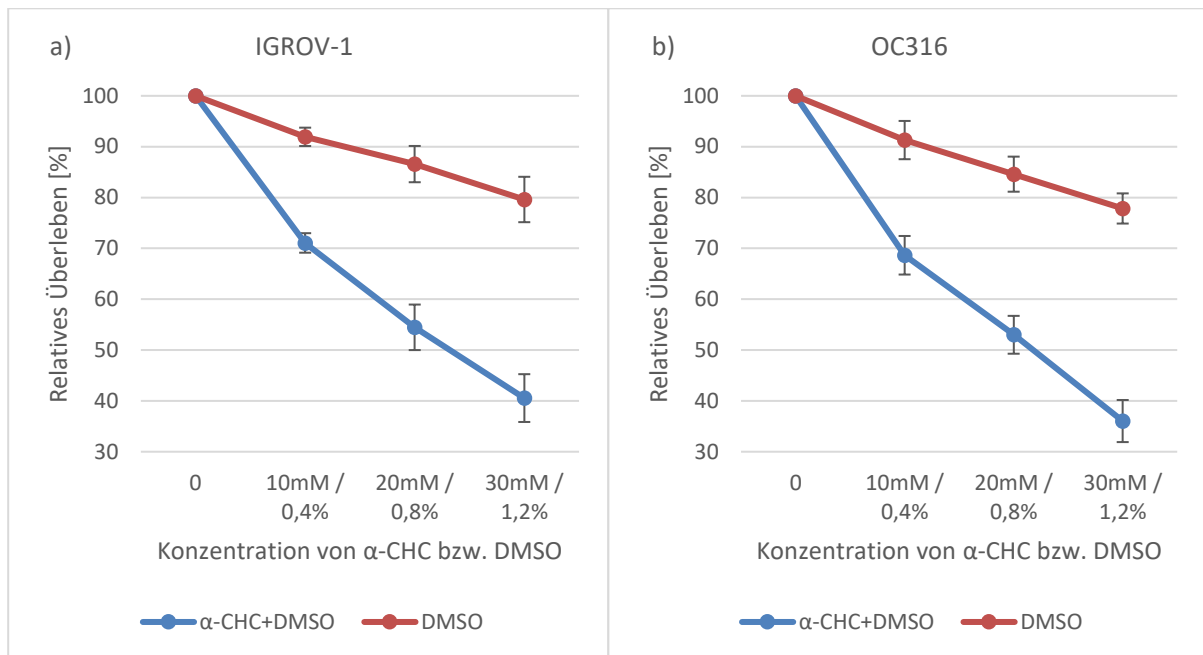


Abb. 30: Überlebenskurven von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an α -CHC. Aufgetragen ist das prozentuale Überleben der Zellen gegen die Inhibitor-Konzentration. Zusätzlich dokumentiert sind jeweils die Werte unter Einfluss ausschließlich von DMSO, ohne Inhibitor, in den entsprechenden Konzentrationen. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3). a) IGROV-1. b) OC316.

Sämtliche untersuchten Konzentrationen des spezifischen MCT1-Inhibitors AR-C155858 übten auf IGROV-1-Zellen einen toxischen Effekt in Form einer signifikanten Minderung der Zellviabilität aus ($p < 0,05$). Unter Einfluss von 300 nM AR-C155858 betrug die Zellviabilität noch $81,37 \pm 2,59$ %, unter der entsprechenden DMSO-Konzentration von 0,3 % hingegen $87,63 \pm 3,55$ % (vgl. Abb. 31). Aus der Verrechnung aller derart behandelten Wells ergab sich eine attribuierbare Toxizität der 300 nM AR-C155858 von $6,99 \pm 5,27$ % (vgl. Abb. 33).

Sämtliche untersuchten Konzentrationen des spezifischen MCT1-Inhibitors AR-C155858 übten auf OC316-Zellen einen toxischen Effekt in Form einer signifikanten Minderung der Zellviabilität aus ($p < 0,05$). Unter Einfluss von 1 μ M AR-C155858 betrug die Zellviabilität noch $71,14 \pm 1,53$ %, unter der entsprechenden DMSO-Konzentration von 1 % hingegen $80,66 \pm 3,50$ % (vgl. Abb. 31). Aus der Verrechnung aller derart behandelten Wells ergab sich eine attribuierbare Toxizität der 1 μ M AR-C155858 von $11,68 \pm 3,53$ % (vgl. Abb. 33).

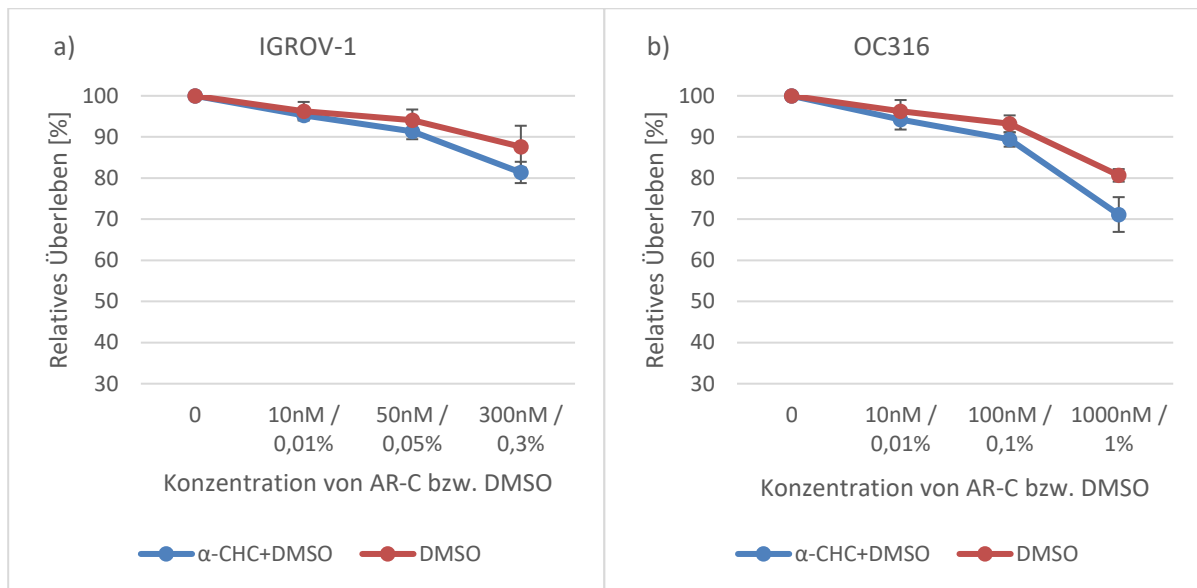


Abb. 31: Überlebenskurven von IGROV-1 und OC316 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858. Aufgetragen ist das prozentuale Überleben der Zellen gegen die Inhibitor-Konzentration. Zusätzlich dokumentiert sind jeweils die Werte unter Einfluss ausschließlich von DMSO, ohne Inhibitor, in den entsprechenden Konzentrationen. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3). a) IGROV-1. b) OC316.

Sämtliche untersuchten Konzentrationen des spezifischen MCT1-Inhibitors AR-C155858 übten auf shRNA-Zellen einen toxischen Effekt in Form einer signifikanten Minderung der Zellviabilität aus ($p < 0,05$). Unter Einfluss von 1 μM AR-C155858 betrug die Zellviabilität noch $78,73 \pm 1,86 \%$, unter der entsprechenden DMSO-Konzentration von 1 % hingegen $85,13 \pm 2,25 \%$ (vgl. Abb. 32). Aus der Verrechnung aller derart behandelten Zellkammern ergab sich eine attribuierbare Toxizität der 1 μM AR-C155858 von $7,49 \pm 2,09 \%$ (vgl. Abb. 33).

Sämtliche untersuchten Konzentrationen des spezifischen MCT1-Inhibitors AR-C155858 übten auf shMCT4-Zellen einen toxischen Effekt in Form einer signifikanten Minderung der Zellviabilität aus ($p < 0,05$). Unter Einfluss von 1 μM AR-C155858 betrug die Zellviabilität noch $75,29 \pm 1,87 \%$, unter der entsprechenden DMSO-Konzentration von 1 % hingegen $81,58 \pm 1,36 \%$ (vgl. Abb. 32). Aus der Verrechnung aller derart behandelten Wells ergab sich eine attribuierbare Toxizität der 1 μM AR-C155858 von $7,71 \pm 1,83 \%$ (vgl. Abb. 33).

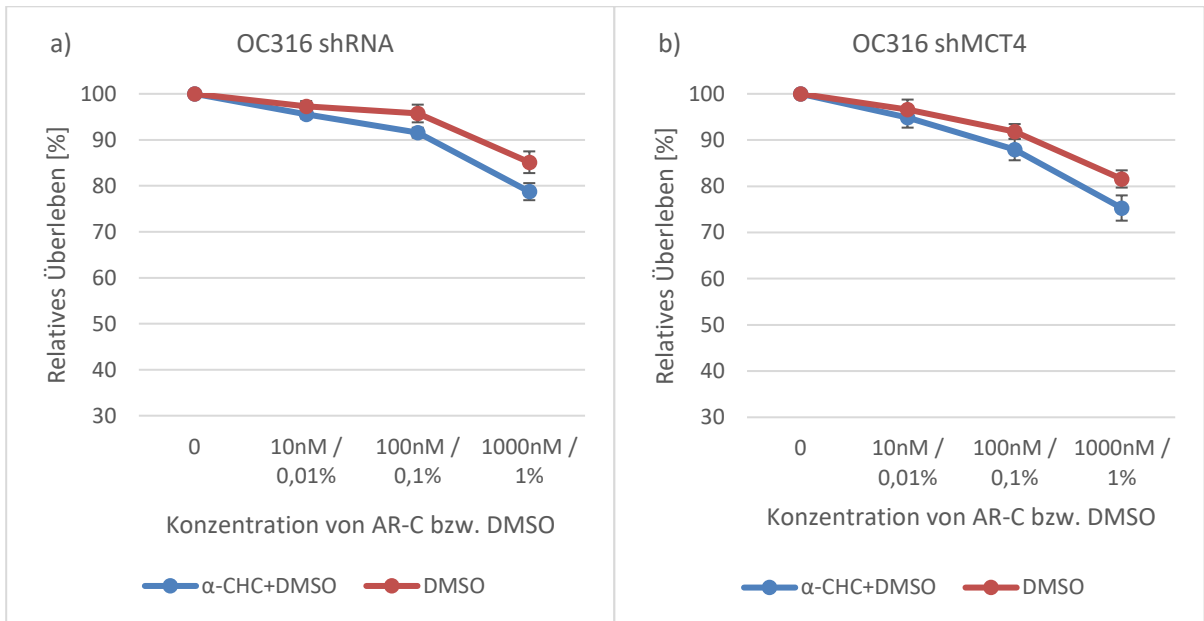


Abb. 32: Überlebenskurven von OC316 shRNA und OC316 shMCT4 in Abhängigkeit von der Konzentration an AR-C155858. Aufgetragen ist das prozentuale Überleben der Zellen gegen die Inhibitor-Konzentration. Zusätzlich dokumentiert sind jeweils die Werte unter Einfluss ausschließlich von DMSO, ohne Inhibitor, in den entsprechenden Konzentrationen. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3). a) OC316 shRNA. b) OC316 shMCT4.

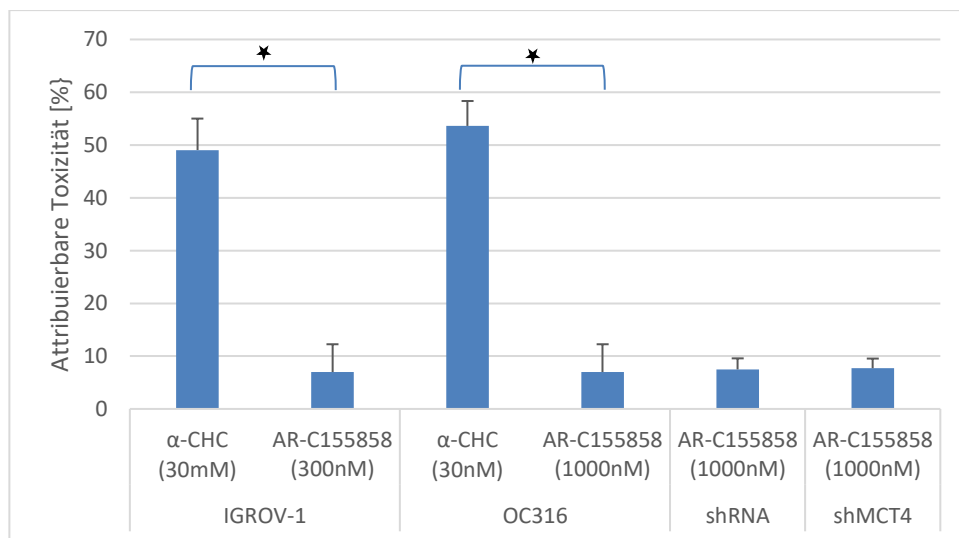


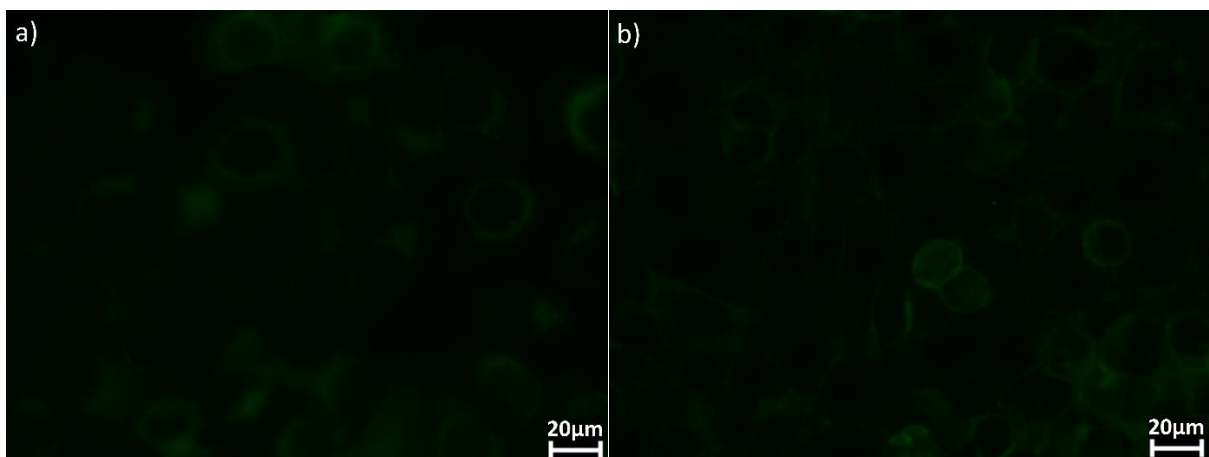
Abb. 33: Attribuierbare Toxizität der Inhibitoren auf die jeweiligen Zelllinien. Gezeigt wird die der jeweiligen Maximalkonzentration des jeweiligen Inhibitors attribuierbare toxische Wirkung auf die betreffende Zelllinie. Diese wurde durch Verrechnung mit den Werten der mit den entsprechenden Konzentrationen an DMSO behandelten Zellkammern gewonnen. Kategorial dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3). p<0,05.

4.3 Expression von MCT1 und MCT4

Die Bestimmung der Expressionsmuster an MCT1 und MCT4 in den verwendeten Zelllinien erfolgte mittels immunhistochemischer Fluoreszenzanalyse. Dazu wurden spezifische Primärantikörper für die jeweilige MCT-Isoform sowie ein Sekundärantikörper zur fluoreszenzbasierten Visualisierung des MCT-Primärantikörpers verwendet. Die so erzeugte Immunfärbung wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroskops BZ-8000 detektiert und die Ergebnisse anschließend mithilfe der Programme imageJ und Excel quantifiziert und aufbereitet.

Für beide MCT-Isoformen waren die Intensitäten von IGROV-1-Zellen am schwächsten. Der gemittelte Intensitätswert dieser Zellspots wurde deshalb jeweils als Referenzwert (= 100 %) deklariert und die Intensitäten der anderen Zellspots in Prozent dieses Referenzwerts angegeben.

Bei der Untersuchung der MCT1-Expression ließen sich optisch zunächst keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Fluoreszenzantwort der verschiedenen Zelllinien erkennen. In Abbildung 34 sind repräsentative MCT1-Immunfluoreszenzfärbungen der vier untersuchten Zelllinien dargestellt. Die computerbasierte Analyse zeigte jedoch sowohl für die native Ovarialkarzinomzelllinie OC316, als auch für die beiden gentechnisch modifizierten Zelllinien OC316 shRNA und shMCT4, eine signifikant höhere MCT-1-Expression als für IGROV-1 ($p < 0,05$; vgl. Abb. 35). Die Expression unter den drei OC316-Zelllinien war hingegen ähnlich hoch (vgl. Abb. 35).



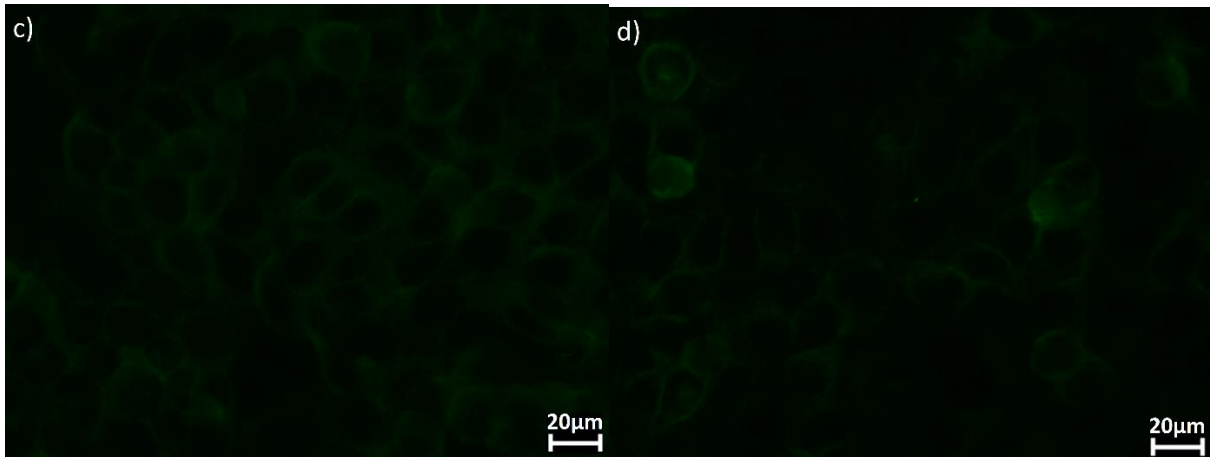


Abb. 34: Repräsentative Bildausschnitte der Immunfluoreszenzanalyse auf MCT1. a) IGROV-1. b) OC316. c) OC316 shRNA. d) OC316 shMCT4

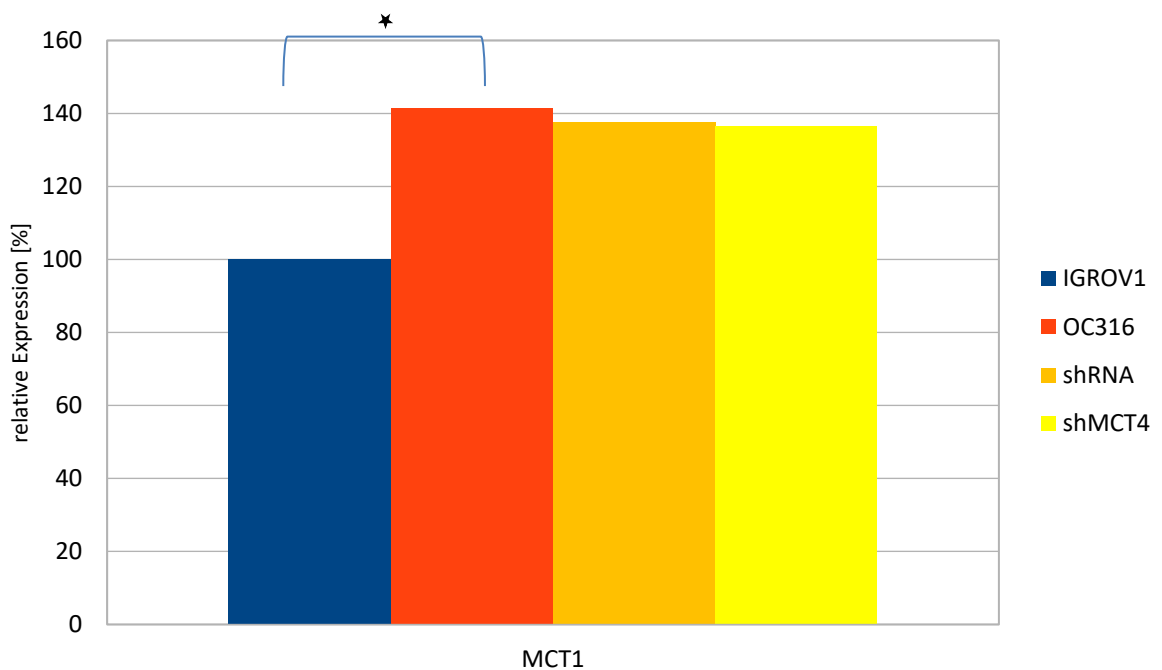


Abb. 35: Expression von MCT1 in den untersuchten Zelllinien.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Proteinexpressionen unter Definition der Werte von IGROV-1 als Referenz gleich 100 %. Die Daten entstammen einem einzigen Versuch, bei dem eine Fünffachbestimmung vorgenommen und in jedem der fünf korrespondierenden Zellspots jeweils fünf unterschiedliche Bereiche gemessen wurden (N=1, n=25).

Bei der Untersuchung der MCT4-Expression ergaben sich bereits optisch deutliche Unterschiede hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zwischen den Zelllinien. So war die MCT-4-Intensität bei OC316 sowie shRNA deutlich stärker ausgeprägt als bei IGROV-1 und shMCT4 (vgl. Abb. 36). Diese optische Beurteilung wurde durch die computerbasierte Quantifizierung untermauert. Es zeigten sich signifikant höhere Intensitäten bei OC316, shRNA und shMCT4 gegenüber IGROV-1 ($p < 0,05$). Zusätzlich waren jedoch die Intensitäten bei OC316 und shRNA signifikant gegenüber shMCT4 erhöht ($p < 0,05$), während zwischen OC316 und shRNA kein signifikanter Unterschied vorlag (vgl. Abb. 37).

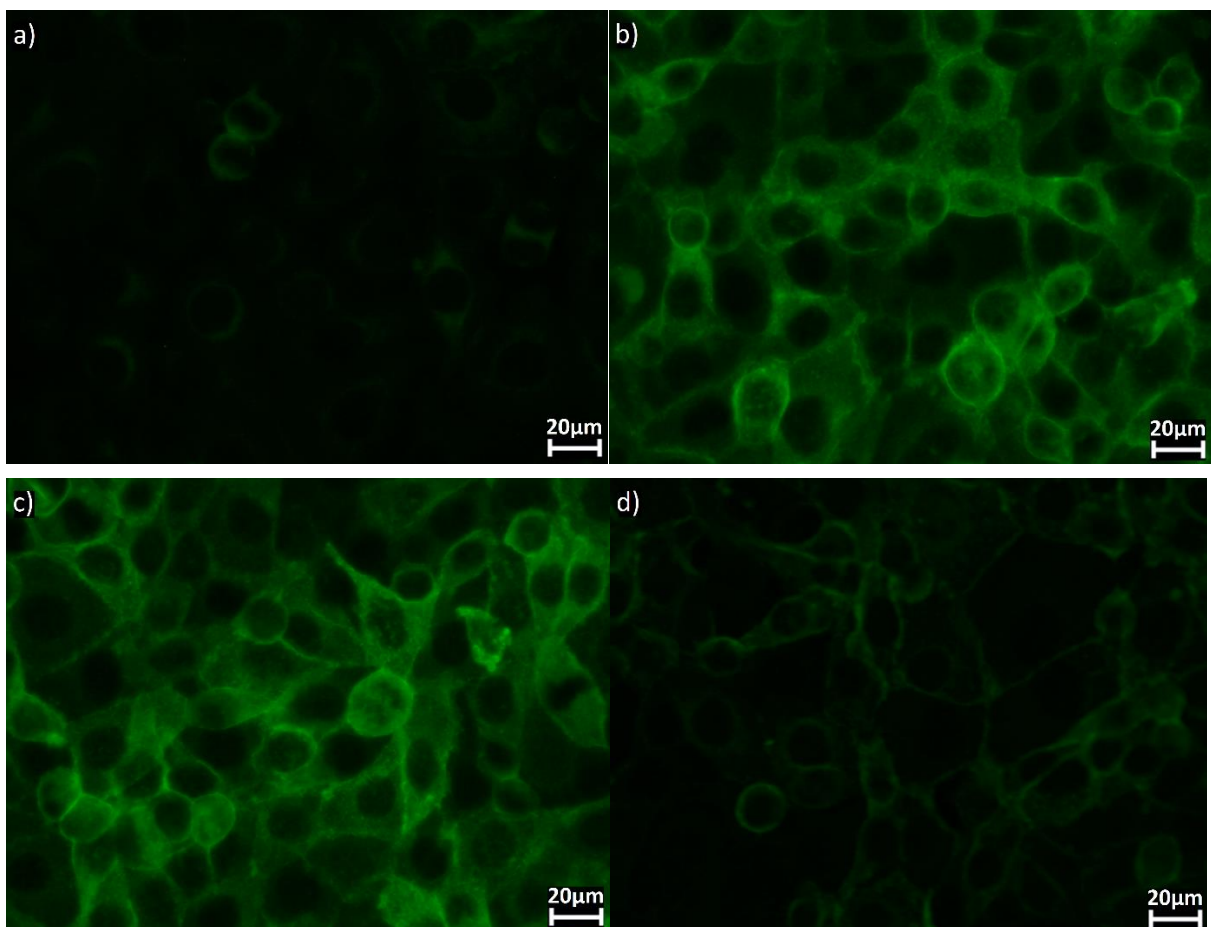


Abb. 36: Repräsentative Bildausschnitte der Immunfluoreszenzanalyse auf MCT4. a) IGROV-1. b) OC316. c) OC316 shRNA. d) OC316 shMCT4.

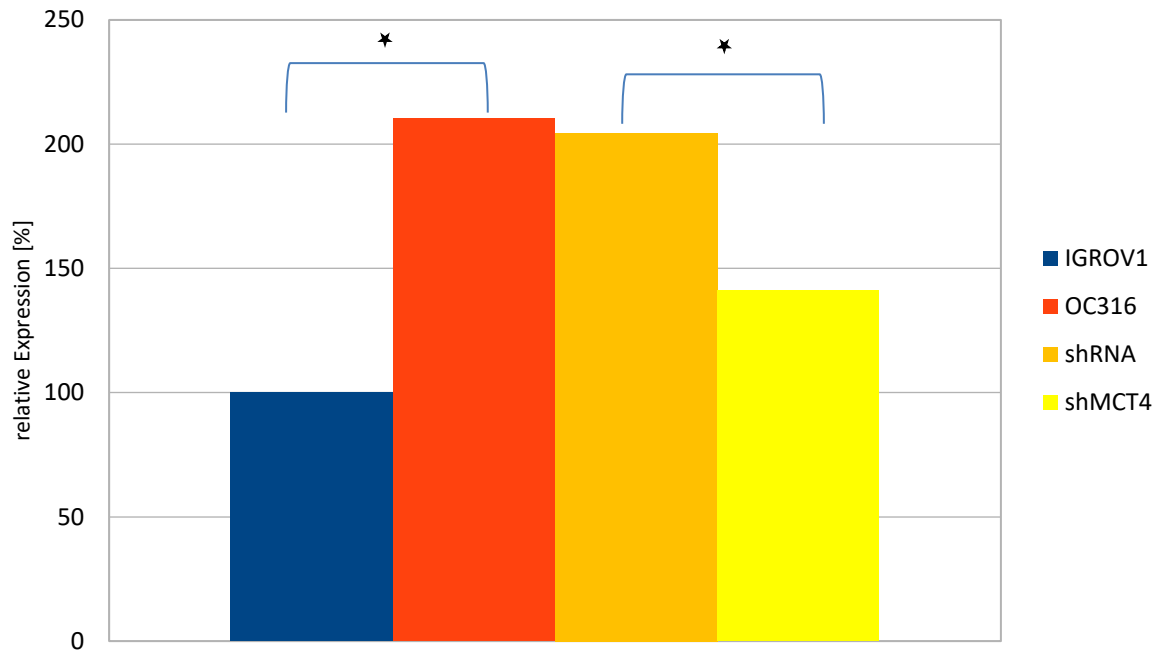


Abb. 37: Expression von MCT4 in den untersuchten Zelllinien.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Proteinexpressionen unter Definition der Werte von IGROV-1 als Referenz gleich 100 %. Die Daten entstammen einem einzigen Versuch, bei dem eine Fünffachbestimmung vorgenommen und in jedem der fünf korrespondierenden Zellspots jeweils fünf unterschiedliche Bereiche gemessen wurden (N=1, n=25).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die metabolischen Auswirkungen sowie der toxische Effekt einer Applikation des neuartigen spezifischen MCT1-Inhibitors AR-C155858 auf zwei native – darunter eine niedrigglykolytische sowie eine hochglykolytische – und zwei gentechnisch modifizierte Ovarialkarzinomzelllinien untersucht und zur Wirkung und Toxizität des etablierten unspezifischen MCT-Inhibitors α -CHC in Relation gesetzt. Anschließend erfolgte mittels immunhistochemischer Untersuchungen die Darstellung der unterschiedlichen Expressionen der relevantesten MCT-Isoformen 1 und 4 in den verwendeten Zelllinien, um eine fundierte Basis für die Analyse der unterschiedlichen Ergebnisse aus den metabolischen Untersuchungen zu schaffen.

Ogleich die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Zellkultur-Experimente größtenteils mithilfe kommerzieller Messkits sowie in der Arbeitsgruppe von Prof. Müller-Klieser fest etablierter Methoden durchgeführt wurden, werden im Folgenden die angewandten Methoden in der Reihenfolge ihrer Aufführung im Methodenteil kritisch betrachtet. Dabei wird sowohl auf die Auswahl und Qualität der Methoden als auch auf mögliche Fehlerquellen bei der Auswertung und Interpretation der Ergebnisse eingegangen. Anschließend werden die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen kritisch betrachtet und mit dem aktuellen Stand der Forschung in Bezug gesetzt. Im Speziellen werden die Resultate der metabolischen Untersuchungen den Toxizitätswerten und immunhistochemisch ermittelten MCT-Expressionsmustern gegenübergestellt, um darauf aufbauend das Potenzial einer spezifischen MCT1-Inhibition in der Krebstherapie erörtern zu können.

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Methoden der Zellkultur

Bei der Kultivierung der Zellen wurde auf etablierte Standardmethoden der Monolayer-Zellkultur adhärenter Zellen zurückgegriffen. Bei der Auswahl des Nährmediums wurde weitgehend den Empfehlungen der Erstbeschreiber der jeweiligen Zelllinien entsprochen (Bénard et al 1985, Alama et al 1996). Eine wesentliche Abweichung

bestand lediglich im Verzicht auf Antibiotika und Antimykotika zur Vermeidung von Resistenzbildungen. Dem Kulturmedium der gentechnisch modifizierten Zelllinien OC316 shRNA und OC316 MCT-4 wurde dem Protokoll entsprechend 0,5 µg/ml Puromycin zugegeben. Da im Vektor der transfizierten Zellen ein Resistenzgen gegen Puromycin enthalten war, konnte auf diese Weise eine Selektion von transfizierten und nicht-transfizierten Zellen erreicht werden.

Im Verlauf der Versuchsphase sind bakterielle Kontaminationen nur äußerst vereinzelt aufgetreten. In diesen Fällen wurden alle befallenen Kulturflaschen entsorgt. Zu keinem Zeitpunkt wurden Kontaminierungen durch Pilze festgestellt. Eine besondere Erschwernis im Rahmen von Zellkultur-Experimenten stellen mögliche Kontaminationen mit Mykoplasmen dar. Die Problematik besteht vor allem in dem Umstand, dass eine Kontamination lichtmikroskopisch nicht zu erkennen ist und darin, dass die Bakterien aufgrund ihrer geringen Größe nicht durch Sterifilter zurückgehalten werden können (Uphoff & Drexler 2013). Die zellwandlosen intra- und extrazellulär vorkommenden Prokaryonten können Stoffwechselaktivitäten von Zellen derart beeinflussen, dass entsprechende in-vitro-Messergebnisse unbrauchbar werden (Agarwal et al. 2013). Aus diesem Grund wurden regelmäßige Kontrollen eines möglichen Mykoplasmen-Befalls durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.4). Während der gesamten Versuchsphase blieben sämtliche Mykoplasmen-Kontrollen unauffällig.

5.1.2 Metabolische Untersuchungen

Zur Bestimmung der Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten der Ovarialkarzinomzellen unter Einfluss unterschiedlicher Hemmstoffkonzentrationen wurden die nach 24 Stunden ermittelten Änderungen der Glukose- bzw. Laktatkonzentrationen im Überstand mit der im jeweiligen Well gemessenen Zellzahl verrechnet. Die errechneten Werte wurden schließlich in der Einheit pmol/Zelle/h angegeben. Obgleich in Anbetracht des exponentiellen Zellwachstums eine Integrierung der Ausgangs- und End-Zellzahl für eine exakte Bestimmung der mittleren Zellzahl die Methode der Wahl gewesen wäre, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Mittelung der beiden Zellzahlen als ausreichend angesehen, da der Fokus nicht auf den absoluten Größen der Umsatzraten lag, sondern auf deren Änderung unter Hemmstoff-Einfluss. Minimale Schwankungen im Volumen des

Medienüberstands, auch etwa durch Verdunstung, können die Konzentration des jeweiligen Metabolits beeinflussen. Initial durchgeführte Kontrollmessungen zeigten jedoch keine signifikanten Schwankungen im Volumen des Medienüberstands. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine Messung und Berücksichtigung des Volumens des verbleibenden Kulturmediums verzichtet.

Der Rückschluss von Metabolitkonzentrationen im Überstand auf die Stoffwechselaktivität der Zellen beruht auf der Annahme einer Gleichgewichtslage zwischen intra- und extrazellulären Metabolitkonzentrationen. Dabei wird Glukose über erleichterte Diffusion mittels insulinunabhängiger Transporter, insbesondere GLUT-1, von der Zelle aufgenommen, während eine Abgabe von Glukose aus der Zelle ins extrazelluläre Milieu nicht anzunehmen ist (Fan et al. 2010, Müller-Klieser 2010). Zwar ist ein Ein- und Ausbau von membranständigen Glukosetransportern und eine sich daraus ergebende Beeinflussung der Transport- und damit auch der Umsatzraten denkbar, doch wäre dies als zellphysiologische Reaktion zu bewerten und demzufolge nicht als einschränkend auf die Validität der Ergebnisse. Das im Rahmen der Glykolyse intrazellulär entstehende Laktat diffundiert entlang des Konzentrationsgradienten über Monocarboxylat-Transporter im Symport mit H^+ -Ionen ins extrazelluläre Milieu (Halestrap & Price 1999). Auch hier ist, ähnlich wie bei den Glukosetransportern, eine zellphysiologische Reaktion in Form von Änderungen der Transporteigenschaften der MCT möglich, die die Validität der Ergebnisse aber ebenso wenig einschränkt. Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe (Mann 2012) sowie die eigenen Daten der Messzeitpunkte 2 und 4 Stunden nach Versuchsbeginn stellten jedoch eine hohe Gleichmäßigkeit der Umsatzraten im zeitlichen Verlauf fest und sprechen gegen signifikante Änderungen der Transportraten während der Versuche (vgl. Abb. 38).

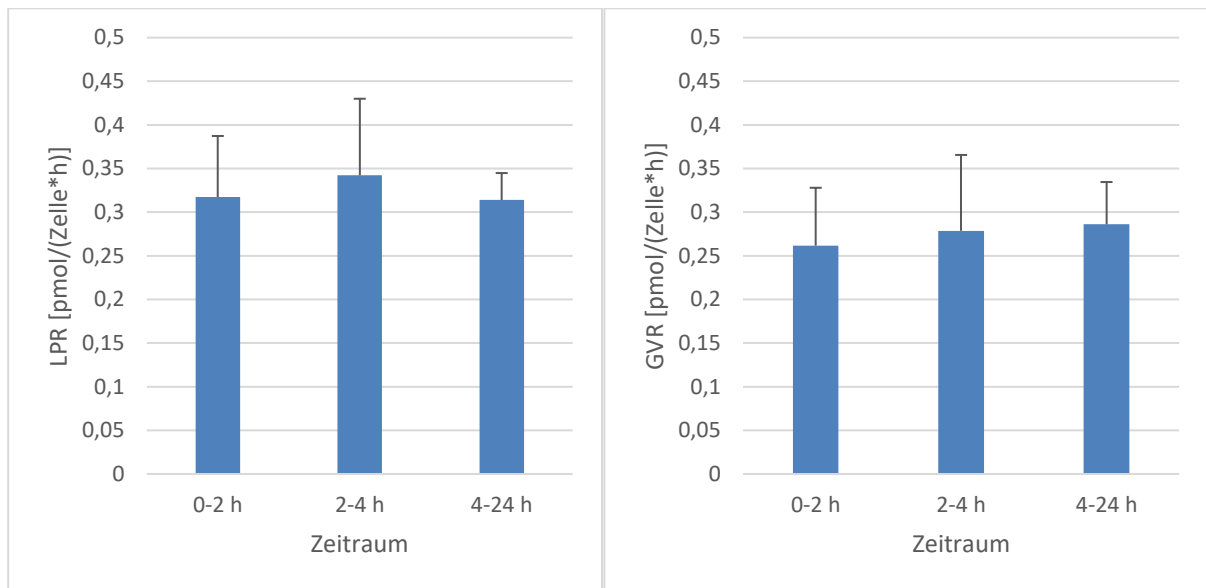


Abbildung 38: Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsrate im Verlauf über 24 Stunden. Beispielhaft dargestellt sind die Daten für IGROV-1 unter Einfluss von 30 mM α -CHC. Kategoriale Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit Dreifachbestimmung (N=3, n=3).

Die Genauigkeit der ermittelten metabolischen Umsatzraten ist in höchstem Maße abhängig von der Präzision der Messungen der Glukose- und Laktatkonzentrationen in den Überständen sowie der Zellzahlbestimmungen. Die am Super GL-2 Analysator durchgeführten Messungen der Metabolitkonzentrationen beruhen auf enzymatischen Reaktionen, im Rahmen derer bei Vorhandensein von Glukose oder Laktat Wasserstoffperoxid anfällt. Die Oxidation des Letzteren erzeugt einen elektrischen Strom, dessen Stärke proportional ist zum Glukose- bzw. Laktatgehalt in der Probe, weshalb seine Messung die Bestimmung letzterer ermöglicht. Die Methode wurde in der Arbeitsgruppe in den vergangenen Jahren unter anderem von Binz (2012) als Alternative zur photometrischen Bestimmung von Metabolitkonzentrationen in Überständen etabliert. Im Vergleich zu diesen Verfahren erfordert die amperometrische Analyse einen deutlich geringeren Zeit- und Materialaufwand, was angesichts der ohnehin recht aufwendigen Versuchsdurchführung mit Medienentnahme und Zellzählung eine erhebliche methodische Erleichterung darstellt und zudem die menschlichen Fehlerquellen reduziert. Ergänzend zu den automatischen Kalibrierungen des Analysators wurden eigene Kalibrierungen vorgenommen, für die mithilfe einer Analysenwaage Maßlösungen hergestellt wurden. Die Kalibrierungen zeigten jeweils einen großen linearen Bereich und durchgängig hohe Korrelationskoeffizienten von über 0,90, was als Nachweis einer hohen Präzision

ausgelegt und weshalb auf den Einsatz kommerzieller Eichlösungen verzichtet wurde. Mögliche Fehlerquellen waren neben maschinellen Ungenauigkeiten insbesondere Ungenauigkeiten im Rahmen des Pipettierens der entsprechenden Hemmstoffverdünnungen sowie im Zuge der Zellzahlbestimmungen ein möglicherweise unvollständiges Ablösen der adhärennten Zellen von der Oberfläche der Kulturflaschen. Gegen ein relevantes Ausmaß der genannten Fehlerquellen und für eine hohe Genauigkeit der erfassten Messdaten spricht jedoch die gute Reproduzierbarkeit, die sich aus den im Vergleich zu den Absolutwerten der Mittelwerte geringen Standardabweichungen ableiten lässt (vgl. Tab. 10 - 15 im Anhang).

Der Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 stellt einen eleganten, nicht-invasiven und zuverlässigen Weg zur Analyse des Stoffwechsels lebender Zellen dar. Aufgrund der Möglichkeiten repetitiver Messungen von Zellpopulationen und der Aufzeichnung von Stoffwechsel-Kinetiken eignete sich das Gerät optimal zur Validierung und Ergänzung der am Super GL-2 Analysator detektierten metabolischen Parameter im Sinne einer Darstellung eines breiteren Stoffwechselprofils. Dies geschah in Form einer Aufzeichnung der extrazellulären Azidifizierungsrate (ECAR) und der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR), welche in Abschnitt 5.2.1 im Zusammenhang mit den Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten diskutiert werden. Für die am Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 durchgeführten Untersuchungen gelten hinsichtlich der Verdunstungsaspekte während der Inkubationszeit die gleichen Überlegungen wie für die Analysen am Super GL-2 Analysator. Das Messverfahren basiert auf Sauerstoff- bzw. H^+ -Ionen-spezifischen Fluorophoren, deren Fluoreszenz-Signale in Anwesenheit des entsprechenden Analyten eine Abschwächung erfahren. Auf diese Weise können Änderungen der Sauerstoff- und H^+ -Ionen-Konzentration im Kulturmedium detektiert und Rückschlüsse auf den Status des oxidativen und glykolytischen Energiemetabolismus der Zellen gewonnen werden. Auch im Rahmen der Analysen am Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 sind Änderungen der Membrantranslokation von am Energiemetabolismus beteiligten Transportproteinen wie dem GLUT-1 als Reaktion auf die Injektion der MCT-Hemmstoffe denkbar. Doch ebenso wie bei den Messungen am Super GL-2 Analysator wären diese als zellphysiologische Reaktionen zu interpretieren und die dadurch erzeugten Auswirkungen auf die Messergebnisse als nicht einschränkend auf die Validität der

Resultate.

Angehts des nie gänzlich gleichmäßigen Zellwachstums sowie möglicher Ungenauigkeiten bei der Aussaat der Zellen in die einzelnen Wells wurde eine Normalisierung der gemessenen Werte auf die jeweilige Zellzahl angestrebt. Der Versuch einer solchen Normalisierung unter Verwendung eines Janusgrün-B-basierten Färbeverfahrens lieferte mehrfach keine verwertbaren Ergebnisse. Die im Vergleich zur absoluten Größe der Mittelwerte geringen Standardabweichungen zeigen jedoch eine gute Reproduzierbarkeit der erhaltenen ECAR- und OCR-Werte an und sprechen für eine hohe Präzision des Messverfahrens und somit für eine trotz fehlender Normalisierung nicht entscheidend eingeschränkte Validität der Ergebnisse (vgl. Tab. 16 - 21 im Anhang). Zudem war für die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit nicht die absolute Größe der Stoffwechselfparameter pro Zelle, sondern deren Änderung unter dem Einfluss verschiedener Hemmstoffe von zentralem Interesse. Darüber hinaus vergingen zwischen der Injektion des ersten Hemmstoff-enthaltenden Ports bis zum letzten Messvorgang weniger als drei Stunden, sodass die beobachteten Auswirkungen der Hemmstoff-Applikation tatsächlich zum größten Teil auf deren Effekt auf den Energiemetabolismus der Zellen und nur zu einem sehr geringen Teil auf eine verlangsamte Zellproliferation zurückzuführen sein dürften.

5.1.3 Toxizitätsmessungen

Mithilfe von XTT-Assays wurde die Toxizität der verwendeten MCT-Inhibitoren auf die untersuchten Zelllinien analysiert. Das Messverfahren basiert auf einer nur von vitalen Zellen durchführbaren Reduktion von XTT-Molekülen, die mit einem Farbumschlag einhergeht. Dessen Ausmaß kann anschließend gemessen werden und lässt Rückschlüsse auf den Anteil der (über-)lebenden Zellen und damit auf die Toxizität des Hemmstoffs zu.

Götze (2008) konnte zeigen, dass das XTT-Assay bei der Bestimmung der Zellvitalität eine hohe Übereinstimmung mit dem Koloniebildungstest zeigt, der als Standardmethode zur Detektion des Zellüberlebens gilt (Hall & Giaccia 2005). Lediglich bei einer Reduktion der Anzahl der überlebenden Zellen auf weniger als 10% des Niveaus der unbehandelten Kontrollzellen wurde eine eingeschränkte Sensitivität des XTT-Verfahrens festgestellt. Da eine derartig starke Reduktion in den Messdaten

der vorliegenden Arbeit jedoch zu keinem Zeitpunkt detektiert wurde, ist hier von einer ausreichenden Validität der Ergebnisse auszugehen, was zusätzlich von den in Relation zur Größe der Messwerte bzw. der daraus errechneten Vitalitätsminderungen geringen Standardabweichungen unterstützt wird.

5.1.4 Immunhistologische Fluoreszenzanalyse

Zur Darstellung der unterschiedlichen Expressionsmuster der beiden MCT-Isoformen 1 und 4 in den verwendeten Zelllinien wurde eine indirekte immunhistologische Fluoreszenzanalyse durchgeführt. Diese basiert auf dem Einsatz eines für das Zielprotein spezifischen Primärantikörpers sowie eines Sekundärantikörpers, der seinerseits spezifisch an den Primärantikörper bindet und mit einem Fluorochrom versehen ist. Letzterer absorbiert Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittiert einen Teil des absorbierten Lichts wieder in Form langwelliger Strahlung, die unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops sowie eines geeigneten Bildbearbeitungsprogramms quantifiziert werden.

Das Verfahren bietet dank der verwendeten flexiPERM® Silikonaufsätze die Möglichkeit, die Oberfläche eines einzelnen Objektträgers in zwölf Kompartimente zu unterteilen. Die Methode stellt daher einen eleganten Weg dar, die Expression verschiedener Proteine im Vergleich zwischen mehreren Zelllinien zu untersuchen und war daher in der vorliegenden Arbeit gut zur Bestimmung der MCT-1- und MCT-4-Expression in den vier verwendeten Zelllinien geeignet.

Eine wesentliche mögliche Fehlerquelle besteht in der individuell unterschiedlichen subjektiven Wahrnehmung der Farbtintensität bei der Bestimmung der Belichtungszeit, die noch zusätzlich durch variierende Lichtverhältnisse bei verschiedenen Messungen verfälscht werden kann. Darüber hinaus verblasen die Fluoreszenzintensitäten mit der Zeit. Um diesem Vorgang Rechnung zu tragen und das Abblassen bei allen Objektträgern auf ein vergleichbares, minimales Ausmaß zu reduzieren, fand die Bildgebung standardisiert 24 Stunden nach der Färbung statt. Zudem wurden sämtliche Arbeiten im Rahmen der immunhistologischen Fluoreszenzanalyse in einem ganztägig abgedunkelten Raum durchgeführt.

Aufgrund der Verwendung einzelner Objektträger für jede Zelllinie konnten für jede Kombination aus Zelllinie und MCT-Isoform jeweils fünf Zellspots bearbeitet

werden. Aus der Analyse von fünf Bildbereichen pro Zellspot resultierte folglich eine Probenzahl von $n = 25$. Die sich unter anderem aus der Probenzahl ergebenden Standardabweichungen waren im Vergleich zu den absoluten Größen der Messwerte ausreichend gering, um eine hohe Reproduzierbarkeit feststellen zu können. Aus diesem Grund wurde, obgleich das Verfahren aufgrund der oben dargestellten Fehlerquellen eher als semi-quantitativ zu bewerten ist, die Durchführung alternativer Methoden zur quantitativen Proteinbestimmung, wie z.B. des Western Blot oder des In-Cell Western, für die vorliegende Arbeit als verzichtbar erachtet. Im Vergleich zum Western Blot bietet die Fluoreszenzanalyse zudem ohnehin den Vorteil, dass keine Proteinextraktion notwendig ist, die zusätzliche methodische Fehlerquellen mit sich bringt, sowie die Möglichkeit einer Betrachtung der räumlichen Verteilung der Anfärbung. So zeigte sich jeweils eine randständige Intensivierung der Fluoreszenz, was mit der membranständigen Lokalisation der MCT vereinbar ist.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit lag im Wesentlichen in der Untersuchung des hemmenden Einflusses des spezifischen MCT1-Inhibitors AR-C155858 auf den Stoffwechsel von Ovarialkarzinomzelllinien im Vergleich zum unspezifischen MCT-Hemmstoff α -CHC. Im Anschluss wurden die von den Hemmstoffen auf die Zellen ausgeübte Toxizität quantifiziert und schließlich die Expression der beiden wichtigsten MCT-Isoformen 1 und 4 unter den verwendeten Zelllinien bestimmt, um eine fundierte Grundlage für die Diskussion der Erkenntnisse aus den Stoffwechseluntersuchungen zu erhalten.

Es wurden zunächst Konzentrationen der beiden Inhibitoren ermittelt, die auf den Glukosemetabolismus der zu untersuchenden Zelllinien einen vergleichbar starken Effekt ausüben. Diese Effekte wurden anschließend mittels zweier analytischer Verfahren in Form von Glukoseverbrauchs-, Laktatproduktions-, Sauerstoffverbrauchs- und Azidifizierungsraten quantifiziert. Dabei lag der Fokus in erster Linie nicht auf den absoluten Werten der genannten metabolischen Parameter, sondern auf deren Entwicklung unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen

der MCT-Hemmstoffe. Im Anschluss wurde die toxische Wirkung der Applikation ebendieser Konzentrationen auf die unterschiedlichen Zelllinien detektiert. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass ein möglicher Mehrwert des neuartigen MCT-Inhibitors AR-C155858 hinsichtlich seiner metabolischen Hemmwirkung durch eine hohe Toxizität erkauft wird. Im letzten Schritt wurde mittels immunhistologischer Fluoreszenzanalyse die Expression der beiden relevantesten MCT-Isoformen 1 und 4 unter den verwendeten Zelllinien illustriert, um Rückschlüsse auf den Zusammenhang der zuvor beobachteten Ergebnisse mit dem MCT-Expressionsmuster der Zellen ziehen zu können.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsreihen unter Darlegung möglicher Erklärungen für die gemachten Beobachtungen erläutert und diese anschließend kritisch hinterfragt. Nachdem in Kapitel 5.1 der Fokus auf die Validität der Messverfahren gelegt wurde, soll nun die Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung folgen.

5.2.1 Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsraten

Die basale Laktatproduktionsrate (Kontrollzellen) von IGROV-1 betrug im 24-Stunden-Mittel $0,69 \pm 0,04$ pmol/Zelle*h (berechnet aus allen entsprechenden Daten sowohl der α -CHC- als auch der AR-C155858-Versuche, $n=18$). Dieser Wert liegt deutlich unter den $0,94 \pm 0,23$ pmol/Zelle*h, die in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ermittelt wurden (Fabian 2013). Im Hinblick auf OC316 lieferte die vorliegende Arbeit mit $1,04 \pm 0,05$ pmol/Zelle*h (ebenfalls berechnet aus den Versuchen mit beiden Hemmstoffen, $n=18$) keinen signifikanten Unterschied zur Vorarbeit mit $1,22 \pm 0,48$ pmol/Zelle*h, wobei dies vor allem auf die dort angegebene sehr hohe Standardabweichung zurückzuführen ist. Somit konnte in Übereinstimmung zur Vorarbeit eine signifikant höhere Laktatproduktionsrate für OC316 als für IGROV-1 nachgewiesen werden. Ein Grund für die Diskrepanz im Fall der IGROV-1-Zellen könnte darin liegen, dass in der zitierten Arbeit nur ein Zeitraum von sechs Stunden untersucht wurde und es im Zeitraum zwischen sechs und 24 Stunden zu einer Sättigung der Laktatproduktion mit negativer Rückkopplung oder einem Mangel an Glukose als Nährstoff für die laktatproduzierende Glykolyse gekommen sein könnte. Gegen diese Erklärung spricht

jedoch, dass sowohl in der vorliegenden Arbeit (vgl. Abb. 32) als auch in Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe (Mann 2012) eine hohe Gleichmäßigkeit der Umsatzraten im Verlauf von 24 Stunden festgestellt werden konnte, und dies bei identischer Zusammensetzung des Kulturmediums und ähnlicher Konfluenz zu Versuchsbeginn.

An dieser Stelle sei jedoch darauf hingewiesen, dass für die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit weniger die absoluten Größen der metabolischen Parameter als vielmehr deren Reaktion auf die Applikation der MCT-Hemmstoffe von Bedeutung ist. Deren Betrachtung zeigt, dass die Zugabe von 30 mM α -CHC die Laktatproduktionsrate von IGROV-1 ebenso in etwa halbiert wie die Applikation von 300 nM AR-C155858. OC316-Zellen reagierten auf die Applikation von 30 mM α -CHC ebenfalls mit einer Halbierung der Rate, hier entfaltete 1 μ M AR-C155858 einen vergleichbar starken Effekt (vgl. Abb. 1). Aus diesen Werten wird zunächst ersichtlich, dass zur Ausübung einer äquivalenten Hemmwirkung eine um bis zu fünf Dimensionen geringere Konzentration an AR-C155858 benötigt wurde als an α -CHC. Die Gründe für diese Beobachtung lassen sich am ehesten in einer höheren Affinität des neuartigen spezifischen MCT1-Hemmstoffs suchen (vgl. 2.3.3). Darüber hinaus fällt auf, dass zur Halbierung der Laktatproduktion von OC316 im Vergleich zu IGROV-1 erheblich mehr AR-C155858 benötigt wird, während im Falle des α -CHC gleiche Konzentrationen auch vergleichbare Effekte hervorrufen. Dies geht konform mit der in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe (Fabian 2013) beschriebenen und in der vorliegenden Arbeit bestätigten stärkeren MCT4-Expression von OC316 und der Spezifität von AR-C155858 für MCT1: OC316 können die Inhibierung ihrer MCT1-Transporter durch das vermehrte Vorhandensein von MCT4-Proteinen, die vom Hemmstoff nicht tangiert werden, in gewissem Maße kompensieren; ein Effekt, der im Falle des α -CHC aufgrund dessen mangelnder Spezifität nicht zum Tragen kommt.

Die basale Glukoseverbrauchsrate (Kontrollzellen) von IGROV-1 lag bei $0,61 \pm 0,04$ pmol/Zelle*h, die von OC316 $0,73 \pm 0,03$ pmol/Zelle*h (wiederum jeweils berechnet aus allen entsprechenden Daten sowohl der α -CHC- als auch der AR-C155858-Versuche, n=18). Ein Vergleich mit den Werten aus der Vorarbeit von Fabian (2013) ist aufgrund der dort ermittelten sehr hohen Standardabweichungen kaum sinnvoll durchführbar. Analog zu den Beobachtungen zur Laktatproduktionsrate riefen 30 mM α -CHC auch auf die Glukoseverbrauchsrate einen vergleichbar starken hemmenden Effekt im Bereich um 50 % auf IGROV-1 hervor wie 300 nM AR-C155858. Ähnliche Ergebnisse konnten für OC316 mit 30 mM α -CHC sowie 1 μ M AR-C155858

bestimmt werden. Hinsichtlich der eingesetzten Konzentrationen der beiden Inhibitoren gelten deshalb die gleichen Überlegungen wie im vorherigen Absatz am Beispiel der Laktatproduktionsraten erläutert.

Aus den ermittelten Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsdaten lässt sich der Laktat/Glukose-Quotient ermitteln. Dieser dient als Mittel zur theoretischen Abschätzung der glykolytischen Aktivität. Ein Quotient von 2 würde bedeuten, dass sämtliche Glukosemoleküle in Laktat umgewandelt werden. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die basalen und unter Hemmstoffeinfluss ermittelten Stoffwechselraten von IGROV-1 und OC316 und die daraus errechneten Laktat/Glukose-Quotienten. Dabei ist zunächst festzustellen, dass IGROV-1 im Hinblick auf die basalen Werte vor Hemmstoff-Applikation einen deutlich geringeren Quotienten als OC316 aufweist, was der unterschiedlichen Charakterisierung der beiden Zelllinien als niedrig- bzw. hochglykolytisch entspricht. Unter Einfluss der beiden Hemmstoffe lassen sich weitestgehend keine deutlichen Veränderungen hinsichtlich des Quotienten beobachten. Dies entspricht angesichts der oben dargestellten Halbierungen sowohl der Laktatproduktions- als auch der Glukoseverbrauchsdaten den Erwartungen. Lediglich der Quotient von OC316 zeigt unter 1 μ M AR-C155858 eine leichte Aufwärtstendenz. Dies ist insofern erstaunlich, als dass unter Hemmung des Laktat-Exports eher eine Verminderung des Quotienten zu erwarten wäre als Ausdruck einer Umstellung des Energiemetabolismus der Zellen hin zu oxidativen Pfaden. Im Klartext erschiene also eigentlich eine prozentual stärkere Reduktion der Laktatproduktionsraten als der Glukoseverbrauchsdaten mit dem Ergebnis eines verminderten Laktat/Glukose-Quotienten plausibel. Ein möglicher Erklärungsansatz

Tab. 9: Übersicht über die Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsdaten von IGROV-1 und OC316 mit daraus folgenden Laktat/Glukose-Quotienten.

	Kein Hemmstoff		30 mM α -CHC		300 nM AR-C155858	1 μ M AR-C155858
	IGROV-1	OC316	IGROV-1	OC316	IGROV-1	OC316
LPR [pmol/Zelle*h]	0,69	1,03	0,35	0,49	0,32	0,53
GVR [pmol/Zelle*h]	0,61	0,73	0,30	0,35	0,29	0,34
L/G	1,13	1,41	1,19	1,40	1,11	1,55

für die detektierte Diskrepanz liegt darin, dass die dargestellten Ergebnisse nur den Zeitraum der ersten 24 Stunden nach Hemmstoff-Applikation darstellen. Durch die Hemmung des Laktat-Exports kommt es zu einer intrazellulären Ansäuerung, die vielfältige Stoffwechselwege, darunter auch solche der oxidativen Energiegewinnung, verlangsamt, also gewissermaßen als „Universalbremse“ fungiert. Der reaktiv eingeleitete metabolische Shift hin zur oxidativen Phosphorylierung nimmt eine gewisse Zeit in Anspruch und könnte dementsprechend erst nach mehr als 24 Stunden so stark ausgeprägt sein, dass er zu einer signifikanten Verminderung des Quotienten führt. Darüber hinaus sind einige generelle Umstände zu nennen, die die Aussagekraft des Laktat/Glukose-Quotienten einschränken. Diese bestehen vor allem darin, dass Glukose nicht nur in der Glykolyse zur Energiegewinnung genutzt wird, sondern auch im Pentosephosphatweg für Biosynthesen, sowie in der Anmerkung, dass Laktat auch über den Zwischenschritt Pyruvat aus Aminosäuren wie Alanin und Cystein entstehen kann (DeBerardinis et al. 2008, Vander Heiden et al. 2009).

Die basale Laktatproduktionsrate der gentechnisch modifizierten OC316-Linie shRNA betrug $1,03 \pm 0,07$ pmol/Zelle*h, die von OC316 shMCT4 $1,10 \pm 0,04$ pmol/Zelle*h pmol/Zelle*h. Beide liegen damit im Bereich der detektierten Raten der nativen OC316-Zellen. Die Applikation von $1 \mu\text{M}$ AR-C155858 führt bei beiden Zelllinien wiederum zu einer deutlichen Reduktion der Rate, die für shRNA mit $50,16 \pm 5,87$ % vergleichbar stark ausfällt wie bei den nativen OC316. shMCT4 hingegen verzeichnen eine Verminderung um $66,8 \pm 3,95$ %. Die größere Suszeptibilität dieser Zelllinie gegenüber einer spezifischen MCT1-Inhibition lässt sich damit erklären, dass durch den MCT4-Knockout weniger Transporter dieser Isoform zur Verfügung stehen, die kurzfristig die Funktion der blockierten MCT1-Moleküle übernehmen können.

Die basale Glukoseverbrauchsrate von shRNA lag bei $0,74 \pm 0,05$ pmol/Zelle*h, die von shMCT4 bei $0,69 \pm 0,04$ pmol/Zelle*h. Erneut liegen diese Werte im Bereich derer der nativen OC316 Zellen. Offenbar hat der Knockdown eines Teils der MCT4-Expression – das Ausmaß wird in Kap. 3.5 beschrieben und in 4.3 diskutiert – also (bislang) nicht zu einer detektierbaren Umstellung des Energiestoffwechsels zugunsten der oxidativen Phosphorylierung geführt. Die erhöhte Suszeptibilität von shMCT4 gegenüber einer MCT1-Hemmung wird jedoch auch bei Betrachtung der Änderung des Glukoseverbrauchs unter Einfluss von AR-C155858 deutlich: Diese fällt für shMCT4 ($60,80 \pm 4,00$ %) signifikant höher aus als für shRNA ($47,12 \pm 5,80$ %).

5.2.2 Sauerstoffverbrauchs- und Azidifizierungsraten

Die basale OCR von IGROV-1 lag (berechnet aus allen entsprechenden Daten sowohl der α -CHC- als auch der AR-C155858-Versuche, $n=21$) bei $139,54 \pm 5,30$ pmol O_2 /min und damit etwa im Bereich der Werte einer Vorarbeit aus der Arbeitsgruppe (Fabian 2013). Für OC316 wurde ein Wert von $203,01 \pm 6,67$ pmol O_2 /min ermittelt ($n=21$), welcher deutlich unterhalb der Daten aus der Vorarbeit liegt. Die basalen ECAR betragen (ebenfalls berechnet aus den Versuchen mit beiden Hemmstoffen, $n=21$) $24,20 \pm 0,67$ mpH/min für IGROV-1 sowie $49,51 \pm 2,01$ mpH/min für OC316 und lagen damit jeweils etwa im Bereich der Werte der Vorarbeit. Somit konnte auch hier, analog zu den Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsdaten, eine signifikant höhere Glukosestoffwechselaktivität für OC316 als für IGROV-1 nachgewiesen werden. Als mögliche Erklärung für die beobachtete Diskrepanz bezüglich der OCR von OC316 lässt sich die in der vorliegenden Arbeit geringere Anzahl an Wiederholungen des Messvorgangs im ansonsten nahezu identischen Versuchsprotokoll ausmachen. Dagegen spricht jedoch, dass im zeitlichen Verlauf der einzelnen Versuche keine deutliche Aufwärtstendenz der Messwerte im Zeitraum bis zur Injektion des Inhalts des ersten Ports zu beobachten war, wie Abb. 39 beispielhaft verdeutlicht. Noch stärkere Evidenz gegen diesen Erklärungsansatz liefert die Betrachtung der Werte mitgeführter unbehandelter Kontrollzellen, deren Ports lediglich Medium enthielten. Diese blieben bei allen Versuchen über die komplette Versuchsdauer weitestgehend konstant, wie ebenfalls in Abb. 39 beispielhaft dargestellt. Die plausibelste Erklärung liegt deshalb in Unterschieden hinsichtlich der Zellzahl, die sich bei der Aussaat und der anschließenden Kultivierung bis zur Messung ergeben können. Das Fehlen einer Normalisierung mit Janusgrün-B in der vorliegenden Arbeit kann nicht verantwortlich gemacht werden, da eine solche lediglich die Schwankungen zwischen den einzelnen Zellkammern nivelliert und keinen nennenswerten Einfluss auf die absolute Größe der gemittelten Werte ausübt. Ausschließlich eine Messung der Zellzahl und anschließende Verrechnung derselben mit den gemessenen OCR- und ECAR-Werten hätte eine echte Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Arbeiten ermöglichen können, eine solche wurde jedoch auch in der Vorarbeit nicht durchgeführt.

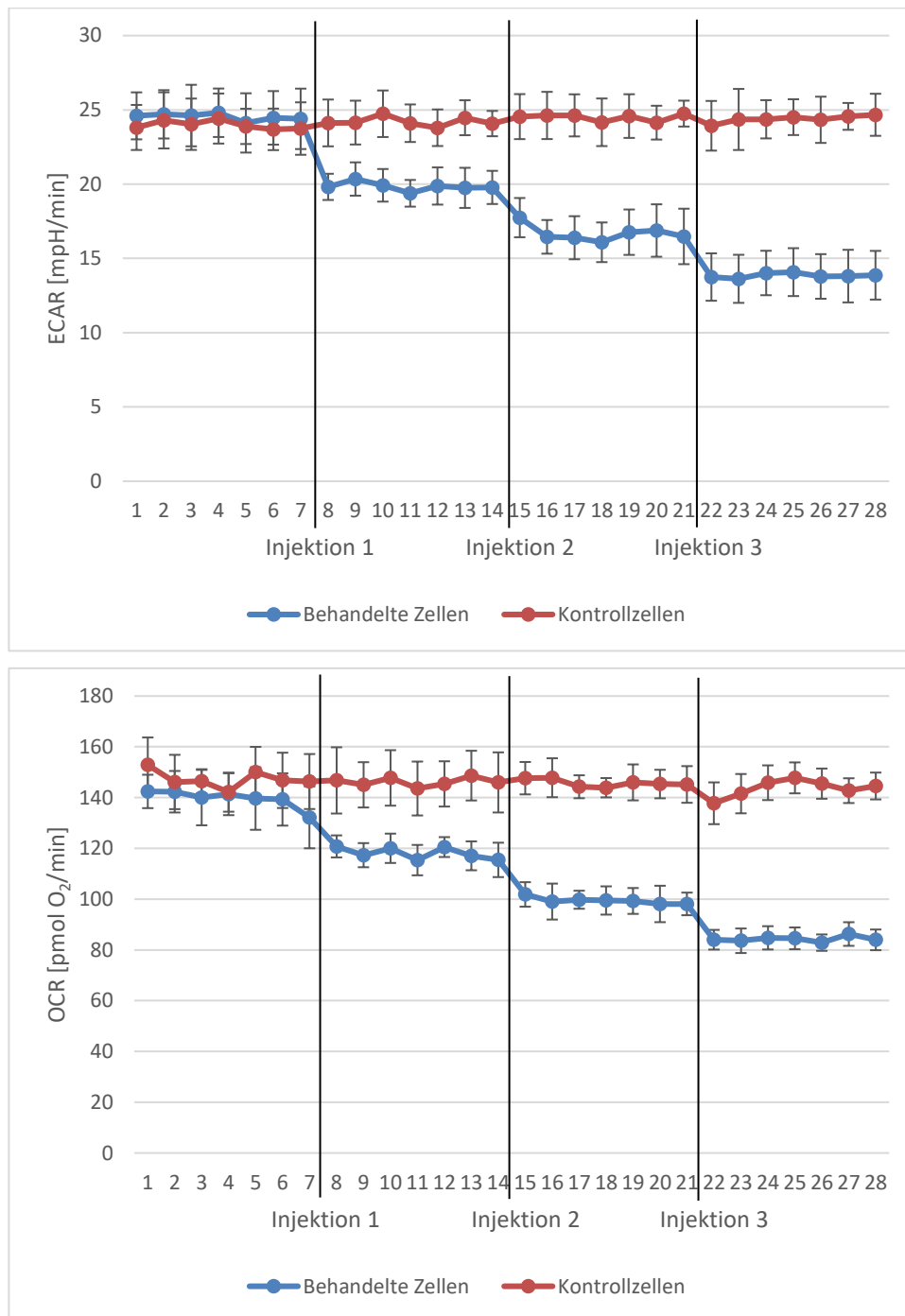


Abb. 39: Verlauf der Azidifizierungs- und Sauerstoffverbrauchsraten.

Die Graphik zeigt beispielhaft die Werte für IGROV-1 unter Einfluss von AR-C155858. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit Fünffach-Bestimmung (N=3, n=5).

In diesem Zusammenhang sei zudem erneut darauf hingewiesen, dass für die vorliegende Arbeit die Entwicklung der Stoffwechselraten unter MCT-Hemmstoff-Einfluss von größerer Bedeutung ist als die absoluten Größen derselbigen. Die OCR von IGROV-1 erfuhr durch die Applikation von 30 mM α -CHC eine vergleichbar starke

Reduktion im Bereich um 40 % wie durch 300 nM AR-C155858. Auch OC316 reagierten auf 30 mM α -CHC bzw. 1 μ M AR-C155858 jeweils mit einer Minderung der OCR um etwa 40 %. Analog dazu erfuhren auch die ECAR von IGROV-1 durch die Applikation von 30 mM α -CHC bzw. 300 nM AR-C155858 und diejenigen von OCR316 auf 30 mM α -CHC bzw. 1 μ M AR-C155858 eine Reduktion um etwa 40 %. Es wird also deutlich, dass analog zu den Beobachtungen bei den Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten die gewählten Hemmstoffkonzentrationen vergleichbar starke inhibitorische Effekte auf beide Zelllinien erzielten. Für die Unterschiede hinsichtlich der dazu benötigten Konzentrationen lassen sich die gleichen Erläuterungen wie oben geltend machen, nämlich im Wesentlichen eine höhere Substrat-Affinität von AR-C155858 und eine durch die stärkere MCT4-Expression bedingte höhere Resilienz von OC316 gegenüber einer spezifischen MCT1-Hemmung.

Die basale ECAR der gentechnisch modifizierten OC316-Zelllinien shRNA und shMCT4 lag jeweils etwa im Bereich der Werte der nativen OC316-Zellen. Während dies für shRNA den Erwartungen entspricht, wäre für shMCT4 eher mit einer Verminderung der ECAR zu rechnen gewesen als Ausdruck der durch den MCT4-Knockdown eingeschränkten Protonenexportkapazitäten. Im Gegenteil lag der Wert von shMCT4 tendenziell sogar leicht über dem von OC316, obgleich dieser Unterschied nicht signifikant ist. Die basale OCR von shRNA war signifikant kleiner und die von shMCT4 signifikant größer als die der nativen OC316. Die Erhöhung bei shMCT4 kann als Ausdruck einer Verschiebung des zellulären Energiestoffwechsels zugunsten der oxidativen Phosphorylierung interpretiert werden, wenngleich die fehlenden Änderungen des Laktat/Glukose-Quotienten (s.o.) und der ECAR gegen derartige Umstellungsvorgänge sprechen. Deshalb und insbesondere im Hinblick auf die unerwarteterweise verminderte OCR von shRNA sollte jedoch erneut betont werden, dass die absoluten Größen der am Extracellular Flux Analyzer XF 24/3 bestimmten Parameter aufgrund der nicht gemessenen Zellzahl nur mit eingeschränkter Aussagekraft zu interpretieren sind und für die vorliegende Arbeit von untergeordneter Bedeutung sind. Interessant sind hingegen vor allem die Änderungen der Parameter nach Hemmstoff-Applikation: Hier zeigt sich, dass AR-C155858 hinsichtlich ECAR und OCR einen vergleichbar starken inhibitorischen Einfluss auf shRNA wie auf native OC316 ausübt, was den Erwartungen entspricht. shMCT4 erfahren hingegen durch die gleiche Konzentration des spezifischen MCT1-Inhibitors

eine erheblich stärkere Hemmung ihres Stoffwechsels, was sich in signifikant größeren Änderungen ihrer ECAR und OCR widerspiegelt. Diese Beobachtungen sind analog zu jenen zur Änderung der Laktatproduktions- und Glukoseverbrauchsrate und lassen sich gleichermaßen mit der durch den MCT4-Knockdown eingeschränkten Kompensationsfähigkeit einer MCT1-Blockade erklären.

5.2.3 Toxizität

Sämtliche verwendeten Konzentrationen an α -CHC und AR-C155858 übten auf alle untersuchten Zelllinien einen toxischen Effekt aus. Nach Herausrechnung des dem Lösungsmedium DMSO zurechenbaren Anteils ergaben sich bei allen Zelllinien erheblich größere toxische Einflüsse durch die Applikation von α -CHC als durch die von AR-C155858. Bei den Toxizitätsmessungen wurden die gleichen Konzentrationen an Hemmstoffen appliziert, die auch bei den metabolischen Experimenten Verwendung gefunden hatten und welche dort jeweils zu äquivalent starken Einschränkungen des Glukosestoffwechsels geführt hatten. Folglich kann die Aussage getroffen werden, dass AR-C155858 in Konzentrationen, die eine ebenso starke Hemmwirkung auf die verwendeten Zelllinien ausübten wie deutlich höhere α -CHC-Konzentrationen, erheblich weniger toxisch ist als die Vergleichssubstanz in ebendiesen Konzentrationen.

Die ermittelten Toxizitäten schränken insofern die Aussagekraft der Resultate des EF Analyzer 24/3 ein, als dass sich nicht gänzlich nachvollziehen lässt, wie groß der Anteil der toxischen Komponente an der Verminderung der ECAR und OCR durch α -CHC ist, also inwiefern diese Reduktion tatsächlich auf die Stoffwechselinhibitorische Wirkung des Hemmstoffs und nicht auf ein Absterben der Zellen zurückzuführen ist. Dazu wäre die Verrechnung mit der exakten Zellzahl vonnöten gewesen. Nicht beschnitten wird hingegen die oben angesprochene und zu den zentralen Aussagen der vorliegenden Arbeit zählende Feststellung, dass AR-C155858 auf die untersuchten Zelllinien schon in deutlich geringeren Konzentrationen eine ebenso starke inhibitorische Wirkung wie α -CHC bei erheblich geringerer toxischer Wirkung entfaltet. Im Gegenteil wird diese Feststellung sogar noch untermauert durch die Annahme, dass die detektierten Verminderungen von Stoffwechselfparametern

durch α -CHC zu einem beachtlichen Anteil auf dessen toxischem Einfluss gründen, sodass die Feststellung sogar noch insofern erweitert werden kann, dass von einer *mindestens* ebenso starken inhibitorischen Wirkung auszugehen ist.

5.2.4 MCT-Expressionsmuster

OC316 wiesen eine um etwa 40 % höhere Expression an MCT1 auf als IGROV-1. Diese Beobachtung entspricht der in einer Vorarbeit aus der Arbeitsgruppe (Fabian 2013) beschriebenen Tendenz, mit dem Unterschied, dass in der vorliegenden Arbeit eine Signifikanz festgestellt werden konnte. Auch im Hinblick auf die Expression von MCT4 bestätigen die Resultate jene aus der Vorarbeit: Hier ließ sich für OC316 eine etwa doppelt so hohe Expression des Proteins nachweisen.

Die Expression der beiden MCT-Isoformen in shRNA entsprach erwartungsgemäß jener der nativen OC316-Zellen. Das gleiche gilt für die MCT1-Expression von shMCT4, während MCT4 in dieser Zelllinie um etwa ein Drittel weniger stark exprimiert war als in OC316. Diese Differenz quantifiziert den durch genetische Manipulation erzeugten MCT4-Knockdown und liefert im Sinne einer schwächer ausgeprägten Fähigkeit zur Kompensation einer MCT1-Blockade eine Erklärung für die höhere Suszeptibilität von shMCT4 für die Applikation des spezifischen MCT1-Inhibitors AR-C155858.

Interessant ist aber auch der Vergleich zwischen shMCT4 und IGROV-1: Obwohl erstere Linie trotz des genetischen Knockdowns noch eine um etwa 40 % höhere MCT4-Expression aufweist, reagiert sie scheinbar anfälliger auf eine MCT1-Blockade. Dieser Umstand lässt sich leicht dadurch erklären, dass für die Untersuchung der gentechnisch modifizierten Zelllinien 1 μ m AR-C155858 verwendet wurden und damit mehr als drei Mal so viel Hemmstoff wie bei den Versuchen mit IGROV-1. Dieser Unterschied liegt darin begründet, dass die genmanipulierten Zellen in erster Linie mit den nativen OC316 verglichen werden sollten und nicht mit IGROV-1. Darüber hinaus kann ein MCT4-Knockdown in einer verstärkten Membrantranslokation von MCT1-Proteinen resultieren (Baek et al. 2014), was am ehesten auf die Konkurrenz der beiden Isoformen um ihr Chaperon CD147 zurückzuführen ist (Halestrap & Wilson 2012, Kirk et al. 2000). Da es sich dabei

lediglich um eine Verschiebung und nicht um eine verstärkte Expression des Transporters handelt, schlägt sich dieser Mechanismus nicht in erhöhten MCT1-Werten für shMCT4 in der Expressionsanalyse nieder, verschiebt jedoch womöglich das Verhältnis zwischen MCT1 und MCT4 hinsichtlich ihrer Beteiligung am Laktatexport in der „Ruhsituation“, also vor Applikation eines Hemmstoffs, in Richtung MCT1. So ließe sich erklären, warum, zumindest über einen begrenzten Zeitraum von bis zu 24 Stunden, shMCT4 trotz höherer MCT4- und vergleichbarer MCT1-Expression derart empfindlich auf eine MCT1-Blockade reagieren. Hinsichtlich der nur zu etwa einem Drittel geglückten MCT4-Suppression ist denkbar, dass die Eliminierung des MCT4 womöglich nur insoweit erfolgreich war, dass alterierte, in ihrer Funktion beeinträchtigte Transportproteine exprimiert wurden, die von der Immunfluoreszenzanalyse jedoch nicht von funktionsfähigen Molekülen unterschieden werden können.

5.2.5 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Die zusammenfassende Betrachtung aller Resultate lässt den Schluss zu, dass für die Erzielung einer effektiven inhibitorischen Wirkung auf den Glukosestoffwechsel von Ovarialkarzinomzellen deutlich geringere Mengen des spezifischen MCT1-Inhibitors erforderlich sind als dies für den klassischen unspezifischen MCT-Hemmstoff α -CHC der Fall ist. Aus diesem Umstand resultiert gleichzeitig eine erheblich geringere Toxizität der eingesetzten Konzentrationen an AR-C155858.

Der inhibitorische Effekt von AR-C155858 ist auf die Blockade von MCT1-Proteinen auf der Zellmembran der Karzinomzellen, die entlang des Konzentrationsgradienten sowohl den Export als auch den Import von Laktat und anderen Monocarboxylaten katalysieren können, zurückzuführen (Halestrap & Wilson 2012). Nach dem von Sonveaux et al. (2008) postulierten Modell unterschiedlicher Kompartimente innerhalb eines Tumors würde eine MCT1-Blockade in oxygenierten Tumorbereichen eine Hemmung des Laktatinfux in die Zellen nach sich ziehen mit dem Resultat einer beeinträchtigten oxidativen Verstoffwechslung des Laktats. Da in den für Kultur und Messungen verwendeten Medien kein Laktat enthalten war, ist die beschriebene Konstellation für die Analyse der Versuche der vorliegenden Arbeit

wenig relevant. Es ist zudem nicht anzunehmen, dass innerhalb der einzelnen Zellkammern wesentliche Unterschiede hinsichtlich des Glukosestoffwechsels oder der Oxygenierung zwischen einzelnen Zellen oder Zellgruppen bestehen, sodass auch das Vorhandensein eines Laktatshuttles im Sinne von Sonveaux et al als unwahrscheinlich zu erachten ist. Aus diesem Grund ist vielmehr davon auszugehen, dass für die untersuchten Zellen während der Experimente eher von der Situation auszugehen ist, die Sonveaux et al für das zweite Kompartiment beschreiben: Dort erzeugen hypoxische Zellen den Großteil ihrer Energie auf glykolytischem Weg unter Anfall von Laktat, welches mithilfe der MCT ins extrazelluläre Milieu geschleust wird. Eine Hemmung dieses Efflux führt zu einer intrazellulären Azidifizierung und einer Anreicherung von Laktat, welche im Sinne eines negativen Feedbacks eine Verlangsamung der Glykolyse nach sich ziehen und damit die Vorteile, die diese für Tumorzellen bietet (vgl. 2.3.1), beschneiden. Obgleich während der Versuche keine hypoxischen Zustände vorlagen, sprechen der relativ kontinuierliche Anstieg der Laktatkonzentrationen sowie die zwischen zwei Hemmstoff-Injektionen recht konstante ECAR im Sinne des Konzepts der „anaeroben Glykolyse“ (Bevorzugung der Glykolyse trotz ausreichender Oxygenierung) für diese Konstellation. Demzufolge wäre bei allen untersuchten Zelllinien MCT1 während der Versuche der vorliegenden Arbeit vorwiegend für den Laktatexport zuständig gewesen. Während davon auszugehen ist, dass diese Isoform bei IGROV-1 und shMCT4 den Großteil des Exports leistet, trägt bei OC316 und OC316 shRNA auch MCT4 in erheblichem Maße dazu bei. Auf diese Weise lassen sich auch die unterschiedlichen Reaktionen auf die Applikation des MCT1-Inhibitors erklären, in der Annahme, dass MCT4 im Falle einer MCT1-Blockade zumindest teilweise dessen Anteil am Laktat- und Protonentransport übernehmen kann: Während bei OC316 eine höhere Konzentration als bei IGROV-1 vonnöten ist, um einen vergleichbar starke Beeinträchtigung des Laktatexports zu provozieren, fällt letztere bei shMCT4 deutlich stärker aus als bei shRNA, wenn beide Zelllinien mit der gleichen Menge der Substanz konfrontiert werden. Letztere Beobachtung ist konsistent mit den Resultaten von Hanson et al. (2015), die an Zellen eines multiplen Myeloms demonstrieren konnten, dass eine zusätzliche MCT4-Suppression die durch AR-C155858 hervorgerufene Hemmung des Laktatexports erheblich verstärkt. Selbstverständlich ist zu den obigen Überlegungen aber anzumerken, dass das Modell von Sonveaux et al im Hinblick auf Tumoren entwickelt wurde und demzufolge nicht uneingeschränkt auf in-vitro-Untersuchungen an

adhärenten Zellen übertragen werden kann. Zur Aufarbeitung dieser Unklarheiten erscheinen Versuche sinnvoll, in denen der Einfluss des Oxygenierungszustands der Zellen bzw. ihres Kulturmediums Berücksichtigung findet bzw. unterschiedliche Oxygenierungs-zustände simuliert werden sowie solche, in denen Laktat in verschiedenen Konzentrationen dem Versuchs- und zu Zwecken der Akklimation auch dem Kulturmedium hinzugefügt wird.

Zusätzlich ist zu betonen, dass die ausschließliche Beachtung der MCT bei einer Diskussion über den Laktat- und Protonenexport aus Zellen der Komplexität der zellulären pH-Homöostase nicht gänzlich gerecht wird. Obgleich die MCT-Isoformen 1 und 4 als wichtigste Kontributoren insbesondere bei malignen Zellen gelten, wurden in der Vergangenheit mehrere Kandidaten identifiziert, die ebenfalls einen Beitrag zur Aufrechterhaltung des pH-Haushalts liefern und möglicherweise infolge einer MCT-Inhibition kompensatorisch tätig werden könnten. Beispiele hierfür sind neben MCT2, dem jedoch ausschließlich eine Bedeutung für den Laktatimport zugesprochen und der durch AR-C155858 ebenfalls inhibiert wird (Le Floch et al. 2011, Manning Fox et al. 2000), der Na⁺-H⁺-Austauscher 1 (NHE1), die H⁺-ATPase und die Gruppe der löslichen MCT (sMCT) (Wakabayashi et al. 1997, Martinez-Zaguilan et al. 1993, Sennoune et al. 2004, Vijay et al. 2015).

Eine Restriktion des krebstherapeutischen Potenzials spezifischer MCT1-Inhibitoren wie AR-C155858 könnte, wie auch die Unterschiede hinsichtlich der Suszeptibilität etwa zwischen shRNA und shMCT4 illustrieren, in einer kompensatorischen Verstärkung der MCT4-Aktivität in den Tumorzellen bestehen. Untersuchungen an Ras-transformierten Fibroblasten zeigten etwa, dass eine MCT1-Inhibition zwar den Glukosestoffwechsel der Zellen verlangsamt, die Zellen jedoch durch die Reaktivierung eines endogenen MCT4-Gens letztlich resistent gegenüber der MCT1-Blockade und hoch tumorigen wurden (Le Floch et al. 2011). Dieser Umstand unterstreicht die Notwendigkeit fortwährender und intensivierter Bemühungen, eine MCT4-Suppression auch in Inhibitor-basierter Form realisierbar zu machen, in Ergänzung des etablierten gentechnischen Silencings, das bis dato zur Simulation eines derartigen Hemmstoffs herangezogen werden muss (Baek et al. 2014, Hanson et al. 2015). Erste Schritte in diese Richtung scheinen bereits gemacht: Draoui et al. (2014) identifizierten Derivate des 7-Aminocarboxycoumarins (7ACC) als potente Inhibitoren des Laktatinfux sowohl durch MCT1 als auch durch MCT4. Obgleich die

fehlende Beeinflussung des Efflux von den Autoren als äußerst hoffnungsvoll im Hinblick auf geringere Nebenwirkungen angesehen wird, lässt besagte Einschränkung es zumindest fraglich erscheinen, inwiefern die Wirkstoffgruppe auch in der Behandlung hochglykolytischer Zelllinien, deren verwundbarer Punkt eher im Laktatexport zu sehen ist, Erfolge wird erzielen können.

6 Zusammenfassung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war eine Untersuchung der Wirkung einer Applikation des spezifischen MCT1-Inhibitors AR-C155858 auf den Stoffwechsel von Ovarialkarzinomzelllinien unterschiedlicher Malignität und Stoffwechselaktivität im Vergleich zum unspezifischen MCT-Hemmstoff α -CHC. Ergänzend sollte die Expression der MCT-Isoformen 1 und 4 unter den verwendeten Zelllinien quantifiziert werden, um anhand dieser die zuvor erhaltenen Resultate zu interpretieren.

AR-C155858 erwies sich bei allen untersuchten Zelllinien als potenter Inhibitor des Glukosemetabolismus. Dabei übte der spezifische MCT-1-Hemmstoff schon in deutlich geringeren Konzentrationen einen vergleichbar großen inhibitorischen Effekt aus und zeigte eine signifikant geringere toxische Wirkung als α -CHC. Bei der Betrachtung der einzelnen Zelllinien zeigte sich eine signifikant geringere Suszeptibilität von OC316 gegenüber AR-C155858 im Vergleich mit IGROV-1, was sich mit einer ausgeprägteren Kompensationsfähigkeit erklären lässt, die ihrerseits auf einer um etwa 40 % höheren MCT4-Expression beruht. Einem nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu etwa einem Drittel geglückten MCT4-Knockdown unterzogene OC316-Zellen, die zur Simulation der Wirkung eines spezifischen MCT4-Inhibitors herangezogen wurden, reagierten hingegen empfindlicher auf AR-C155858 als native OC316.

Die zentralen Aussagen der vorliegenden Arbeit bestehen folglich in der Feststellung, dass der spezifische MCT1-Hemmstoff AR-C155858 bei der Applikation auf Ovarialkarzinomzellen eine deutlich bessere Relation von inhibitorischer Wirkung zu Toxizität bietet als der klassische unspezifische MCT-Inhibitor α -CHC sowie darin, dass eine ergänzende Ausschaltung der MCT-Isoform 4 die Wirkung des Hemmstoffs erheblich verstärken kann.

Aus diesen Gründen liefert die vorliegende Arbeit Argumente für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich des Potenzials von AR-C155858 und anderen MCT-Inhibitoren der gleichen Gruppe für die Krebsforschung und -therapie sowie für eine Intensivierung der Bemühungen um die Etablierung spezifischer MCT-4-Hemmstoffe.

7 Literaturverzeichnis

Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue JA, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer research* 61 (7) (2001): 2911-6 .

Agarwal P, Srivastava RK, Puri SK, Srivastava K. Management of mycoplasma contamination in in vitro culture of Plasmodium falciparum without antibiotic treatment - a preliminary report. *Res Microbiol.* 2013 Apr;164(3):211-5.

Ahmadi H, Djaladat H, Cai J, Miranda G, Daneshmand S. Precystectomy serum levels of carbohydrate antigen 19-9, carbohydrate antigen 125, and carcinoembryonic antigen: Prognostic value in invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Urol Oncol* 2014;32:648-56.

Ahuja P, Zhao P, Angelis E, Ruan H, Korge P, Olson A, Wang Y, Jin ES, Jeffrey FM, Portman M, Maclellan WR. Myc controls transcriptional regulation of cardiac metabolism and mitochondrial biogenesis in response to pathological stress in mice. *J Clin Invest.* 2010 May;120(5):1494-505.

Aigner K, Stephens FO (Hrsg.). *Onkologie Basiswissen*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg; 2016.

Airley RE, Mobasheri A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 53, 233–256 (2007).

Alama A, Barbieri F, Favre A, Cagnoli M, Noviello E, Pedullà F, Viale M, Foglia G, Ragni N. Establishment and characterization of three new cell lines derived from the ascites of human ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol.* 1996 Jul;62(1):82-8.

Amorim R, Pinheiro C, Miranda-Gonçalves V, Pereira H, Moyer MP, Preto A, Baltazar F. Monocarboxylate transport inhibition potentiates the cytotoxic effect of 5-fluorouracil in colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 2015 Aug 28;365(1):68-78.

Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C et al. (2008) Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm Res.* 25: 2097

Andersen AP, Flinck M, Oernbo EK, Pedersen NB, Viuff BM, Pedersen SF. Roles of acid-extruding ion transporters in regulation of breast cancer cell growth in a 3-dimensional microenvironment. *Mol Cancer.* 2016 Jun 6;15(1):45.

Argento M, Hoffman P, Gauchez AS. Ovarian cancer detection and treatment: Current situation and future prospects. *Anticancer Res* 2008;28:3135-8.

Arsham AM, Plas DR, Thompson CB, Simon MC. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1a nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 15162–15170 (2002).

Arsham AM, Plas DR, Thompson CB, Simon MC. Akt and hypoxia-inducible factor-1 independently enhance tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 64, 3500–3507 (2004)

Arun-Muthuvel V, Jaya V. Pre-operative evaluation of ovarian tumors by risk of malignancy index, CA125 and ultrasound. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:2929-32

Baek G, Tse YF, Hu Z, Cox D, Buboltz N, McCue P, Yeo CJ, White MA, DeBerardinis RJ, Knudsen ES, Witkiewicz AK. MCT4 defines a glycolytic subtype of pancreatic cancer with poor prognosis and unique metabolic dependencies. *Cell Rep.* 2014 Dec 24;9(6):2233-49.

Bankhead CR, Kehoe ST, Austoker J. Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG*, 2005. 112(7): p. 857-65.

- Barton CA, Hacker NF, Clark SJ, O'Brien PM. DNA methylation changes in ovarian cancer: Implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecol Oncol* 2008;109:129-39.
- Beloueche-Babari, M., Casals Galobart, T., Delgado-Goni, T. et al. Monocarboxylate transporter 1 blockade with AZD3965 inhibits lipid biosynthesis and increases tumour immune cell infiltration. *Br J Cancer* (2020).
- Bénard J, Da Silva J, De Blois MC, Boyer P, Duillard P, Chiric E, Riou G. Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res.* 1985 Oct;45(10):4970-9.
- Berg JM, Tymoczko JL, Gregory JG jr, Stryer L. Stryer Biochemie. 8. Auflage. Springer Berlin, 2018.
- Bergersen LH, Jóhannsson E, Veruki ML, Nagelhus EA, Halestrap A, Sejersted OM, Ottersen OP. Cellular and subcellular expression of monocarboxylate transporters in the pigment epithelium and retina of the rat. *Neuroscience.* 1999 Apr;90(1):319-31.
- Bergersen LH. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience.* 2007 Mar 2;145(1):11-9.
- Binz L. Metabolische und proteomische Untersuchungen humaner Tumorlinien in vitro und in vivo. Diplomarbeit zur Erlangung des Grades einer Diplombiologin. Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2012
- Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;7(6):1661-8.
- Birsoy K, Wang T, Possemato R, Yilmaz OH, Koch CE, Chen WW, Hutchins AW, Gultekin Y, Peterson TR, Carette JE, Brummelkamp TR, Clish CB, Sabatini DM. MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors. *Nat Genet.* 2013 Jan;45(1):104-8.
- Blagosklonny MV, An WG, Romanova LY, Trepel J, Fojo T, Neckers L. p53 inhibits hypoxia-inducible factor-stimulated transcription. *J Biol Chem.* 1998 May 15;273(20):11995-8.
- Blatt S, Voelxen N, Sagheb K, Pabst AM, Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W, Ziebart T. Lactate as a predictive marker for tumor recurrence in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) post radiation: a prospective study over 15 years. *Clin Oral Investig.* 2016 Nov;20(8):2097-2104.
- Bola BM, Chadwick AL, Michopoulos F, Blount KG, Telfer BA, Williams KJ, Smith PD, Critchlow SE, Stratford IJ. Inhibition of monocarboxylate transporter-1 (MCT1) by AZD3965 enhances radiosensitivity by reducing lactate transport. *Mol Cancer Ther.* 2014 Dec;13(12):2805-16.
- Bonen A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur J Appl Physiol.* 2001 Nov;86(1):6-11.
- Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Feb 21;93(4):309-14.
- Boulton SJ. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. In: Biochemical Society Transactions Band 34, November 2006, S. 633–645
- Braga F, Ferraro S, Mozzi R, Panteghini M. The importance of individual biology in the clinical use of serum biomarkers for ovarian cancer. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:1625-31
- Brahimi-Horn MC, Bellot G, Pouysségur J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Feb;21(1):67-72.

- Brizel DM, Schroeder T, Scher RL, Walenta S, Clough RW, Dewhirst MW, 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*. 2001 Oct 1;51(2):349-53.
- Brooks GA. Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J Physiol*. 2009 Dec 1;587(Pt 23):5591-600.
- Busk M, Walenta S, Mueller-Klieser W, Steiniche T, Jakobsen S, Horsman MR, Overgaard J. Inhibition of tumor lactate oxidation: consequences for the tumor microenvironment. *Radiother Oncol*. 2011 Jun;99(3):404-11.
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011 Feb;11(2):85-95.
- Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer*. 2002; 1: 9.
- Carpenter L, Halestrap AP. The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lette tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF. *Biochem J*. 1994 Dec 15;304 (Pt 3)(Pt 3):751-60.
- Chen H, Wang L, Beretov J, Hao J, Xiao W, Li Y. Co-expression of CD147/EMMPRIN with monocarboxylate transporters and multiple drug resistance proteins is associated with epithelial ovarian cancer progression. *Clin Exp Metastasis*. 2010 Dec;27(8):557-69.
- Cheng, B., Chen, X., Li, Y., Huang, X., & Yu, J. (2018). Prognostic value of monocarboxylate transporter 4 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 40, 2906-2915.
- Cheung EC, Vousden KH. The role of p53 in glucose metabolism. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):186-91.
- Chiche J, Le Fur Y, Vilmen C, Frassinetti F, Daniel L, Halestrap AP, Cozzzone PJ, Pouysségur J, Lutz NW. In vivo pH in metabolic-defective Ras-transformed fibroblast tumors: key role of the monocarboxylate transporter, MCT4, for inducing an alkaline intracellular pH. *Int J Cancer*. 2012 Apr 1;130(7):1511-20.
- Chon HS, Lancaster JM. Microarray-based gene expression studies in ovarian cancer. *Cancer Control* 2011;18:8-15.
- Chowdhury MA, Xiubin Z, Wei H, Chenghao G. Cancer antigen-125 and ICAM-1 are together responsible for ascites in liver cirrhosis. *Clin Lab* 2014;60:653-8.
- Colen CB, Seraji-Bozorgzad N, Marples B, Galloway MP, Sloan AE, Mathupala SP. Metabolic remodeling of malignant gliomas for enhanced sensitization during radiotherapy: an in vitro study. *Neurosurgery*. 2006 Dec;59(6):1313-23; discussion 1323-4.
- Colen CB, Shen Y, Ghoddoussi F, Yu P, Francis TB, Koch BJ, Monterey MD, Galloway MP, Sloan AE, Mathupala SP. Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an in vivo study. *Neoplasia*. 2011 Jul;13(7):620-32.
- Colombo N, Peiretti M, Garbi A, Carinelli S, Marini C, Sessa C; ESMO Guidelines Working Group. Non-epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2012;23 Suppl 7: vii20-6.
- Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, Kim H, Zapata JM, Marusawa H, Chamorro M, Reed JC. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res*. 2002; 62: 6674-81.
- Daly M, Oubrahim GI. Epidemiology and risk assessment for ovarian cancer. *Semin Oncol* 1998 Jun;25(3):255-64.

- Dang CV. Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism. *Cancer Res.* 2010 Feb 1;70(3):859-62.
- Dang CV, Hamaker M, Sun P, Le A, Gao P. Therapeutic targeting of cancer cell metabolism. *J Mol Med (Berl)*. 2011 Mar;89(3):205-12.
- DeBerardinis RJ. Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genet Med.* 2008 Nov;10(11):767-77.
- Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH. Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J. Biol. Chem.* 272, 17269–17275 (1997)
- Díaz-Padilla I, Razak AR, Minig L, Bernardini MQ, María Del Campo J. Prognostic and predictive value of CA-125 in the primary treatment of epithelial ovarian cancer: Potentials and pitfalls. *Clin Transl Oncol* 2012;14:15-20.
- Diers AR, Broniowska KA, Chang CF, Hogg N. Pyruvate fuels mitochondrial respiration and proliferation of breast cancer cells: effect of monocarboxylate transporter inhibition. *Biochem J.* 2012 Jun 15;444(3):561-71.
- Dietl K, Renner K, Dettmer K, Timischl B, Eberhart K, Dorn C, Hellerbrand C, Kastenberger M, Kunz-Schughart LA, Oefner PJ, Andreesen R, Gottfried E, Kreutz MP. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J Immunol.* 2010 Feb 1;184(3):1200-9.
- Dietzen DJ, Davis EJ. Oxidation of pyruvate, malate, citrate, and cytosolic reducing equivalents by AS-30D hepatoma mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 305: 91-102.
- Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Bröer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J.* 2000 Aug 15;350 Pt 1(Pt 1):219-27.
- Doherty JR, Yang C, Scott KE, Cameron MD, Fallahi M, Li W, Hall MA, Amelio AL, Mishra JK, Li F, Tortosa M, Genau HM, Rounbehler RJ, Lu Y, Dang CV, Kumar KG, Butler AA, Bannister TD, Hooper AT, Unsal-Kacmaz K, Roush WR, Cleveland JL. Blocking lactate export by inhibiting the Myc target MCT1 Disables glycolysis and glutathione synthesis. *Cancer Res.* 2014 Feb 1;74(3):908-20.
- Dong X, Men X, Zhang W, Lei P. Advances in tumor markers of ovarian cancer for early diagnosis. *Indian J Cancer.* 2014 Mar;51 Suppl 3:e72-6.
- Draoui N, Feron O. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Dis Model Mech.* 2011 Nov;4(6):727-32.
- Draoui N, Schicke O, Seront E, Bouzin C, Sonveaux P, Riant O, Feron O. Antitumor activity of 7-aminocarboxycoumarin derivatives, a new class of potent inhibitors of lactate influx but not efflux. *Mol Cancer Ther.* 2014 Jun;13(6):1410-8.
- Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1995 Jan;56(1):265-71
- Ekberg H, Qi Z, Pahlman C, Veress B, Bundick RV, Craggs RI, Holness E, Edwards S, Murray CM, Ferguson D, Kerry PJ, Wilson E, Donald DK. The specific monocarboxylate transporter-1 (MCT-1) inhibitor, AR-C117977, induces donor-specific suppression, reducing acute and chronic allograft rejection in the rat. *Transplantation.* 2007 Nov 15;84(9):1191-9.
- Elstrom R, Bauer D, Buzzai M, Karnauskas R, Harris M, Plas D, Zhuang H, Cinalli R, Alavi A, Rudin C, Thompson C. (2004). Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells. *Cancer research.* 64. 3892-9.
- Erlichman JS, Hewitt A, Damon TL, Hart M, Kurasz J, Li A, Leiter JC. Inhibition of monocarboxylate

transporter 2 in the retrotrapezoid nucleus in rats: a test of the astrocyte-neuron lactate-shuttle hypothesis. *J Neurosci*. 2008 May 7;28(19):4888-96.

Fabian C. Untersuchungen zur Wechselbeziehung zwischen Proteom, Energiestoffwechsel, Redoxstatus und Radiosensibilität von Tumorzellen in vitro und in vivo. Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften. Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2013.

Fagotti A, Vizzielli G, Fanfani F, Costantini B, Ferrandina G, Gallotta V, et al. Introduction of staging laparoscopy in the management of advanced epithelial ovarian, tubal and peritoneal cancer: Impact on prognosis in a single institution experience. *Gynecol Oncol* 2013;131:341-6.

Fan J, Zhou JQ, Yu GR, Lu DD. Glucose transporter protein 1-targeted RNA interference inhibits growth and invasion of the osteosarcoma cell line MG63 in vitro. *Cancer Biother Radiopharm*. 2010 Oct;25(5):521-7.

Fang J, Quinones QJ, Holman TL, Morowitz MJ, Wang Q, Zhao H, Sivo F, Maris JM, Wahl ML. The H⁺-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma. *Mol Pharmacol*. 2006 Dec;70(6):2108-15.

Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006 Jun;9(6):425-34.

Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, Gottfried E, Schwarz S, Rothe G, Hoves S, Renner K, Timischl B, Mackensen A, Kunz-Schughart L, Andreesen R, Krause SW, Kreutz M. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007 May 1;109(9):3812-9.

Fritz A, Percy C, Jack A, Shanmugaratnam K, Sobin L, Parkin DM, Whelan S (Hrsg.). International Classification of Diseases for Oncology. 3. Auflage. WHO, Genf 2000.

Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res*. 2001 Aug 15;61(16):6020-4.

Funes JM, Quintero M, Henderson S, Martinez D, Qureshi U, Westwood C, Clements MO, Bourboulia D, Pedley RB, Moncada S, Boshoff C. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 10;104(15):6223-8.

Futagi Y, Kobayashi M, Narumi K, Furugen A, Iseki K. Identification of a selective inhibitor of human monocarboxylate transporter 4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):427-432.

Gallagher, RP; Lee, TK; Bajdik, CD und Borugian, M (2010). Ultraviolet radiation. *Chronic Dis Can* 29 Suppl 1;51-68

Garcia CK, Brown MS, Pathak RK, Goldstein JL. cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. *J Biol Chem*. 1995 Jan 27;270(4):1843-9.

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

Gerlinger M, Santos CR, Spencer-Dene B, Martinez P, Endesfelder D, Burrell RA, Vetter M, Jiang M, Saunders RE, Kelly G, Dykema K, Rioux-Leclercq N, Stamp G, Patard JJ, Larkin J, Howell M, Swanton C. Genome-wide RNA interference analysis of renal carcinoma survival regulators identifies MCT4 as a Warburg effect metabolic target. *J Pathol*. 2012 Jun;227(2):146-56.

Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*. 2007 Aug;12(2):108-13.

Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, Mackensen A, Kreutz M. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):2013-21.

Götze K. Einfluss einer Schwerionenbestrahlung auf das Migrationsverhalten von Tumorzellen. Dissertation Zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften. Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2008

Graham K, Müller A, Lehmann L, Koglin N, Dinkelborg L, Siebeneicher H. [18F]Fluoropyruvate: radiosynthesis and initial biological evaluation. *J. Label Compd. Radiopharm*, 2014; 57: 164-171.

Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J*. 2012 May 30;31(11):2448-60.

Groussard C, Morel I, Chevanne M, Monnier M, Cillard J, Delamarche A. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Jul;89(1):169-75.

Guan X, Rodriguez-Cruz V, Morris ME. Cellular Uptake of MCT1 Inhibitors AR-C155858 and AZD3965 and Their Effects on MCT-Mediated Transport of L-Lactate in Murine 4T1 Breast Tumor Cancer Cells. *AAPS J*. 2019 Jan 7;21(2):13.

Guile SD, Bantick JR, Cheshire DR, Cooper ME, Davis AM, Donald DK, Evans R, Eyssade C, Ferguson DD, Hill S, Hutchinson R, Ingall AH, Kingston LP, Martin I, Martin BP, Mohammed RT, Murray C, Perry MW, Reynolds RH, Thorne PV, Wilkinson DJ, Withnall J. Potent blockers of the monocarboxylate transporter MCT1: novel immunomodulatory compounds. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006 Apr 15;16(8):2260-5.

Gurrapu S, Jonnalagadda SK, Alam MA, Nelson GL, Sneve MG, Drewes LR, Mereddy VR. Monocarboxylate transporter 1 inhibitors as potential anticancer agents. *ACS Med Chem Lett*. 2015 Mar 19;6(5):558-61

Hakim AA, Barry CP, Barnes HJ, Anderson KE, Petite J, Whitaker R, et al. Ovarian adenocarcinomas in the laying hen and women share similar alterations in p53, ras, and HER-2/neu. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009 Feb;2(2):114-21

Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J (2008) An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* Mar 7;319(5868):1352-5.

Halestrap AP. The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J*. 1975 Apr;148(1):85-96.

Halestrap AP. Transport of pyruvate and lactate into human erythrocytes. Evidence for the involvement of the chloride carrier and a chloride-independent carrier. *Biochem J*. 1976 May 15;156(2):193-207.

Halestrap AP. The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr-Jun;34(2-3):337-49

Halestrap AP, Denton RM. Specific inhibition of pyruvate transport in rat liver mitochondria and human erythrocytes by alpha-cyano-4-hydroxycinnamate. *Biochem J*. 1974 Feb;138(2):313-6.

Halestrap AP, Denton RM. The specificity and metabolic implications of the inhibition of pyruvate transport in isolated mitochondria and intact tissue preparations by alpha-Cyano-4-hydroxycinnamate and related compounds. *Biochem J* 1975;148:97-106.

Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 447, 619–628 (2004).

Halestrap AP, Poole RC, Cranmer SL. Mechanisms and regulation of lactate, pyruvate and ketone body transport across the plasma membrane of mammalian cells and their metabolic consequences.

Biochem Soc Trans. 1990 Dec;18(6):1132-5.

Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J.* 1999 Oct 15;343 Pt 2(Pt 2):281-99.

Halestrap AP, Wang X, Poole RC, Jackson VN, Price NT. Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *Am J Cardiol.* 1997 Aug 4;80(3A):17A-25A.

Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life* 2012 64:109–119

Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist. 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100; 1:57-70.

Hanahan D, Weinberg, RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144; 5:646-674

Hanson DJ, Nakamura S, Amachi R, Hiasa M, Oda A, Tsuji D, Itoh K, Harada T, Horikawa K, Teramachi J, Miki H, Matsumoto T, Abe M. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by blockade of monocarboxylate transportation. *Oncotarget.* 2015 Oct 20;6(32):33568-86.

Hiddemann W, Feuring-Buske M, Lindner L, Krych M, Huber H, Bartram CR. Die Onkologie. Springer Verlag Heidelberg; 2010

Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res.* 2011 Nov 15;71(22):6921-5.

Hollingsworth KG, Newton JL, Robinson L, Taylor R, Blamire AM, Jones DE. Loss of capacity to recover from acidosis in repeat exercise is strongly associated with fatigue in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 2010 Jul;53(1):155-61.

Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008 Sep 5;134(5):703-7.

Huang CY, Hsu LH, Chen CY, Chang GC, Chang HW, Hung YM, Liu KJ, Kao SH. Inhibition of Alternative Cancer Cell Metabolism of EGFR Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Serves as a Potential Therapeutic Strategy. *Cancers* 2020, 12, 181.

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

Ide T, Kitajima Y, Miyoshi A, Ohtsuka T, Mitsuno M, Ohtaka K, Miyazaki K. The hypoxic environment in tumor-stromal cells accelerates pancreatic cancer progression via the activation of paracrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling. *Ann Surg Oncol.* 2007 Sep;14(9):2600-7.

Irigaray P, Newby JA, Clapp R, Hardell L, Howard V, Montagnier L, Epstein S, Belpomme D. (2008). Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie.* 61. 640-58. 10.1016/j.biopha.2007.10.006.

Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 2008 May 2;320(5876):661-4.

Jackson VN, Price NT, Carpenter L, Halestrap AP. Cloning of the monocarboxylate transporter isoform MCT2 from rat testis provides evidence that expression in tissues is species-specific and may involve post-transcriptional regulation. *Biochem J.* 1997 Jun 1;324 (Pt 2)(Pt 2):447-53.

Jazaeri AA. Molecular profiles of hereditary epithelial ovarian cancers and their implications for the biology of this disease. *Mol Oncol* 2009;3:151-6

- Jonnalagadda S, Jonnalagadda SK, Ronayne CT, Nelson GL, Solano LN, Rumbley J, Holy J, Mereddy VR, Drewes LR. Novel N,N-dialkyl cyanocinnamic acids as monocarboxylate transporter 1 and 4 inhibitors. *Oncotarget*. 2019 Mar 22;10(24):2355-2368.
- Juel C, Halestrap AP. Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol*. 1999 Jun 15;517 (Pt 3)(Pt 3):633-42.
- Kaelin WG Jr, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*. 2008 May 23;30(4):393-402.
- Kennedy KM, Dewhirst MW. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol*. 2010 Jan;6(1):127-48.
- Kennedy KM, Scarbrough PM, Ribeiro A, Richardson R, Yuan H, Sonveaux P, Landon CD, Chi JT, Pizzo S, Schroeder T, Dewhirst MW. Catabolism of exogenous lactate reveals it as a legitimate metabolic substrate in breast cancer. *PLoS One*. 2013 Sep 12;8(9):e75154.
- Kikuchi H, Pino MS, Zeng M, Shirasawa S, Chung DC. Oncogenic KRAS and BRAF differentially regulate hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α in colon cancer. *Cancer Res*. 69, 8499–8506 (2009).
- Kim HS, Masko EM, Poulton SL, Kennedy KM, Pizzo SV, Dewhirst MW, Freedland SJ. Carbohydrate restriction and lactate transporter inhibition in a mouse xenograft model of human prostate cancer. *BJU Int*. 2012 Oct;110(7):1062-9.
- Kim JH, Herlyn D, Wong KK, Park DC, Schorge JO, Lu KH, et al. Identification of epithelial cell adhesion molecule autoantibody in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:4782-91.
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006 Mar;3(3):177-85.
- Kim JW, Gao P, Liu YC, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol Cell Biol*. 2007 Nov;27(21):7381-93.
- King A, Selak MA, Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* 25, 4675–4682 (2006).
- Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J*. 2000 Aug 1;19(15):3896-904.
- Kong SC, Nøhr-Nielsen A, Zeeberg K, Reshkin SJ, Hoffmann EK, Novak I, Pedersen SF. Monocarboxylate Transporters MCT1 and MCT4 Regulate Migration and Invasion of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. *Pancreas*. 2016 Aug;45(7):1036-47.
- Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011 May;11(5):325-37.
- Koukoura O, Spandidos DA, Daponte A, Sifakis S. DNA methylation profiles in ovarian cancer: Implication in diagnosis and therapy (Review). *Mol Med Rep* 2014;10:3-9.
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):632-7.
- Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 2008 Jun;13(6):472-82.
- Kumar A, Kant S, Singh S. α -Cyano-4-hydroxycinnamate induces apoptosis in Dalton's lymphoma

cells: role of altered cell survival-regulatory mechanisms. *Anti-Cancer Drugs* 2013, Volume 24 - Issue 2 - p 158-171.

Kumar V, Abbas AK, Aster J (Hrsg.). Robbins Basic Pathology (9th ed.). Elsevier Saunders Philadelphia, 2012.

Kurman RJ, Shih IeM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol.* 2011 Jul;42(7):918-31.

Lasch L, Fillenberg S. Basiswissen Gynäkologie und Geburtshilfe. 1. Auflage. Springer Berlin, 2017.

Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3995–4004 (2001).

Lawrie TA, Medeiros LR, Rosa DD, da Rosa MI, Edelweiss MI, Stein AT, et al. Laparoscopy versus laparotomy for FIGO stage I ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;2:CD005344.

Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, Naiken T, Ilc K, Murray CM, Critchlow SE, Roux D, Simon MP, Pouyssegur J. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Oct 4;108(40):16663-8.

Lee JY, Lee I, Chang WJ, Ahn SM, Lim SH, Kim HS, Yoo KH, Jung KS, Song HN, Cho JH, Kim SY, Kim KM, Lee S, Kim ST, Park SH, Lee J, Park JO, Park YS, Lim HY, Kang WK. MCT4 as a potential therapeutic target for metastatic gastric cancer with peritoneal carcinomatosis. *Oncotarget.* 2016 Jul 12;7(28):43492-43503.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 4.01, 2019, AWMF-Registernummer: 032/035OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom>, [abgerufen am: 26.01.2020]

Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science.* 2010 Dec 3;330(6009):1340-4.

Lu YY, Wang HY, Hsia JY, Lin WY. FDG PET/CT for the preoperative nodal staging of non-small cell lung cancer in a tuberculosis-endemic country: Are maximum standardized uptake values useful? *Thorac Cancer* 2013;4:273-9.

Maitre M. The gamma-hydroxybutyrate signalling system in brain: organization and functional implications. *Prog Neurobiol.* 1997 Feb;51(3):337-61.

Mann C. Glykolytische Stoffwechselaktivität und Strahlenresistenz verschiedener Plattenepithel-Karzinomzelllinien in vitro. Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin. Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2012

Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007 Jun 29;129(7):1261-74.

Manning Fox JE, Meredith D, Halestrap AP. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J Physiol.* 2000 Dec 1;529 Pt 2(Pt 2):285-93.

Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(+) symporters. *J Mol Med (Berl).* 2016 Feb;94(2):155-71.

Martinez-Outschoorn UE, Balliet RM, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Hereditary ovarian cancer and two-compartment tumor metabolism: epithelial loss of BRCA1 induces

- hydrogen peroxide production, driving oxidative stress and NFκB activation in the tumor stroma. *Cell Cycle*. 2012 Nov 15;11(22):4152-66.
- Martinez-Outschoorn, U., Peiris-Pagés, M., Pestell, R. et al. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 11–31 (2017).
- Martinez-Zaguilan R, Lynch RM, Martinez GM, Gillies RJ. Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol*. 1993 Oct;265(4 Pt 1):C1015-29.
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*. 2001 Sep 17;20(18):5197-206.
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*. 2006 Jun 16;312(5780):1650-3.
- Maxwell P, Wiesener M, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman CE, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe P. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275 (1999).
- Meredith D, Christian HC. The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica*. 2008 Jul;38(7-8):1072-106.
- Miranda-Gonçalves V, Honavar M, Pinheiro C, Martinho O, Pires MM, Pinheiro C, Cordeiro M, Bebiano G, Costa P, Palmeirim I, Reis RM, Baltazar F. Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets. *Neuro Oncol*. 2013 Feb;15(2):172-88
- Miranda-Gonçalves V, Granja S, Martinho O, Honavar M, Pojo M, Costa BM, Pires MM, Pinheiro C, Cordeiro M, Bebiano G, Costa P, Reis RM, Baltazar F. Hypoxia-mediated upregulation of MCT1 expression supports the glycolytic phenotype of glioblastomas. *Oncotarget*. 2016 Jul 19;7(29):46335-46353.
- Moore LE, Pfeiffer RM, Zhang Z, Lu KH, Fung ET, Bast RC Jr. Proteomic biomarkers in combination with CA 125 for detection of epithelial ovarian cancer using prediagnostic serum samples from the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Cancer* 2012;118:91-100.
- Morais-Santos F, Miranda-Gonçalves V, Pinheiro S, Vieira AF, Paredes J, Schmitt FC, Baltazar F, Pinheiro C. Differential sensitivities to lactate transport inhibitors of breast cancer cell lines. *Endocr Relat Cancer*. 2013 Dec 16;21(1):27-38.
- Moreira TJ, Pierre K, Maekawa F, Repond C, Cebere A, Liljequist S, Pellerin L. Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009 Jul;29(7):1273-83.
- Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. (2007), Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS Journal*, 274: 1393-1418.
- Mueller-Klieser W. Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000 Nov-Dec;36(2-3):123-39.
- Mueller-Klieser W. Das Tumormikromilieu. *Nuklearmedizin* 49 (Suppl 1),S16-S20 (2010)
- Murray CM, Hutchinson R, Bantick JR, Belfield GP, Benjamin AD, Brazma D, Bundick RV, Cook ID, Craggs RI, Edwards S, Evans LR, Harrison R, Holness E, Jackson AP, Jackson CG, Kingston LP, Perry MW, Ross AR, Rugman PA, Sidhu SS, Sullivan M, Taylor-Fishwick DA, Walker PC, Whitehead YM, Wilkinson DJ, Wright A, Donald DK. Monocarboxylate transporter MCT1 is a target for immunosuppression. *Nat Chem Biol*. 2005 Dec;1(7):371-6.
- Nancolas B, Sessions RB, Halestrap AP. Identification of key binding site residues of MCT1 for AR-

C155858 reveals the molecular basis of its isoform selectivity. *Biochem J.* 2015 Feb 15;466(1):177-88.

Neesse A, Bauer CA, Öhlund D, Lauth M, Buchholz M, Michl P, Tuveson DA, Gress TM. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: ready for clinical translation? *Gut.* 2019 Jan;68(1):159-171.

Nelson D, Cox M. *Lehninger Biochemie.* 4. Auflage. Springer Berlin, 2009

Nelson GL, Ronayne CT, Solano LN, Jonnalagadda SK, Jonnalagadda S, Rumbley J, Holy J, Rose-Hellekant T, Drewes LR, Mereddy VR. Development of Novel Silyl Cyanocinnamic Acid Derivatives as Metabolic Plasticity Inhibitors for Cancer Treatment. *Sci Rep.* 2019 Dec 4;9(1):18266.

Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, Xu Y, Wonsey D, Lee LA, Dang C. Deregulation of Glucose Transporter 1 and Glycolytic Gene Expression by c-Myc. *J. Biol. Chem.* 275, 21797–21800 (2000).

Otonkoski T, Jiao H, Kaminen-Ahola N, Tapia-Paez I, Ullah MS, Parton LE, Schuit F, Quintens R, Sipilä I, Mayatepek E, Meissner T, Halestrap AP, Rutter GA, Kere J. Physical exercise-induced hypoglycemia caused by failed silencing of monocarboxylate transporter 1 in pancreatic beta cells. *Am J Hum Genet.* 2007 Sep;81(3):467-74.

Ovens MJ, Manoharan C, Wilson MC, Murray CM, Halestrap AP. The inhibition of monocarboxylate transporter 2 (MCT2) by AR-C155858 is modulated by the associated ancillary protein. *Biochem J.* 2010 Oct 15;431(2):217-25.

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):187-97.

Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *J Cell Physiol.* 2011 Feb;226(2):299-308.

Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2013 Sep;13(9):611-23.

Partridge EE, Greenlee RT, Riley TL, Commins J, Ragard L, Xu JL, et al. Assessing the risk of ovarian malignancy in asymptomatic women with abnormal CA 125 and transvaginal ultrasound scans in the prostate, lung, colorectal, and ovarian screening trial. *Obstet Gynecol* 2013;121:25-31.

Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N. Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res.* 2005 Nov 15;65(22):10545-54.

Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-7.

Petros JA, Baumann AK, Ruiz-Pesini E, Amin MB, Sun CQ, Hall J, Lim S, Issa MM, Flanders WD, Hosseini SH, Marshall FF, Wallace DC. mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 18;102(3):719-24.

Pfeifer B, Preiß J, Unger C. *Onkologie integrativ*, 1. Auflage. Elsevier Verlag München; 2006.

Philp A, Macdonald AL, Watt PW. Lactate--a signal coordinating cell and systemic function. *J Exp Biol.* 2005 Dec;208(Pt 24):4561-75.

Philp NJ, Yoon H, Grollman EF. Monocarboxylate transporter MCT1 is located in the apical membrane and MCT3 in the basal membrane of rat RPE. *Am J Physiol.* 1998 Jun;274(6):R1824-8.

Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem.* 2005 Jul;94(1):1-14.

- Pinheiro, C., Longatto-Filho, A., Scapulatempo, C. et al. Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch* 452, 139–146 (2008)
- Pinheiro C, Reis RM, Ricardo S, Longatto-Filho A, Schmitt F, Baltazar F. Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:427694.
- Polański R, Hodgkinson CL, Fusi A, Nonaka D, Priest L, Kelly P, Trapani F, Bishop PW, White A, Critchlow SE, Smith PD, Blackhall F, Dive C, Morrow CJ. Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Feb 15;20(4):926-937.
- Poole RC, Cranmer SL, Halestrap AP, Levi AJ. Substrate and inhibitor specificity of monocarboxylate transport into heart cells and erythrocytes. Further evidence for the existence of two distinct carriers. *Biochem J.* 1990 Aug 1;269(3):827-9.
- Poole RC, Halestrap AP. Inhibition and labelling of the erythrocyte lactate transporter by stilbene disulphonates. *Biochem Soc Trans* 1990;18:1245–6
- Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol.* 1993 Apr;264(4 Pt 1):C761-82.
- Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol.* 2011 Aug 25;2:49.
- Quennet V, Yaromina A, Zips D, Rosner A, Walenta S, Baumann M, Mueller-Klieser W. Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother Oncol.* 2006 Nov;81(2):130-5.
- Qureshi MO, Dar FS, Khokhar N. Cancer Antigen-125 as a marker of ascites in patients with liver cirrhosis. *J Coll Physicians Surg Pak* 2014;24:232-5.
- Ramanathan A, Wang C, Schreiber SL. Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 5992–5997 (2005).
- Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D (2007). Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ* 335; 7630:1134-1145
- Robert Koch-Institut (Hrsg). Krebs in Deutschland 2015/2016. 12. Auflage. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin 2019. DOI: 10.17886/rkipubl-2017-007
- Robey IF, Lien AD, Welsh SJ, Baggett BK, Gillies RJ. Hypoxia-inducible factor1alpha and the glycolytic phenotype in tumors. *Neoplasia.* 2005; 7: 324-30.
- Robey RB, Hay N. Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009 Feb;19(1):25-31.
- Roupa Z, Faros E, Raftopoulos V, Tzavelas G, Kotrotsiou E, Sotiropoulou P, et al. Serum CA 125 combined with transvaginal ultrasonography for ovarian cancer screening. *In Vivo* 2004;18:831-6.
- Salceda S, Caro J. Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin–proteasome system under normoxic conditions: its stabilization by hypoxia depends upon redox-induced changes. *J. Biol. Chem.*, 272 (1997), pp. 22642-22647
- Saraswathy S, Crawford FW, Lamborn KR, Pirzkall A, Chang S, Cha S, Nelson SJ. Evaluation of MR markers that predict survival in patients with newly diagnosed GBM prior to adjuvant therapy. *J Neurooncol.* 2009 Jan;91(1):69-81.
- Sattler UG, Mueller-Klieser W. The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis. *Int J Radiat Biol.* 2009 Nov;85(11):963-71.

Sattler UG, Meyer SS, Quennet V, Hoerner C, Knoerzer H, Fabian C, Yaromina A, Zips D, Walenta S, Baumann M, Mueller-Klieser W. Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother Oncol.* 2010 Jan;94(1):102-9.

Schildkraut JM, Bastos E, Berchuck A. Relationship between lifetime ovulatory cycles and overexpression of mutant p53 in epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997 Jul 2;89(13):932-8.

Schneiderhan W, Scheler M, Holzmann KH, Marx M, Gschwend JE, Bucholz M, Gress TM, Seufferlein T, Adler G, Oswald F. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. *Gut.* 2009 Oct;58(10):1391-8.

Sears R, Leone G, DeGregori J, Nevins JR. Ras enhances Myc protein stability. *Mol. Cell* 3, 169–179 (1999).

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr. Res.*, 49 (5) (2001), pp. 314-617

Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 2010 Feb;20(1):51-6.

Sennoune SR, Bakunts K, Martínez GM, Chua-Tuan JL, Kebir Y, Attaya MN, Martínez-Zaguilán R. Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Jun;286(6):C1443-52. Epub 2004 Feb 4.

Shih leM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol.* 2004 May;164(5):1511-8.

Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 24;94(13):6658-63.

Simons AL, Ahmad IM, Mattson DM, Dornfeld KJ, Spitz DR. 2-Deoxy-D-glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. *Cancer Res.* 2007 Apr 1;67(7):3364-70.

Singh KK. Mitochondrial dysfunction is a common phenotype in aging and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1019: 260-4.

Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest.* 2008 Dec;118(12):3930-42.

Statistisches Bundesamt (2017). Gesundheit. Todesursachen in Deutschland 2015. Erschienen am 19.01.2017, korrigiert am 10.03.2017. Artikelnummer: 2120400157004

Su D, Pasalich M, Lee AH, Binns CW. Ovarian cancer risk is reduced by prolonged lactation: a case-control study in southern China, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 97, Issue 2, February 2013, Pages 354–359

Sutter CH, Laughner E, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97 (2000), pp. 4748-4753

Szwedziak K, Szymanski D, Strzelczyk J. CA 125 concentration in portal blood as a predictor of resectability in pancreatic tumor. *Contemp Oncol (Pozn)* 2013;17:394-9.

Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2000 Aug;157(2):411-21.

- Tang L, Yang J, Ng SK, Rodriguez N, Choi PW, Vitonis A, et al. Autoantibody profiling to identify biomarkers of key pathogenic pathways in mucinous ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2010;46:170-9.
- Taylor DD, Gercel-Taylor C, Parker LP. Patient-derived tumor-reactive antibodies as diagnostic markers for ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009;115:112-20.
- Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005; 6: 389-402.
- Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2010 Apr;10(4):267-77.
- Tessitore A, Gaggiano A, Cicciarelli G, Verzella D, Capece D, Fischietti M, et al. Serum biomarkers identification by mass spectrometry in high-mortality tumors. *Int J Proteomics* 2013;2013:125858.
- Testa A, Kaijser J, Wynants L, Fischerova D, Van Holsbeke C, Franchi D, et al. Strategies to diagnose ovarian cancer: New evidence from phase 3 of the multicentre international IOTA study. *Br J Cancer* 2014;111:680-8
- Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T, Mercier J. Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Oct;293(4):E916-22.
- Todenhöfer T, Seiler, R, Stewart C, Moskalev I, Gao J, Ladhar S, Kamyabi A, al Nakouzi N, Hayashi T, Choi S, Wang Y, Frees S, Daugaard M, Oo H, Fisel P, Schwab M, Schaeffeler E, Douglas J, Hennenlotter J, Black P. (2018). Selective Inhibition of the Lactate Transporter MCT4 Reduces Growth of Invasive Bladder Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics.* 17. molcanther.0107.2018.
- Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität (Hrsg.). Maligne Ovarialtumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Zuckschwerdt Verlag München; 2014.
- Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2006 Apr 7;281(14):9030-7.
- Uphoff CC, Drexler HG. Detection of mycoplasma contaminations. *Methods Mol Biol.* 2013;946:1-13.
- van Altena AM, de Hullu JA, Massuger LF. Letter commenting on the article "CA 125 expression pattern, prognosis and correlation with serum CA 125 in ovarian tumor patients" (104:508-515) by Hogdall, et al. and on the Editorial "CA 125: Megadaltons of novel opportunities" (104:505-507). *Gynecol Oncol* 2007;107:355-6.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033 (2009).
- Vijay N, Morse BL, Morris ME. A Novel Monocarboxylate Transporter Inhibitor as a Potential Treatment Strategy for γ -Hydroxybutyric Acid Overdose. *Pharm Res.* 2015 Jun;32(6):1894-906.
- Visser WE, Friesema EC, Visser TJ. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol.* 2011 Jan;25(1):1-14.
- Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2009 Oct;9(10):691-700.
- Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev.* 1997 Jan;77(1):51-74.
- Walenta S, Mueller-Klieser WF. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin Radiat Oncol* 2004;14:267–74.

- Walenta S, Salameh A, Lyng H, Evensen JF, Mitze M, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol*. 1997 Feb;150(2):409-15.
- Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, SundfØr K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res*. 2000 Feb 15;60(4):916-21
- Warburg O, Posener K, and Negelein E. (1924) Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Biochem* 152, 309–44
- Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 24. Februar 1956: 309-314
- Warburg O. Über den Stoffwechsel der Tumoren: Arbeiten aus dem Kaiser-Wilhelm-Institute für Biologie. Springer, 1926.
- Weinhouse S. Z. Krebsforsch. (1976) 87: 115. <https://doi.org/10.1007/BF00284370>
- Wilson MC, Meredith D, Fox JE, Manoharan C, Davies AJ, Halestrap AP. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *J Biol Chem*. 2005 Jul 22;280(29):27213-21.
- Wilson MC, Meredith D, Bunnun C, Sessions RB, Halestrap AP. Studies on the DIDS-binding site of monocarboxylate transporter 1 suggest a homology model of the open conformation and a plausible translocation cycle. *J Biol Chem*. 2009 Jul 24;284(30):20011-21.
- Witkiewicz AK, Whitaker-Menezes D, Dasgupta A, Philp NJ, Lin Z, Gandara R, Sneddon S, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Using the "reverse Warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle*. 2012 Mar 15;11(6):1108-17.
- Wittekind C (Hrsg.). TNM-Klassifikation maligner Tumoren, 8. Auflage. Wiley-VCH Verlag Weinheim; 2017.
- Wittenberger T, Sleigh S, Reisel D, Zikan M, Wahl B, Alunni-Fabbroni M, et al. DNA methylation markers for early detection of women's cancer: Promise and challenges. *Epigenomics* 2014;6:311-27
- Wong CG, Chan KF, Gibson KM, Snead OC. Gamma-hydroxybutyric acid: neurobiology and toxicology of a recreational drug. *Toxicol Rev*. 2004;23(1):3-20.
- Xie YJ, Chen M, Chen SJ. Prediction of pregnancy outcomes with combined ultrasound scanning of yolk sacs and serum CA125 determinations in early threatened abortion. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2014;41:186-9.
- Yokota H, Guo J, Matoba M, Higashi K, Tonami H, Nagao Y. Lactate, choline, and creatine levels measured by *in vitro* 1H-MRS as prognostic parameters in patients with non-small-cell lung cancer. *J Magn Reson Imaging*. 2007 May;25(5):992-9.
- Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 14;98(17):9630-5.
- Zacharakis D, Thomakos N, Biliatis I, Rodolakis A, Simou M, Daskalakis G, et al. Ultrasonographic markers and preoperative CA-125 to distinguish between borderline ovarian tumors and stage I ovarian cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2013;92:285-92.
- Zhang WY, Zhu LR, Zheng YH, Zhou L, Zhang JZ, Wu JH, et al. Study for drug-resistance of epithelial ovarian cancer by serum protein profiling. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2009;89:1326-9.
- Zhao C, Wilson MC, Schuit F, Halestrap AP, Rutter GA. Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas.

Diabetes. 2001 Feb;50(2):361-6.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. 1999 Nov 15;59(22):5830-5.

Zhou S, Kachhap S, Sun W, Wu G, Chuang A, Poeta L, Grumbine L, Mithani SK, Chatterjee A, Koch W, Westra WH, Maitra A, Glazer C, Carducci M, Sidransky D, McFate T, Verma A, Califano JA. Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May 1;104(18):7540-5.

Ziebart T, Walenta S, Kunkel M, Reichert TE, Wagner W, Mueller-Klieser W. Metabolic and proteomic differentials in head and neck squamous cell carcinomas and normal gingival tissue. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Feb;137(2):193-9.

Ziganshin RKh, Alekseev DG, Arapidi GP, Ivanov VT, Moshkovskii SA, Govorun VM. Serum proteome profiling for ovarian cancer diagnosis using ClinProt magnetic bead technique and MALDI-TOF-mass-spectrometry. *Biomed Khim* 2008;54:408-19

8 Anhang

8.1 Metabolische Untersuchungen

Tabelle 10: Einzeldaten der Versuche mit IGROV-1 und α -CHC am GL-2-Analysator.

Die für die Zellzahlen angegebenen Werte sind mit dem Faktor 100.000 (E+05) zu multiplizieren.

G = Glukose [mmol/l]. L = Laktat [mmol/l]. Z = Zellzahl.

Ver- such	Konz. α -CHC [mM]	0 h			2 h			4 h			24 h			
		#1	G	0	11,4	11,5	11,5	10,5	10,5	10,6	9,70	10,0	9,80	7,08
	G	10	11,4	11,4	11,4	10,7	10,8	10,8	10,1	10,2	10,2	8,15	8,09	7,96
	G	20	11,2	11,2	11,3	10,9	10,8	11,0	10,5	10,3	10,5	8,82	8,81	8,93
	G	30	11,4	11,4	11,5	11,2	11,3	11,4	11,1	11,2	11,2	9,60	9,64	9,87
	L	0	1,19	1,15	1,11	1,83	1,80	1,97	2,53	2,69	2,47	6,15	6,02	5,68
	L	10	1,14	1,15	1,15	1,70	1,75	1,62	2,17	2,02	2,15	5,10	4,83	4,83
	L	20	1,18	1,16	1,16	1,47	1,59	1,39	1,85	1,87	1,90	4,05	3,92	3,74
	L	30	1,17	1,11	1,14	1,38	1,38	1,27	1,53	1,51	1,47	3,23	2,92	3,25
	Z	0	2,08	2,49	2,03	1,96	2,33	2,43	2,10	2,69	2,55	3,94	3,81	4,09
	Z	10	2,21	2,16	2,16	1,99	1,93	1,99	2,18	2,40	2,47	3,49	3,50	3,53
	Z	20	2,04	2,11	2,05	2,43	2,20	2,15	2,55	2,42	2,10	2,94	2,65	3,01
	Z	30	2,48	2,04	2,05	2,28	1,94	2,38	2,28	2,27	2,61	2,81	2,97	2,70
#2	G	0	11,7	11,7	11,4	10,9	10,7	10,7	10,1	9,83	9,93	7,06	7,51	7,26
	G	10	11,5	11,5	11,5	10,8	10,8	10,9	10,0	10,1	10,2	8,34	8,37	8,32
	G	20	11,5	11,7	11,4	10,9	11,3	11,0	10,5	10,9	10,5	9,22	8,87	8,94
	G	30	11,5	11,5	11,3	11,4	11,4	11,2	11,3	11,2	11,0	9,63	9,71	9,56
	L	0	1,17	1,18	1,15	1,93	1,99	1,94	2,63	2,49	2,50	5,88	6,09	6,08
	L	10	1,15	1,13	1,15	1,76	1,82	1,82	2,07	2,11	2,03	4,76	5,05	4,86
	L	20	1,12	1,17	1,14	1,68	1,62	1,53	1,91	1,75	1,93	3,87	3,69	3,66
	L	30	1,15	1,17	1,19	1,31	1,34	1,37	1,49	1,56	1,53	3,29	3,19	3,36
	Z	0	2,26	2,13	2,15	1,90	2,34	2,06	2,45	2,49	2,47	3,64	3,61	3,36
	Z	10	2,13	2,13	2,25	2,12	2,30	2,22	2,02	2,29	2,40	2,89	2,94	3,08
	Z	20	2,00	2,13	1,91	2,05	2,25	2,43	2,22	2,41	2,31	2,60	2,75	2,75
	Z	30	2,02	2,13	2,26	2,19	2,24	2,35	2,47	2,10	2,23	2,78	2,52	2,56
	G	0	11,4	11,2	11,4	10,6	10,5	10,6	9,82	9,83	9,88	7,48	7,15	7,02
	G	10	11,3	11,2	11,4	10,8	10,6	10,8	10,2	10	10,1	8,48	7,83	7,88
	G	20	11,5	11,4	11,4	10,9	11,1	11,0	10,5	10,7	10,6	9,24	8,59	8,65
	G	30	11,3	11,4	11,5	11,2	11,2	11,3	11,0	11,1	11,2	9,71	9,70	9,90
	L	0	1,17	1,17	1,17	2,07	1,84	1,94	2,69	2,62	2,45	5,92	6,00	5,80

#3	L	10	1,17	1,19	1,19	1,82	1,72	1,89	2,18	1,91	2,02	4,88	5,05	5,33
		20	1,11	1,17	1,19	1,52	1,55	1,61	1,81	1,88	1,83	4,28	4,41	4,00
		30	1,18	1,17	1,13	1,38	1,32	1,28	1,44	1,47	1,48	3,41	3,06	3,13
	Z	0	2,06	2,13	2,15	1,90	2,34	2,06	2,45	2,49	2,47	3,58	3,54	3,71
		10	2,13	2,13	2,25	2,12	2,30	2,22	2,52	2,29	2,40	3,51	3,54	3,72
		20	2,00	2,13	1,91	2,40	2,25	2,43	2,22	2,41	2,31	3,07	2,99	3,11
		30	2,02	2,13	2,26	2,19	2,24	2,35	1,97	2,10	2,23	2,55	2,66	2,72

Tabelle 11: Einzeldaten der Versuche mit OC316 und α -CHC am GL-2-Analysator.

Die für die Zellzahlen angegebenen Werte sind mit dem Faktor 100.000 (E+05) zu multiplizieren.

G = Glukose [mmol/l]. L = Laktat [mmol/l]. Z = Zellzahl.

Ver- such	Konz. α -CHC [mM]	0 h			2 h			4 h			24 h			
#1	G	0	11,7	11,9	11,7	10,9	10,9	10,9	10,3	10,1	9,86	6,22	6,47	6,24
		10	11,5	11,1	11,7	10,8	10,4	10,9	10,0	9,91	10,1	6,82	7,01	7,63
		20	11,7	11,5	11,5	11,1	11,0	11,0	10,6	10,7	10,6	8,43	8,61	8,42
		30	11,5	11,4	11,4	11,4	11,2	11,3	11,3	11,1	11,2	9,50	9,18	9,46
	L	0	1,22	1,14	1,26	1,95	1,92	2,01	2,73	2,65	2,70	8,50	9,21	8,61
		10	1,23	1,12	1,23	1,75	1,74	1,74	2,23	2,30	2,30	7,33	7,62	7,22
		20	1,26	1,34	1,40	1,50	1,62	1,52	1,95	1,88	2,03	5,87	5,60	5,10
		30	1,24	1,27	1,23	1,47	1,49	1,56	1,65	1,78	1,88	4,23	4,05	4,28
	Z	0	2,52	2,36	2,64	2,12	2,73	2,71	2,30	3,00	2,87	3,56	3,51	3,53
		10	2,72	2,52	2,22	2,74	2,11	2,04	2,79	2,46	2,36	3,54	3,71	3,52
		20	2,54	2,28	2,25	2,23	1,76	2,25	2,62	2,17	2,22	3,13	3,55	3,07
		30	2,32	2,26	2,28	2,16	2,08	2,04	2,37	2,43	2,03	2,92	2,84	2,86
#2	G	0	11,1	11,3	11,4	10,5	10,4	10,5	9,85	9,87	9,50	5,96	5,78	5,91
		10	11,4	11,7	11,4	10,7	10,9	10,8	10,0	10,1	10,1	7,16	7,17	7,00
		20	11,4	11,7	11,2	11,0	11,2	10,9	10,6	10,8	10,5	8,25	7,93	8,04
		30	11,6	11,9	11,7	11,5	11,7	11,6	11,4	11,5	11,4	9,54	9,40	9,26
	L	0	1,52	1,46	1,52	2,09	2,01	2,13	2,49	2,55	2,65	9,41	9,52	9,50
		10	1,54	1,49	1,46	1,90	1,92	1,98	2,13	2,18	2,27	7,88	7,63	7,99
		20	1,39	1,47	1,44	1,76	1,72	1,64	2,07	1,92	1,88	6,33	6,30	6,10
		30	1,46	1,45	1,38	1,66	1,62	1,62	1,86	1,77	1,81	5,20	5,01	5,31
	Z	0	2,68	2,68	2,59	2,74	2,55	2,76	2,71	3,02	3,02	3,78	3,84	3,49
		10	2,74	2,50	2,78	2,83	2,73	2,83	2,90	2,97	2,82	3,62	3,71	3,86
		20	2,65	2,14	2,43	2,55	2,55	2,38	2,95	2,82	2,86	3,35	3,33	3,49
		30	2,31	2,44	2,50	2,63	2,26	2,39	2,13	2,19	2,22	3,09	2,83	2,90
	0	11,7	11,9	11,3	11,0	10,8	10,4	10,0	10,1	9,71	6,15	6,42	6,31	
	10	11,3	11,8	11,5	10,7	11,1	10,8	10,2	10,3	10,1	7,03	7,18	7,08	

#3	G	20	11,2	11,5	11,2	10,7	11,0	10,7	10,3	10,6	10,3	8,09	8,54	7,95
		30	11,1	11,5	11,5	11,0	11,3	11,3	10,8	11,1	11,1	9,10	9,03	9,19
	L	0	1,32	1,27	1,34	1,81	2,01	1,91	2,32	2,67	2,44	9,20	8,80	8,80
		10	1,25	1,13	1,32	1,75	1,81	1,84	2,13	2,02	1,93	7,30	7,70	7,90
		20	1,21	1,15	1,15	1,64	1,60	1,66	1,70	1,87	1,65	5,30	5,60	5,40
		30	1,20	1,16	1,21	1,38	1,40	1,45	1,63	1,73	1,64	4,31	4,62	4,79
	Z	0	2,34	2,40	2,20	2,15	2,60	2,50	2,30	2,54	2,88	3,68	3,52	3,41
		10	2,31	2,56	2,68	2,12	2,35	2,29	2,34	2,28	2,39	3,17	3,49	3,43
		20	2,49	2,35	2,58	2,16	2,15	2,22	2,19	2,23	2,16	3,04	2,90	3,00
		30	2,58	2,35	2,50	2,36	2,14	1,81	2,03	2,34	1,92	2,89	2,93	2,72

Tabelle 12: Einzeldaten der Versuche mit IGROV-1 und AR-C155858 am GL-2-Analysator.

Die für die Zellzahlen angegebenen Werte sind mit dem Faktor 100.000 (E+05) zu multiplizieren.

G = Glukose [mmol/l]. L = Laktat [mmol/l]. Z = Zellzahl.

Ver- such	Konz. AR-C [nM]	0 h				2 h				4 h				24 h			
#1	G	0	11,5	11,5	11,5	10,8	10,9	11,5	10,0	10,7	10,5	7,38	7,11	7,04			
		10	11,5	11,1	11,5	10,5	11,0	10,6	10,8	10,9	10,0	8,25	7,80	7,95			
		50	11,1	11,3	11,6	10,6	10,8	11,2	10,8	10,7	10,6	8,80	8,94	9,20			
		300	11,5	11,6	11,7	11,4	11,5	11,6	11,3	11,4	11,5	9,90	9,91	10,2			
	L	0	1,14	1,12	1,14	1,38	1,48	1,45	1,96	1,98	2,14	5,72	6,09	5,83			
		10	1,18	1,12	1,18	1,42	1,41	1,36	1,86	1,88	1,80	5,21	5,20	4,90			
		50	1,13	1,11	1,18	1,35	1,32	1,30	1,70	1,65	1,66	4,03	3,97	4,06			
		300	1,12	1,19	1,19	1,26	1,27	1,31	1,42	1,43	1,46	3,00	2,83	2,78			
	Z	0	1,79	1,76	1,81	1,82	1,82	1,73	2,02	1,91	1,97	3,79	3,79	3,83			
		10	1,82	1,79	1,87	1,86	1,82	1,75	2,00	2,04	1,92	3,38	3,33	3,39			
		50	1,72	1,89	1,82	1,92	1,84	1,92	2,00	2,00	1,99	2,73	2,75	2,87			
		300	1,91	1,88	1,86	1,97	1,91	1,94	1,92	1,96	2,05	2,36	2,41	2,48			
#2	G	0	11,7	11,5	11,1	11,4	11,2	10,7	11,0	10,7	10,5	7,30	7,02	7,00			
		10	11,7	11,5	11,1	10,9	10,8	10,8	10,0	10,6	10,6	8,56	8,12	7,74			
		50	11,5	11,2	11,3	10,9	11,1	11,1	11,2	10,1	10,6	8,90	8,81	8,60			
		300	11,6	11,5	11,2	11,5	11,3	11,1	11,4	11,2	11,0	9,70	9,80	10,0			
	L	0	1,14	1,11	1,15	1,45	1,54	1,47	1,86	1,78	1,84	6,18	5,97	5,90			
		10	1,13	1,19	1,13	1,41	1,43	1,35	1,66	1,68	1,70	4,80	4,99	5,06			
		50	1,19	1,19	1,11	1,32	1,44	1,34	1,60	1,65	1,59	4,35	3,95	4,18			
		300	1,17	1,14	1,13	1,31	1,26	1,33	1,42	1,36	1,51	2,78	3,10	2,91			
	Z	0	1,94	2,11	1,92	2,21	2,20	2,16	2,21	2,23	2,24	3,61	4,02	4,06			
		10	1,70	2,01	2,11	2,21	2,31	2,12	2,23	2,33	2,15	3,17	3,50	3,50			
		50	2,17	2,32	2,11	2,26	2,24	2,10	2,26	2,20	2,20	3,11	3,02	3,06			

		300	2,13	2,30	2,17	2,17	2,32	2,19	2,31	2,22	2,15	2,52	2,67	2,58
#3	G	0	11,2	11,5	11,4	10,4	10,6	10,6	10,3	10,3	10,7	7,11	7,21	7,29
		10	11,5	11,8	11,7	10,4	10,6	10,5	10,2	10,4	10,9	8,01	7,83	8,54
		50	11,4	11,1	11,4	10,9	10,9	11,3	10,9	10,7	11,1	8,76	8,32	8,94
		300	11,5	11,2	11,7	11,4	11,1	11,6	11,2	11,0	11,4	9,91	9,60	10,3
	L	0	1,19	1,15	1,12	1,22	1,21	1,32	1,76	1,77	1,71	5,91	6,46	6,14
		10	1,11	1,19	1,18	1,24	1,24	1,26	1,54	1,64	1,65	5,17	4,79	4,86
		50	1,18	1,11	1,12	1,32	1,35	1,33	1,53	1,54	1,50	4,01	4,05	3,98
		300	1,12	1,13	1,12	1,27	1,26	1,25	1,46	1,44	1,35	3,09	2,90	2,74
	Z	0	2,17	2,21	2,26	2,26	2,28	2,24	2,39	2,41	2,47	3,96	4,00	4,06
		10	2,26	2,11	2,18	2,21	2,31	2,20	2,41	2,43	2,46	3,55	3,96	3,53
		50	2,22	2,14	2,18	2,24	2,26	2,25	2,46	2,40	2,38	3,02	3,03	3,05
		300	2,06	2,26	2,19	2,25	2,31	2,27	2,46	2,44	2,35	2,59	2,45	2,45

Tabelle 13: Einzeldaten der Versuche mit OC316 und AR-C155858 am GL-2-Analysator.

Die für die Zellzahlen angegebenen Werte sind mit dem Faktor 100.000 (E+05) zu multiplizieren.

G = Glukose [mmol/l]. L = Laktat [mmol/l]. Z = Zellzahl.

Ver- such	Konz. AR-C [nM]	0 h				2 h				4 h			24 h		
#1	G	0	11,2	11,7	11,1	10,9	11,2	10,6	11,0	11,3	10,7	5,75	6,47	5,75	
		10	11,4	11,3	11,5	10,8	11,0	11,1	10,3	10,9	10,6	6,95	7,25	7,13	
		100	11,4	11,9	11,1	11,2	11,6	10,7	10,8	9,97	10,8	8,53	8,87	8,03	
		1000	11,6	11,5	11,5	11,4	11,4	11,4	11,2	11,3	11,3	9,57	9,50	9,39	
	L	0	1,18	1,15	1,16	1,93	1,88	1,80	2,46	2,74	2,90	8,81	9,01	9,11	
		10	1,19	1,14	1,13	1,72	1,70	1,69	2,31	2,54	2,50	6,92	7,23	6,72	
		100	1,14	1,15	1,19	1,72	1,88	1,76	2,16	2,15	2,07	5,10	5,74	5,95	
		1000	1,17	1,15	1,15	1,31	1,40	1,29	1,51	1,61	1,52	4,35	3,85	4,28	
	Z	0	2,01	2,16	2,14	2,08	1,91	2,12	2,26	2,22	2,17	4,06	4,16	4,28	
		10	2,02	2,11	2,02	2,11	2,06	2,02	2,01	2,26	2,21	3,59	3,77	3,66	
		100	2,02	1,97	2,11	2,23	1,99	2,11	2,17	2,21	2,08	3,17	3,24	3,33	
		1000	2,08	2,02	2,12	2,06	2,17	2,00	2,18	2,06	2,02	2,89	2,72	2,79	
#2	G	0	11,4	11,9	11,8	10,8	11,1	10,9	11,0	11,3	10,7	6,08	6,18	6,50	
		10	11,5	11,4	11,5	11,0	10,8	10,9	10,3	10,9	10,6	7,17	6,86	7,23	
		100	11,2	11,3	11,1	10,8	10,9	10,9	10,8	9,97	10,8	7,92	8,57	8,06	
		1000	11,5	11,1	11,6	11,3	10,9	11,4	11,1	10,8	11,3	9,39	9,27	9,54	
	L	0	1,18	1,16	1,17	1,94	1,80	1,89	2,46	2,74	2,90	9,04	9,43	9,01	
		10	1,19	1,13	1,15	1,85	1,71	1,81	2,31	2,54	2,50	6,92	7,12	7,62	
		100	1,16	1,12	1,15	1,76	1,66	1,70	2,06	2,15	2,07	5,03	5,72	5,22	
		1000	1,16	1,17	1,16	1,49	1,46	1,53	1,81	1,81	1,76	3,99	4,25	4,37	

	Z	0	2,21	2,28	2,16	2,24	2,31	2,30	2,31	2,41	2,39	4,21	4,13	4,20
		10	2,17	2,28	2,17	2,30	2,31	2,15	2,41	2,37	2,32	3,76	3,72	3,66
		100	2,26	2,30	2,20	2,17	2,30	2,23	2,33	2,45	2,39	3,31	3,26	3,36
		1000	2,20	2,21	2,19	2,21	2,29	2,28	2,38	2,39	2,35	2,65	2,74	2,74
#3	G	0	11,5	11,7	11,6	10,8	10,5	11,0	10,1	9,90	9,70	6,04	6,48	5,80
		10	11,9	11,3	11,5	11,2	10,9	10,7	10,8	10,4	10,0	7,39	7,14	7,40
		100	11,2	11,8	11,6	11,0	11,4	11,1	10,6	10,9	10,6	8,37	8,86	8,90
		1000	11,5	11,8	11,3	11,3	11,6	11,1	11,1	11,5	10,9	9,40	9,75	9,52
	L	0	1,14	1,12	1,15	1,84	1,95	1,92	2,88	2,92	2,94	8,83	8,62	8,50
		10	1,1	1,14	1,12	1,88	1,93	1,78	2,73	2,71	2,70	7,11	6,54	7,11
		100	1,13	1,16	1,13	1,71	1,63	1,67	2,18	2,28	2,12	5,41	5,30	5,44
		1000	1,15	1,13	1,15	1,45	1,39	1,38	1,60	1,63	1,56	4,43	4,49	4,42
	Z	0	2,29	2,16	2,28	2,31	2,35	2,28	2,41	2,44	2,45	4,12	4,08	4,05
		10	2,36	2,21	2,25	2,33	2,40	2,29	2,39	2,36	2,51	3,64	3,52	3,56
		100	2,33	2,25	1,95	2,30	2,40	2,29	2,52	2,41	2,47	3,14	3,00	3,21
		1000	2,21	2,26	2,29	2,36	2,25	2,29	2,46	2,47	2,45	2,52	2,68	2,67

Tabelle 14: Einzeldaten der Versuche mit OC316 shRNA und AR-C155858 am GL-2-Analysator.

Die für die Zellzahlen angegebenen Werte sind mit dem Faktor 100.000 (E+05) zu multiplizieren.

G = Glukose [mmol/l]. L = Laktat [mmol/l]. Z = Zellzahl.

Ver- such	Konz. AR-C [nM]	0 h			2 h			4 h			24 h			
#1	G	0	11,3	11,7	11,6	10,5	11,0	10,7	9,70	10,2	9,90	8,59	8,77	8,74
		10	11,6	11,9	11,3	11,1	11,0	11,0	10,3	10,1	10,4	9,32	9,31	8,99
		100	11,1	11,5	11,6	10,8	11,1	11,1	10,5	10,6	10,7	9,57	9,62	9,88
		1000	11,6	11,5	11,3	11,5	11,4	11,2	11,4	11,3	11,1	10,6	10,2	10,2
	L	0	1,12	1,18	1,18	2,04	1,89	2,08	2,36	2,55	2,60	5,09	5,19	5,07
		10	1,16	1,15	1,14	1,79	1,61	1,82	1,94	2,19	1,90	4,29	4,10	4,47
		100	1,11	1,13	1,14	1,60	1,58	1,68	1,87	1,72	1,82	3,19	3,64	3,57
		1000	1,15	1,14	1,19	1,27	1,31	1,32	1,35	1,46	1,41	2,81	2,82	2,94
	Z	0	2,42	2,41	2,40	2,39	2,45	2,55	2,71	2,47	2,38	4,22	4,22	4,25
		10	2,74	2,65	2,84	2,53	2,56	2,33	2,37	2,49	2,63	3,78	3,91	3,96
		100	2,61	2,60	2,82	2,37	2,45	2,45	2,71	2,41	2,37	3,41	3,27	3,27
		1000	2,11	2,21	2,24	2,62	2,53	2,33	2,61	2,27	2,29	2,86	2,92	2,91
	G	0	11,6	11,9	11,8	10,6	11,0	11,0	9,72	9,95	9,96	8,83	8,77	9,02
		10	11,7	11,6	11,9	10,9	11,0	11,2	9,96	10,2	10,5	9,37	9,13	9,25
		100	11,2	11,5	11,1	10,9	11,0	10,7	10,6	10,6	10,3	9,82	9,78	9,71
		1000	11,8	11,9	11,5	11,7	11,8	11,4	11,5	11,7	11,3	10,5	10,5	10,4
0		1,18	1,15	1,15	1,86	2,01	2,00	2,57	2,52	2,35	5,21	5,21	5,05	

#2	L	10	1,15	1,15	1,19	1,72	1,67	1,72	1,84	1,78	1,87	4,26	4,11	4,39
		100	1,15	1,16	1,15	1,45	1,52	1,51	1,73	1,88	1,74	3,2	3,43	3,51
		1000	1,11	1,15	1,16	1,23	1,24	1,27	1,34	1,34	1,36	2,72	2,71	2,81
	Z	0	1,92	2,26	2,17	2,51	2,38	2,29	2,89	2,73	2,75	4,02	4,00	4,05
		10	2,19	2,18	2,16	2,41	2,45	2,47	2,78	2,77	2,80	3,51	3,56	3,99
		100	2,22	2,10	2,17	2,44	2,48	2,45	2,84	2,75	2,76	3,06	3,12	3,11
		1000	2,23	2,42	2,19	2,51	2,40	2,44	2,78	2,76	2,83	2,82	2,93	2,82
#3	G	0	11,4	11,4	11,5	10,2	10,5	10,7	9,33	9,94	10,1	8,37	8,75	8,68
		10	11,3	11,3	11,4	10,6	10,6	10,7	10,0	10,0	10,1	9,07	9,45	9,40
		100	11,8	11,6	11,4	11,2	11,3	11,0	10,8	11,0	10,6	10,1	9,78	9,99
		1000	11,2	11,7	11,5	11,2	11,6	11,3	11,1	11,5	11,2	10,1	10,3	10,4
	L	0	1,14	1,19	1,12	1,97	1,95	2,08	2,53	2,72	2,61	4,93	4,79	5,03
		10	1,16	1,15	1,12	1,73	1,84	1,82	2,12	2,09	1,96	4,32	4,09	4,09
		100	1,15	1,11	1,18	1,55	1,58	1,55	1,81	1,89	1,75	3,43	3,14	3,65
		1000	1,13	1,13	1,18	1,29	1,32	1,30	1,39	1,49	1,50	2,73	2,69	2,56
	Z	0	2,21	2,24	2,26	2,45	2,47	2,01	2,74	2,82	2,87	4,41	4,29	4,29
		10	2,31	2,20	2,28	2,38	2,29	2,34	2,80	2,72	2,75	3,89	3,73	3,90
		100	2,01	2,31	2,33	2,39	2,53	2,37	2,57	2,69	2,70	3,38	3,38	3,41
		1000	2,21	2,23	2,26	2,33	2,12	2,40	2,54	2,47	2,52	2,83	3,01	2,91

Tabelle 15: Einzeldaten der Versuche mit OC316 shMCT4 und AR-C155858 am GL-2-Analysator.

Die für die Zellzahlen angegebenen Werte sind mit dem Faktor 100.000 (E+05) zu multiplizieren.

G = Glukose [mmol/l]. L = Laktat [mmol/l]. Z = Zellzahl.

Ver- such	Konz. AR-C [nM]	0 h			2 h			4 h			24 h			
#1	G	0	11,7	11,5	11,7	11,0	10,2	10,8	10,2	9,70	9,80	6,07	6,44	6,25
		10	11,1	11,8	11,5	10,8	11,0	11,2	10,2	10,6	10,7	7,04	7,69	7,28
		100	11,9	11,7	11,5	11,3	11,2	11,0	11,0	10,6	10,7	8,90	8,54	9,18
		1000	11,4	11,7	11,7	11,2	11,5	11,5	11,0	11,4	11,4	9,92	9,90	9,80
	L	0	1,19	1,11	1,13	1,67	1,59	1,71	2,70	2,28	2,49	9,30	9,38	9,31
		10	1,19	1,19	1,13	1,60	1,51	1,68	2,07	2,05	2,25	7,16	7,15	7,13
		100	1,11	1,19	1,14	1,43	1,57	1,49	1,82	1,73	1,72	5,14	5,36	5,70
		1000	1,16	1,15	1,14	1,26	1,32	1,32	1,46	1,55	1,51	3,02	3,45	3,49
	Z	0	2,02	2,03	2,20	2,39	2,10	2,22	2,34	2,28	2,25	4,27	4,13	4,21
		10	2,20	2,15	2,04	2,13	2,12	2,05	2,14	2,29	2,28	3,54	3,58	3,77
		100	2,31	2,35	2,23	2,40	2,34	2,20	2,30	2,30	2,41	3,17	3,46	3,19
		1000	2,20	2,34	2,50	2,11	2,36	2,15	2,26	2,24	2,29	2,73	2,81	2,85
		0	11,7	11,4	11,7	10,9	10,5	10,7	10,0	10,0	9,80	6,37	6,04	6,35
		10	11,1	11,8	11,4	10,7	11,2	10,8	10,3	10,6	10,0	7,04	7,55	7,38

#2	G	100	11,9	11,7	11,5	11,3	11,4	11,1	11,0	10,8	10,7	8,60	8,44	8,58	
		1000	11,4	11,7	11,7	11,3	11,5	11,6	11,2	11,4	11,4	9,93	9,83	10,1	
	L	0	1,10	1,13	1,18	1,77	1,90	1,92	2,47	2,61	2,64	9,58	9,78	9,23	
		10	1,10	1,16	1,19	1,71	1,63	1,67	2,14	2,05	1,94	7,54	6,89	7,05	
		100	1,14	1,16	1,17	1,49	1,42	1,41	1,86	1,88	1,98	5,58	4,94	4,60	
	Z	0	2,02	2,03	2,20	2,39	2,10	2,22	2,34	2,28	2,25	4,27	4,13	4,21	
		10	2,20	2,15	2,04	2,13	2,12	2,05	2,14	2,29	2,28	3,54	3,58	3,77	
		100	2,31	2,35	2,23	2,40	2,34	2,20	2,30	2,30	2,41	3,17	3,46	3,44	
		1000	2,20	2,34	2,50	2,11	2,36	2,15	2,26	2,24	2,29	2,73	2,81	2,85	
	#3	G	0	11,1	11,5	11,4	10,4	10,5	10,6	9,62	10,1	9,80	6,11	6,50	6,18
			10	11,4	11,5	11,4	10,7	10,6	10,8	10,1	9,90	9,89	8,09	7,76	7,54
			100	11,6	11,4	11,6	11,0	10,9	11,2	9,99	10,3	10,5	9,13	9,18	9,17
1000			11,5	11,5	11,3	11,4	11,4	11,2	11,3	11,3	11,1	9,78	9,94	9,74	
L		0	1,19	1,17	1,16	1,63	1,75	1,84	2,37	2,40	2,76	9,85	9,75	9,8	
		10	1,17	1,14	1,14	1,56	1,61	1,61	1,95	2,07	1,81	6,85	7,02	7,69	
		100	1,15	1,16	1,15	1,52	1,55	1,48	1,74	1,92	1,88	4,87	5,08	5,09	
		1000	1,19	1,13	1,17	1,38	1,37	1,40	1,47	1,46	1,49	3,41	4,02	3,04	
Z		0	2,29	2,36	2,24	2,43	2,51	2,48	2,62	2,56	2,55	4,09	4,11	4,44	
		10	2,35	2,42	2,38	2,36	2,43	2,33	2,50	2,54	2,56	3,52	3,62	4,00	
		100	2,28	2,44	2,39	2,36	2,42	2,67	2,41	2,39	2,40	3,31	3,21	3,35	
		1000	2,31	2,40	2,43	2,24	2,14	2,23	2,31	2,40	2,34	2,50	2,97	2,70	

Tabelle 16: ECAR-Einzeldaten der Messungen mit IGROV-1 und OC316 unter α -CHC am XF Analyser 24/3.

Messung	Konz. α -CHC [mM]	IGROV-1			OC316		
		Versuch #1 ECAR [mpH/min]	Versuch #2 ECAR [mpH/min]	Versuch #3 ECAR [mpH/min]	Versuch #1 ECAR [mpH/min]	Versuch #2 ECAR [mpH/min]	Versuch #3 ECAR [mpH/min]
1	0	24,22	23,55	24,43	51,30	49,25	48,58
2		23,53	24,11	24,60	50,66	45,01	48,58
3		23,78	23,46	24,13	50,33	48,98	47,76
4		24,33	23,47	24,36	51,16	49,30	46,82
5		24,00	23,77	23,31	50,97	48,95	47,81
6		24,47	24,64	23,55	50,82	49,09	45,56
7		24,04	23,08	22,39	51,16	48,41	46,66
8	10	17,44	14,85	14,81	38,86	38,58	36,01
9		22,14	20,95	17,57	43,05	42,02	42,28
10		20,70	23,45	22,03	42,81	40,99	42,63
11		21,23	21,02	21,96	43,11	42,63	41,18
12		21,31	22,76	23,24	43,33	41,77	42,53
13		21,14	21,70	23,04	43,30	41,29	40,90

14		22,06	21,86	23,58	44,08	41,51	42,39
15	20	16,66	10,73	10,83	29,75	33,54	31,80
16		16,74	17,63	14,37	35,83	35,36	35,14
17		17,21	17,46	15,84	36,70	34,77	35,31
18		16,17	19,09	16,38	35,52	33,73	34,80
19		16,67	17,79	16,81	34,60	34,82	36,16
20		16,56	17,28	16,71	35,81	35,42	36,20
21		16,61	16,94	19,16	35,81	34,64	27,79
22	30	14,57	10,09	11,40	24,67	26,01	28,39
23		13,71	12,54	13,47	28,12	28,74	30,96
24		13,37	14,47	11,93	27,65	28,43	30,51
25		13,57	14,35	10,88	27,27	27,85	29,76
26		13,40	14,79	12,58	27,56	21,16	29,42
27		13,23	14,85	12,93	27,64	17,06	28,85
28		13,19	14,73	14,21	27,63	18,96	29,57

Tabelle 17: OCR-Einzeldaten der Messungen mit IGROV-1 und OC316 unter α -CHC am XF Analyzer 24/3.

Messung	Konz. α -CHC [mM]	IGROV-1			OC316		
		Versuch #1 OCR [pmol/min]	Versuch #2 OCR [pmol/min]	Versuch #3 OCR [pmol/min]	Versuch #1 OCR [pmol/min]	Versuch #2 OCR [pmol/min]	Versuch #3 OCR [pmol/min]
1	0	139,89	146,33	133,00	201,61	208,92	204,32
2		138,10	144,49	135,89	192,79	212,66	205,03
3		142,72	145,93	135,74	194,15	214,70	204,70
4		141,04	144,08	134,71	194,72	217,91	205,22
5		141,79	139,56	136,16	191,62	209,66	203,81
6		139,77	138,19	135,94	201,76	213,69	206,53
7		140,30	137,51	138,07	202,50	213,28	205,52
8	10	106,99	110,47	103,09	173,00	174,51	177,17
9		111,38	106,94	111,97	175,03	173,54	172,43
10		114,20	111,29	111,04	175,67	176,07	175,35
11		109,62	107,22	109,96	177,18	174,84	175,59
12		111,19	108,89	110,04	176,80	174,14	172,65
13		109,91	111,08	105,68	177,21	176,45	175,58
14		110,00	106,36	107,19	177,22	174,90	173,26
15	20	90,75	86,59	89,65	145,52	145,28	145,86
16		86,95	89,42	93,80	145,33	143,98	143,17
17		89,81	89,15	91,77	145,43	145,78	144,28
18		91,48	80,76	99,16	144,27	146,00	145,82
19		91,93	89,72	97,14	144,11	146,46	140,54
20		90,19	84,47	90,56	145,46	143,46	147,84
21		90,10	86,82	87,56	145,45	142,18	121,72
22	30	81,87	87,23	85,77	128,18	121,11	121,35
23		86,47	84,29	84,37	128,39	125,47	123,19
24		83,22	85,94	81,21	124,31	120,58	120,42
25		82,80	83,64	91,63	126,36	116,49	119,46

26		84,19	85,06	84,86	122,92	121,40	122,41
27		83,50	81,10	88,16	124,33	117,50	120,53
28		83,60	87,65	85,12	124,34	118,59	120,66

Tabelle 18: ECAR-Einzeldaten der Messungen mit IGROV-1 und OC316 unter AR-C155858 am XF Analyzer 24/3.

Messung	Konz. AR-C [nM]	IGROV-1			OC316		
		Versuch #1 ECAR [mpH/min]	Versuch #2 ECAR [mpH/min]	Versuch #3 ECAR [mpH/min]	Versuch #1 ECAR [mpH/min]	Versuch #2 ECAR [mpH/min]	Versuch #3 ECAR [mpH/min]
1	0	25,44	23,89	24,47	51,32	47,33	52,20
2		24,48	24,22	25,40	52,74	46,79	51,85
3		23,67	24,30	25,89	51,11	47,13	51,48
4		24,58	24,65	25,19	51,04	47,88	51,83
5		23,08	24,53	24,76	50,92	47,87	51,78
6		24,34	24,46	24,58	50,94	47,45	51,04
7		24,12	24,61	24,46	51,07	47,33	51,26
8	10	19,30	19,42	20,74	39,01	41,77	40,70
9		21,20	19,31	20,53	38,65	41,60	40,68
10		19,86	19,66	20,25	40,17	42,02	38,59
11		19,85	19,64	18,66	40,60	41,92	39,33
12		20,67	19,82	19,13	40,36	42,97	40,14
13		20,77	19,61	18,87	40,95	41,86	39,77
14		20,40	20,12	18,83	39,82	41,54	40,41
15	50 (IGROV-1) bzw. 100 (OC316)	18,35	17,68	17,21	33,79	32,75	30,81
16		17,22	15,27	16,87	33,14	28,77	31,16
17		17,17	14,85	17,16	31,52	31,72	30,70
18		16,73	15,04	16,49	31,37	29,33	30,15
19		17,42	15,40	17,48	31,35	31,19	30,77
20		17,89	15,51	17,23	30,52	31,52	29,77
21		17,22	14,52	17,70	30,45	31,19	26,29
22	300 (IGROV-1) bzw. 1000 (OC316)	14,02	11,96	15,26	26,74	26,09	25,41
23		13,50	12,07	15,31	26,86	28,04	25,85
24		14,75	12,43	14,88	25,97	27,28	24,53
25		14,97	12,30	14,97	26,55	27,63	24,96
26		14,31	12,46	14,59	24,01	26,61	26,50
27		14,32	11,86	15,25	25,63	28,35	24,64
28		14,36	12,27	14,98	25,91	27,30	26,55

Tabelle 19: OCR-Einzeldaten der Messungen mit IGROV-1 und OC316 unter AR-C155858 am XF Analyzer 24/3.

Messung	Konz. AR-C [nM]	IGROV-1			OC316		
		Versuch #1 OCR [pmol/min]	Versuch #2 OCR [pmol/min]	Versuch #3 OCR [pmol/min]	Versuch #1 OCR [pmol/min]	Versuch #2 OCR [pmol/min]	Versuch #3 OCR [pmol/min]
26							
27							
28							

1	0	144,60	142,46	140,19	206,89	191,22	201,08
2		144,64	142,33	139,95	211,71	192,58	201,75
3		144,46	144,99	130,52	206,17	198,68	201,49
4		144,56	142,01	137,41	206,62	196,12	197,69
5		147,00	143,07	128,78	207,73	198,83	202,72
6		141,91	142,76	133,11	205,88	202,21	199,56
7		127,51	144,54	124,58	202,20	195,69	194,39
8	10	119,97	119,37	122,97	175,71	175,27	173,81
9		118,56	115,47	117,92	186,81	173,96	176,20
10		119,33	118,13	122,61	174,67	176,96	173,40
11		119,46	116,30	110,33	174,74	171,03	174,04
12		119,42	120,95	121,15	179,73	174,32	180,10
13		118,01	116,58	116,59	181,01	173,92	176,30
14		118,04	117,52	110,78	178,51	173,83	179,21
15	50 (IGROV-1) bzw. 100 (OC316)	102,00	103,07	100,49	145,50	145,16	145,97
16		98,12	97,03	101,99	142,68	143,07	144,46
17		98,84	101,56	98,87	141,71	143,45	144,68
18		100,94	97,00	100,44	144,71	141,63	144,17
19		98,82	97,79	101,23	147,73	142,30	145,20
20		100,06	97,46	96,77	145,33	144,06	150,34
21		96,49	97,38	100,46	145,71	141,98	144,47
22	300 (IGROV-1) bzw. 1000 (OC316)	84,62	81,02	86,38	121,59	116,63	117,90
23		83,98	83,10	83,73	119,05	116,90	120,64
24		86,29	83,88	84,09	115,59	116,69	118,90
25		86,31	83,52	83,82	116,27	116,71	119,94
26		84,01	82,54	82,03	115,57	115,57	119,07
27		85,23	85,78	87,75	114,06	115,29	119,03
28		85,97	82,64	83,27	116,38	117,71	116,33

Tabelle 20: ECAR-Einzeldaten der Messungen mit OC316 shRNA und OC316 shMCT4 unter AR-C155858 am XF Analyzer 24/3.

Messung	Konz. AR-C [nM]	shRNA			shMCT4		
		Versuch #1 ECAR [mpH/min]	Versuch #2 ECAR [mpH/min]	Versuch #3 ECAR [mpH/min]	Versuch #1 ECAR [mpH/min]	Versuch #2 ECAR [mpH/min]	Versuch #3 ECAR [mpH/min]
1	0	69,37	49,50	48,94	68,87	63,48	51,47
2		50,57	45,56	48,50	59,68	47,44	57,03
3		44,05	46,70	45,46	37,44	54,84	53,46
4		35,51	45,74	43,42	45,29	50,42	57,44
5		38,78	48,50	43,52	50,86	51,17	49,93
6		42,56	44,94	43,11	51,93	50,61	52,24
7		41,52	40,48	44,21	43,01	49,93	51,57
8	10	40,67	34,81	41,21	51,77	38,96	43,95
9		40,67	35,95	37,22	41,74	38,45	40,09
10		36,32	37,18	36,90	41,44	41,65	39,45
11		34,95	35,68	36,47	40,72	37,87	41,10
12		35,91	36,33	35,01	41,40	41,70	40,54

13		32,95	39,77	36,31	39,32	42,18	35,79
14		36,08	43,49	36,31	41,81	44,07	33,49
15	100	33,42	45,64	35,36	27,74	28,28	39,26
16		35,10	31,06	30,93	35,74	34,01	25,50
17		27,81	29,25	30,73	30,41	28,96	25,97
18		36,22	29,27	32,67	35,16	30,94	29,78
19		29,93	25,93	31,58	29,93	30,01	32,24
20		30,80	27,69	28,06	31,53	33,00	30,11
21		35,72	27,25	31,88	25,83	17,61	29,85
22	1000	31,02	24,93	29,49	19,59	18,84	19,54
23		30,12	23,36	27,30	20,08	18,92	24,17
24		22,66	23,29	27,25	19,98	19,88	20,70
25		27,89	21,54	23,67	17,54	22,06	19,02
26		29,85	28,92	23,75	17,48	19,71	18,18
27		27,69	29,95	26,09	19,16	22,07	22,16
28		27,05	30,18	27,02	20,73	22,31	18,61

Tabelle 21: OCR-Einzeldaten der Messungen mit OC316 shRNA und OC316 shMCT4 unter AR-C155858 am XF Analyzer 24/3.

Messung	Konz. AR-C [nM]	shRNA			shMCT4		
		Versuch #1 OCR [pmol/min]	Versuch #2 OCR [pmol/min]	Versuch #3 OCR [pmol/min]	Versuch #1 OCR [pmol/min]	Versuch #2 OCR [pmol/min]	Versuch #3 OCR [pmol/min]
1	0	174,62	171,62	180,94	259,34	251,81	306,62
2		155,13	170,65	160,90	269,03	259,67	267,13
3		160,33	161,04	157,50	255,21	263,11	248,49
4		156,87	141,11	154,80	245,94	262,20	240,37
5		140,71	143,19	151,29	248,73	253,79	241,22
6		135,00	144,16	153,38	231,92	236,65	230,99
7		136,41	148,63	140,99	232,11	215,08	219,34
8	10	128,57	123,13	134,25	205,37	168,81	215,84
9		130,83	123,37	131,19	205,19	179,43	208,11
10		132,18	120,98	130,87	212,25	194,29	198,02
11		129,90	122,34	128,58	193,96	221,12	193,28
12		125,14	136,42	126,23	212,90	205,46	186,98
13		120,42	130,41	128,28	193,58	211,87	186,63
14		126,45	135,28	126,62	212,09	217,89	185,10
15	100	109,34	123,00	110,27	148,57	177,74	148,33
16		113,63	120,80	114,87	164,41	166,13	155,47
17		112,10	109,67	110,92	166,69	154,62	153,10
18		109,15	100,39	114,71	151,53	146,65	149,01
19		104,41	94,11	113,20	160,64	144,80	151,38
20		113,28	90,46	105,61	159,04	143,01	146,89
21		101,17	89,84	106,48	158,79	151,19	139,27
22		84,07	91,93	85,20	96,01	83,45	105,05
23		88,86	93,95	87,21	99,57	87,77	109,25
24		85,38	87,54	84,97	100,04	93,94	106,59

25	1000	81,65	83,21	80,22	113,90	99,66	107,08
26		90,92	81,00	81,84	98,31	109,12	104,56
27		85,19	80,36	81,14	93,65	117,10	102,98
28		83,96	74,24	82,35	102,82	124,72	103,86

8.2 Toxizitätsmessungen

Tabelle 22: Einzeldaten der XTT-Assays für IGROV-1 unter α -CHC.

[Blank] = Zellkammern ohne Zellen und ohne XTT-Lösung, repräsentieren den Hintergrund.

Versuch #	Konz. α -CHC [mM]				Konz. DMSO [%]			
1	0	0,1725	0,1621	0,1716	0	0,1694	0,1658	0,1673
	10	0,1256	0,1216	0,1252	0,4	0,1470	0,1498	0,1511
	20	0,0965	0,0940	0,0942	0,8	0,1417	0,1417	0,1435
	30	0,0636	0,0627	0,0637	1,2	0,1309	0,1326	0,1364
	[Blank]	0,0037						
2	0	0,1317	0,1419	0,1422	0	0,1383	0,1330	0,1375
	10	0,0958	0,0991	0,0986	0,4	0,1281	0,1223	0,1295
	20	0,0788	0,0852	0,0832	0,8	0,1176	0,1088	0,1182
	30	0,0640	0,0672	0,0645	1,2	0,1108	0,1050	0,1102
	[Blank]	0,0017						
3	0	0,1699	0,1557	0,1568	0	0,1544	0,1538	0,1532
	10	0,1182	0,1119	0,1112	0,4	0,1483	0,1431	0,1435
	20	0,0827	0,0817	0,0795	0,8	0,1379	0,1418	0,1416
	30	0,0683	0,0640	0,0645	1,2	0,1252	0,1210	0,1267
	[Blank]	0,0046						

Tabelle 23: Einzeldaten der XTT-Assays für OC316 unter α -CHC.

[Blank] = Zellkammern ohne Zellen und ohne XTT-Lösung, repräsentieren den Hintergrund.

Versuch #	Konz. α -CHC [mM]				Konz. DMSO [%]			
1	0	0,1828	0,2051	0,1863	0	0,1985	0,2121	0,2060
	10	0,1283	0,1275	0,1241	0,4	0,1837	0,1966	0,1953
	20	0,0958	0,0968	0,0938	0,8	0,1719	0,1789	0,1716
	30	0,0679	0,0672	0,0692	1,2	0,1584	0,1595	0,1622
	[Blank]	0,0037						
2	0	0,1794	0,1851	0,1806	0	0,1963	0,1959	0,2064
	10	0,1282	0,1225	0,1247	0,4	0,1765	0,1758	0,1804
	20	0,1032	0,1020	0,1021	0,8	0,1696	0,1616	0,1629
	30	0,0714	0,0733	0,0725	1,2	0,1513	0,1488	0,1534
	[Blank]	0,0017						
	0	0,1570	0,1563	0,1621	0	0,1644	0,1687	0,1687

3	10	0,1155	0,1159	0,1131	0,4	0,1573	0,1522	0,1519
	20	0,0862	0,0873	0,0897	0,8	0,1474	0,1453	0,1449
	30	0,0540	0,0561	0,0627	1,2	0,1359	0,1348	0,1357
	[Blank]							

Tabelle 24: Einzeldaten der XTT-Assays für IGROV-1 unter AR-C155858.

[Blank] = Zellkammern ohne Zellen und ohne XTT-Lösung, repräsentieren den Hintergrund.

Versuch #	Konz. AR-C [nM]				Konz. DMSO [%]			
1	0	0,1869	0,1965	0,1909	0	0,2111	0,2106	0,2117
	10	0,1803	0,1892	0,1826	0,01	0,2052	0,1966	0,1960
	50	0,1714	0,1730	0,1756	0,05	0,1904	0,1925	0,1897
	300	0,1593	0,1637	0,1566	0,3	0,1788	0,1758	0,1764
	[Blank]							
2	0	0,2038	0,2017	0,2070	0	0,1986	0,1922	0,2010
	10	0,1951	0,1902	0,1994	0,01	0,1937	0,1882	0,1933
	50	0,1865	0,1896	0,1868	0,05	0,1893	0,1874	0,1873
	300	0,1573	0,1653	0,1614	0,3	0,1777	0,1772	0,1755
	[Blank]							
3	0	0,1949	0,1933	0,1975	0	0,1971	0,1976	0,2013
	10	0,1842	0,1823	0,1861	0,01	0,1953	0,1932	0,1922
	50	0,1772	0,1822	0,1806	0,05	0,1913	0,1935	0,1922
	300	0,1626	0,1608	0,1605	0,3	0,1811	0,1771	0,1791
	[Blank]							

Tabelle 25: Einzeldaten der XTT-Assays für OC316 unter AR-C155858.

[Blank] = Zellkammern ohne Zellen und ohne XTT-Lösung, repräsentieren den Hintergrund.

Versuch #	Konz. AR-C [nM]				Konz. DMSO [%]			
1	0	0,1976	0,1936	0,1942	0	0,2054	0,2029	0,2017
	10	0,1808	0,1792	0,1879	0,01	0,1928	0,1931	0,1984
	100	0,1777	0,1784	0,1688	0,1	0,1915	0,1920	0,1926
	1000	0,1447	0,1395	0,1371	1	0,1658	0,1681	0,1652
	[Blank]							
2	0	0,1891	0,1860	0,1946	0	0,2141	0,2104	0,2198
	10	0,1804	0,1750	0,1780	0,01	0,2041	0,2072	0,2134
	100	0,1633	0,1688	0,1713	0,1	0,1963	0,1959	0,1960
	1000	0,1351	0,1369	0,1347	1	0,1717	0,1712	0,1626
	[Blank]							
3	0	0,2010	0,2014	0,2096	0	0,2074	0,1976	0,1970
	10	0,2003	0,1898	0,1958	0,01	0,1978	0,1897	0,1922
	100	0,1821	0,1836	0,1894	0,1	0,1908	0,1897	0,1863
	1000	0,1440	0,1477	0,1472	1	0,1618	0,1675	0,1682
	[Blank]							

Tabelle 26: Einzeldaten der XTT-Assays für OC316 shRNA unter AR-C155858.

[Blank] = Zellkammern ohne Zellen und ohne XTT-Lösung, repräsentieren den Hintergrund.

Versuch #	Konz. AR-C [nM]				Konz. DMSO [%]			
1	0	0,1933	0,1937	0,1938	0	0,1889	0,1864	0,1934
	10	0,1829	0,1822	0,1862	0,01	0,1884	0,1800	0,1847
	100	0,1758	0,1774	0,1754	0,1	0,1839	0,1813	0,1787
	1000	0,1485	0,1502	0,1490	1	0,1623	0,1594	0,1556
	[Blank]							
2	0	0,2015	0,2027	0,2044	0	0,1986	0,1979	0,2008
	10	0,1933	0,1933	0,1945	0,01	0,1945	0,1920	0,1937
	100	0,1850	0,1855	0,1850	0,1	0,1910	0,1901	0,1911
	1000	0,1602	0,1593	0,1602	1	0,1701	0,1712	0,1672
	[Blank]							
3	0	0,2219	0,2212	0,2212	0	0,2180	0,2177	0,2200
	10	0,2129	0,2126	0,2144	0,01	0,2135	0,2120	0,2136
	100	0,2030	0,2070	0,2059	0,1	0,2092	0,2089	0,2106
	1000	0,1796	0,1790	0,1804	1	0,1914	0,1893	0,1890
	[Blank]							

Tabelle 27: Einzeldaten der XTT-Assays für OC316 shMCT4 unter AR-C155858.

[Blank] = Zellkammern ohne Zellen und ohne XTT-Lösung, repräsentieren den Hintergrund.

Versuch #	Konz. AR-C [nM]				Konz. DMSO [%]			
1	0	0,1729	0,1800	0,1721	0	0,2067	0,2058	0,2068
	10	0,1679	0,1660	0,1659	0,01	0,1974	0,1978	0,2017
	100	0,1585	0,1572	0,1524	0,1	0,1868	0,1857	0,1836
	1000	0,1291	0,1311	0,1286	1	0,1661	0,1652	0,1659
	[Blank]							
2	0	0,1841	0,1870	0,1835	0	0,2181	0,2186	0,2184
	10	0,1773	0,1725	0,1738	0,01	0,2085	0,2114	0,2122
	100	0,1606	0,1625	0,1595	0,1	0,2021	0,2015	0,2032
	1000	0,1387	0,1396	0,1388	1	0,1803	0,1802	0,1780
	[Blank]							
3	0	0,2031	0,2082	0,2058	0	0,2397	0,2368	0,2369
	10	0,1989	0,1946	0,1935	0,01	0,2310	0,2307	0,2314
	100	0,1819	0,1811	0,1811	0,1	0,2225	0,2216	0,2224
	1000	0,1605	0,1593	0,1594	1	0,1974	0,1991	0,1952
	[Blank]							

8.3 Immunfluoreszenzanalyse

Tabelle 28: Einzeldaten der Immunfluoreszenzanalyse

Zelllinie	Protein	Zellspot #	Bild #	Schwarzwert S	Grünwert G	G/S
IGROV-1	MCT1	1	1	58662	5245	0,089
			2	59059	5153	0,087
			3	66501	5338	0,080
			4	72196	5857	0,081
			5	67654	5442	0,080
		2	1	68992	5550	0,080
			2	57503	4382	0,076
			3	65329	5189	0,079
			4	63378	5136	0,081
			5	66325	5363	0,081
		3	1	67996	5984	0,088
			2	76713	6827	0,089
			3	83007	6888	0,083
			4	81111	6549	0,081
			5	77306	6267	0,081
		4	1	85303	6041	0,071
			2	77543	5910	0,076
			3	66185	5058	0,076
			4	63571	5102	0,080
			5	60956	5454	0,089
		5	1	79634	6165	0,077
			2	70617	5716	0,081
			3	74425	5820	0,078
			4	50177	4387	0,087
			5	61071	5289	0,087
	MCT4	1	1	42810	7714	0,180
			2	56543	9958	0,176
			3	41469	7331	0,177
			4	45544	8079	0,177
			5	54803	9132	0,167
		2	1	44575	9182	0,206
			2	49852	9857	0,198
			3	41727	7561	0,181
			4	42657	8156	0,191
			5	41445	7405	0,179
		3	1	43819	7572	0,173
			2	41638	7804	0,187
			3	50079	9965	0,199
			4	42675	8610	0,202
			5	54702	9320	0,170
		4	1	58177	9604	0,165
			2	47211	10552	0,224
			3	55087	9403	0,171

			4	42993	7074	0,165
			5	54737	9965	0,182
		5	1	53833	9836	0,183
			2	56011	9837	0,176
			3	52356	9502	0,181
			4	52058	8500	0,163
			5	48900	9072	0,186
OC316	MCT1	1	1	57125	6775	0,119
			2	64076	7189	0,112
			3	55466	6163	0,111
			4	56446	6691	0,119
			5	57885	6546	0,113
		2	1	77025	9483	0,123
			2	86960	10228	0,118
			3	88973	10212	0,115
			4	66294	7534	0,114
			5	74069	8339	0,113
		3	1	71503	9173	0,128
			2	67141	7334	0,109
			3	63746	6899	0,108
			4	76463	7934	0,104
			5	57563	6724	0,117
		4	1	63454	6886	0,109
			2	48995	5810	0,119
			3	98312	11873	0,121
			4	49747	5810	0,117
			5	93496	11873	0,127
	5	1	76185	8733	0,115	
		2	56692	6010	0,106	
		3	67772	8146	0,120	
		4	82637	10051	0,122	
		5	74801	8535	0,114	
	MCT4	1	1	83153	33638	0,405
			2	71450	28107	0,393
			3	74539	28231	0,379
			4	77399	28266	0,365
			5	83124	29535	0,355
		2	1	93255	35907	0,385
			2	64336	24188	0,376
			3	90335	35669	0,395
			4	73042	28137	0,385
			5	88323	32972	0,373
		3	1	87038	33290	0,382
			2	78569	32436	0,413
			3	86986	33372	0,384
			4	82592	32436	0,393
			5	83498	33372	0,400
4		1	93401	39891	0,427	

			2	91722	38500	0,420
			3	92924	34703	0,373
			4	90501	35266	0,390
			5	81798	30995	0,379
		5	1	80205	30160	0,376
			2	75962	26454	0,348
			3	84991	29188	0,343
			4	84308	31229	0,370
			5	84072	31931	0,380
shRNA	MCT1	1	1	64321	6993	0,109
			2	56725	6837	0,121
			3	51894	5525	0,106
			4	55468	6722	0,121
			5	49537	6179	0,125
		2	1	56499	5653	0,100
			2	50753	5261	0,104
			3	44377	5134	0,116
			4	41705	5102	0,122
			5	57785	6722	0,116
		3	1	53139	5638	0,106
			2	49976	5433	0,109
			3	49174	5991	0,122
			4	49893	5476	0,110
			5	52876	5789	0,109
		4	1	54560	5848	0,107
			2	44223	5105	0,115
			3	55698	6890	0,124
			4	53653	5412	0,101
			5	53387	5866	0,110
	5	1	51029	5583	0,109	
		2	53169	6077	0,114	
		3	61367	6764	0,110	
		4	54983	5551	0,101	
		5	53766	6503	0,121	
	MCT4	1	1	54735	20737	0,379
			2	66600	24317	0,365
			3	72032	28017	0,389
			4	65765	25821	0,393
			5	77400	25879	0,334
		2	1	60947	22226	0,365
			2	63748	22468	0,352
			3	75882	29048	0,383
			4	55267	21516	0,389
			5	66901	24476	0,366
		3	1	71608	25956	0,362
			2	54368	21169	0,389
			3	79557	27431	0,345
			4	74787	28886	0,386

			5	70170	24263	0,346
		4	1	60655	23925	0,394
			2	75046	31131	0,415
			3	72785	26994	0,371
			4	67573	24963	0,369
			5	75975	27891	0,367
		5	1	67188	22874	0,340
			2	65778	24687	0,375
			3	55210	21718	0,393
			4	64093	26437	0,412
			5	67188	22874	0,340
shMCT4	MCT1	1	1	86855	9665	0,111
			2	94195	10523	0,112
			3	85463	9368	0,110
			4	80405	9226	0,115
			5	77304	8317	0,108
		2	1	68403	7957	0,116
			2	69398	7669	0,111
			3	66631	7043	0,106
			4	57478	6486	0,113
			5	53278	5667	0,106
		3	1	57530	6345	0,110
			2	59929	6782	0,113
			3	60988	6568	0,108
			4	56249	6470	0,115
			5	67344	7000	0,104
		4	1	78453	9189	0,117
			2	55460	6154	0,111
			3	73959	7912	0,107
			4	76284	8837	0,116
			5	71466	8655	0,121
	5	1	79172	8891	0,112	
		2	82435	8503	0,103	
		3	84334	9723	0,115	
		4	88937	9527	0,107	
		5	79366	9764	0,123	
	MCT4	1	1	51545	13018	0,253
			2	41097	11248	0,274
			3	52585	13623	0,259
			4	43785	12047	0,275
			5	54451	14055	0,258
		2	1	51162	13753	0,269
			2	51770	13151	0,254
			3	51162	12753	0,249
			4	40810	11773	0,288
			5	52475	12975	0,247
3		1	41646	10078	0,242	
		2	49843	12326	0,247	

			3	42164	10804	0,256
			4	44060	11091	0,252
			5	47789	12309	0,258
		4	1	46358	13400	0,289
			2	49112	11958	0,243
			3	48927	11934	0,244
			4	50524	11154	0,221
			5	54051	12694	0,235
		5	1	51436	12724	0,247
			2	48136	12909	0,268
			3	49215	13354	0,271
			4	38664	10665	0,276
			5	55484	14246	0,257

Danksagung

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Klein
Geburtsdatum: 17.4.1990
Geburtsort: Limburg a. d. Lahn