

**Ein neues Lumineszenzverfahren zur
quantitativen und räumlichen Darstellung von Produkten
des Glukosestoffwechsels in Tumoren**

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ulrike Sattler
geb. am 19.05.1977 in Mainz

Mainz, 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Pyruvat als zentraler Metabolit des Stoffwechsels	5
1.2	Pyruvat als diagnostische Größe bei Defekten der Pyruvatoxidation.....	6
1.3	Pyruvat als Bestandteil des Redox-Systems	8
1.4	Der Energiehaushalt von Tumorzellen	10
1.5	Zusammenhang zwischen Glykolyse und Tumormalignität.....	11
1.6	Pyruvat als prognostischer Faktor in der Tumorthherapie?.....	12
1.7	Aufgabenstellung.....	12
2	Materialien und Methoden.....	15
2.1	Gewebeproben und Tumormaterial	15
2.1.1	Gewebeproben für Referenzmessungen.....	15
2.1.2	Tumormaterial.....	15
2.1.2.1	Xenotransplantate.....	15
2.1.2.2	Humanbiopsien	16
2.2	Herstellung von Gefrierschnitten	17
2.3	Histologische Untersuchungen	19
2.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).....	19
2.3.2	Cytokeratin-Färbung an Gewebeschnitten humaner HNSCC-Biopsien	19
2.4	Das bildgebende Biolumineszenzverfahren	20
2.4.1	Messaufbau und Registrierung	20
2.4.2	Das Prinzip der Photonenregistrierung.....	21
2.4.3	Der Multichannel-Plate-Verstärker.....	22
2.4.4	Verarbeitung der Bildinformation	23
2.4.5	Durchführung der Biolumineszenzmessung	23
2.5	Entwicklung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzmethode.....	24
2.5.1	Biochemische Reaktionen der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz.....	24
2.5.2	Etablierung der Basisreaktion an Photometer und Microplate Reader.....	25
2.5.3	Kopplung der Basisreaktion an die Licht erzeugende Reaktion	26
2.6	Stabilität von Pyruvat.....	26
2.7	Enzymlösungen für die Biolumineszenzreaktionen	26
2.7.1	Enzymlösung für den ATP-Nachweis	26
2.7.2	Enzymlösung für den Laktat-Nachweis	27
2.7.3	Enzymlösung für den Pyruvat-Nachweis	27
2.7.4	Analyse der Eigenschaften der Reaktionslösungen	28
2.8	Kalibrierung der Biolumineszenz	29
2.8.1	Standardschnitte für die Kalibrierung der Biolumineszenz	31
2.8.2	Laktat und ATP	31
2.8.3	Pyruvat.....	32
2.8.3.1	Konzentrationsstandards in Einbettmedium	32
2.8.3.2	Konzentrationsstandards in Gewebehomogenaten	32
2.8.4	Erstellen von Kalibrierungskurven	32

2.9	Bildanalyse	33
2.9.1	Auswertung der Biolumineszenzdaten	33
2.9.2	Erstellen von L/P-Karten und Häufigkeitsverteilungen	33
2.10	Referenzmethoden	35
2.10.1	Herstellen von Gewebeextrakten.....	35
2.10.2	PDH-Test am Photometer/Microplate Reader	35
2.10.3	LDH-Test am Microplate Reader	36
2.10.4	Kolorimetrischer Test am Microplate Reader.....	36
2.10.5	HPLC	37
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Entwicklung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz	40
3.1.1	Optimierung der Basisreaktion am Photometer und Microplate Reader.....	40
3.1.2	Reproduzierbarkeit der Basisreaktion.....	43
3.2	Stabilität von Pyruvat.....	44
3.3	Kombination der Basisreaktion mit der Biolumineszenzreaktion	45
3.4	Kalibrierung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz an Kryostatschnitten	46
3.5	Abhängigkeit der Biolumineszenzintensität von der Schnittdicke.....	51
3.6	Pyruvat-abhängige Biolumineszenzmethode: Wiederfindungsexperimente.....	52
3.6.1	Ergebnisse der Biolumineszenz	53
3.6.2	Ergebnisse der HPLC	54
3.6.3	Ergebnisse der enzymatischen photometrischen Tests	54
3.6.4	Ergebnisse des kolorimetrischen photometrischen Tests.....	55
3.6.5	Zusammenfassung der Wiederfindungsexperimente	56
3.7	Anwendungsbeispiele der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz	57
3.7.1	Darstellung der strukturassoziierten Auswertung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz anhand eines HNSCC-Xenotransplantats	58
3.7.2	Pyruvat-, Laktat- und ATP-Bestimmungen in HNSCC-Xenotransplantaten ...	60
3.7.3	Pyruvat-, Laktat- und ATP-Bestimmungen in humanen HNSCC-Biopsien.....	63
3.8	Erstellen von L/P-Karten aus Laktat- und Pyruvatbiolumineszenzen.....	66
4	Diskussion	71
4.1	Diskussion der Methoden	71
4.1.1	Biolumineszenzmethode.....	71
4.1.1.1	Die Reaktionslösung für den Pyruvatnachweis.....	71
4.1.1.2	Die Kalibrierung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzmethode	73
4.1.1.3	Apparative Möglichkeiten und Ortsauflösung	74
4.2	Referenzmethoden und Wiederfindungsexperimente	74
4.2.1	Enzymatische photometrische Tests	74
4.2.2	Kolorimetrischer photometrischer Test	75
4.2.3	HPLC	75
4.2.4	Biolumineszenzmethode.....	76
4.3	Vergleich der Biolumineszenzmethode mit anderen bildgebenden Verfahren	77
4.4	Diskussion der Ergebnisse	78

4.4.1	Literaturdaten zur Pyruvatkonzentration in humanen Geweben.....	78
4.4.2	Pyruvat- und Laktatbestimmungen in Xenotransplantaten	80
4.4.3	Pyruvat- und Laktatbestimmungen in Humanbiopsien	85
4.5	Erstellen von L/P-Karten.....	85
4.6	Kolokalisation von Laktat und Pyruvat.....	86
4.7	Ausblick	90
5	Zusammenfassung	93
6	Anhang.....	95
6.1	Tabellenverzeichnis	95
6.2	Puffer und Lösungen	102
6.3	Chemikalien und Reagenzien.....	103
6.4	Sonstige Materialien, Geräte und Software.....	104
6.5	Abkürzungsverzeichnis.....	105
7	Referenzen.....	107

1 Einleitung

Jüngste Ergebnisse der molekularen Onkologie haben intensive Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet des besonderen Glukosestoffwechsels in malignen Tumoren ausgelöst. Hierbei kommt der „Weichenstellung“ zwischen der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) und der Produktion von Laktat bzw. Milchsäure eine besondere Bedeutung zu. Im Zentrum dieser Aufzweigung der Stoffwechselwege steht Pyruvat, das Anion der Brenztraubensäure. Bislang wurde Pyruvat in verschiedenen Geweben oder Körperflüssigkeiten aus Extrakten bzw. Dialysaten bestimmt. Ein räumlich auflösendes Verfahren, das der charakteristischen Tumorerheterogenität gerecht wird, existiert jedoch nicht. Daher sind bislang nur wenige Informationen über den Pyruvatgehalt insbesondere von soliden Tumoren verfügbar.

1.1 Pyruvat als zentraler Metabolit des Stoffwechsels

Als Endprodukt der im Cytoplasma stattfindenden Glykolyse steht Pyruvat an einem wichtigen Verzweigungspunkt des Stoffwechsels, an dem die Weichenstellung zwischen anaeroben und aeroben Wegen des Energiestoffwechsels erfolgt. Bei körperlicher Ruhe oder geringer Aktivität erfolgt die Energiebereitstellung hauptsächlich über den aeroben Stoffwechsel. Unter diesen Bedingungen wird Pyruvat aus dem Cytoplasma in die Mitochondrienmatrix transportiert. Dabei passiert es die äußere Mitochondrienmembran durch Porine, die innere mit Hilfe eines speziellen Pyruvat-Carriers (Pyruvat/H⁺-Symporter). Der Multienzymkomplex Pyruvatdehydrogenase (PDH) katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA, welches im Citratzyklus oxidiert und decarboxyliert wird. Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente werden zur Erzeugung von biochemisch verfügbarer Energie in Form von ATP über die oxidative Phosphorylierung genutzt. Bei ausreichender Sauerstoffversorgung werden nur geringe Mengen Laktat durch die Laktatdehydrogenase (LDH) aus Pyruvat gebildet. Unter körperlicher Belastung, wie z.B. erhöhter Muskelarbeit, steigt der Anteil des „anaeroben“ Stoffwechsels, und die Laktatproduktion nimmt zu. Bei der LDH-katalysierten Reaktion wird NAD⁺ regeneriert, so dass die Glykolyse auch bei Sauerstoffmangel ablaufen kann. Das in der Muskulatur gebildete Laktat wird in den Blutkreislauf abgegeben und dient in der Leber im Rahmen des Cori-Zyklus als Substrat für die Glukoneogenese. Die dabei entstehende Glukose kann je nach dem momentanen Status der Energieversorgung dem Energiespeicher der Leber als Glykogen zugeführt oder direkt an den Blutkreislauf abgegeben werden.

Pyruvat steht außerdem in engem Zusammenhang mit dem Aminosäurestoffwechsel. So ist es eine wichtige Quelle für die Synthese von Alanin, welches durch die reversible Transaminierung von Pyruvat entsteht.

Der Transport von Monocarboxylaten, wie z.B. Laktat und Pyruvat, durch die Plasmamembran der Zelle wird von Monocarboxylattransportern (MCT) bewirkt (Halestrap und Price, 1999). Bisher wurden 14 verschiedene humane MCT beschrieben, die sich in ihrer gewebespezifischen Expression sowie in ihrer Spezifität und Affinität für ihre Substrate und der Sensitivität gegenüber Inhibitoren unterscheiden. Der Transport erfolgt im Symport mit einem Proton und ist konzentrations- und pH-abhängig. Durch die MCT werden Zellen je nach physiologischer Spezialisierung mit Ketonkörpern und Laktat für die Energieproduktion versorgt; unter hypoxischen Bedingungen wird sichergestellt, dass durch die Glykolyse entstandenes Laktat zusammen mit einem Proton aus der Zelle heraus transportiert werden kann. Die meisten Zelltypen exprimieren MCT-1, wohingegen MCT-2 mit Gewebetypen assoziiert ist, die eine hohe Aufnahme von Laktat und Pyruvat aufweisen (z.B. Nieren und Leber, aber auch Neurone). MCT-2 gilt als hoch-affin für Pyruvat und wird daher als hauptsächlicher Transporter für diesen Metaboliten im Menschen angesehen. MCT-4 kommt hauptsächlich in hoch-glykolytischen Zellen wie Tumor- oder weißen Blutzellen vor; hier spielt der aus der Zelle heraus gerichtete Transport von Laktat und Protonen eine wichtige Rolle (Dimmer et al., 2000; Lin et al., 1998).

1.2 Pyruvat als diagnostische Größe bei Defekten der Pyruvatoxidation

Störungen der Pyruvatoxidation, wie sie bei Mitochondriopathien vorliegen, können verschiedene Ursachen haben. Die Defekte können im Bereich des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes oder der Pyruvatcarboxylase, des Citratzyklus, in den Atmungsketten-Komplexen I–V oder im Bereich des ATP-Transportmechanismus liegen. Die Vererbung dieser Defekte kann durch die mitochondriale oder die kernkodierte DNA erfolgen. Im Falle einer Mutation der mitochondrialen DNA liegen in einer Zelle oft mutierte und nicht mutierte DNA-Kopien nebeneinander vor (Heteroplasmie). Erst wenn der Gehalt mutierter mitochondrialer DNA einen organspezifischen Schwellenwert überschreitet, kommt es zu Funktionsstörungen der Zelle und damit zu den Krankheitssymptomen. Funktionsstörungen der Mitochondrien betreffen besonders Organe mit hohem Energieumsatz wie Skelettmuskulatur, Gehirn, Auge und Herz. Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen weisen vielfältige und unspezifische klinische Symptome auf. Diese reichen von muskulärer Hypotonie über geistige Retardierung und Retinitis pigmentosa bis zur Kardiomyopathie. Störungen des Magen-Darm-Traktes oder des Zuckerstoffwechsels (Diabetes mellitus) kommen ebenfalls vor. Einige Patienten zeigen charakteristische Kombinationen verschiedener Symptome, die sich so definierten Krankheitsbildern zuordnen lassen. Die mitochondriale Enzephalomyopathie ist die häufigste Krankheit dieser Gruppe im Kindesalter. Zu den Symptomen zählen auch hier Mus-

kelschwäche der Arme und Beine, aber auch jugendliche Schlaganfälle, epileptische Anfälle und Schwerhörigkeit (Deschauer, 2003; Simon und Johns, 1999).

Zur Diagnose dieser Erkrankungen werden in der Labordiagnostik neben anderen Parametern die Konzentrationen von Laktat und Pyruvat und – falls erforderlich – das Laktat/Pyruvat-Verhältnis (L/P) bestimmt (Darras und Friedman, 2000). Dabei kommen meist photometrische Methoden zum Einsatz, bei denen die Metabolite in Gewebextrakten (meist von Blut, aber auch von Gewebebiopsien) gemessen werden; hier wird nicht speziell nach intra- oder extrazellulärem Metabolitgehalt unterschieden. Physiologische Laktat- bzw. Pyruvatkonzentrationen im arteriellen Blut liegen in Ruhe bei < 1 mM bzw. $0,1$ mM (Keul et al., 1972; Luft, 2001; Ong et al., 2004). Im ruhenden Muskel werden für Pyruvat Werte von $0,13$ bis $0,53$ $\mu\text{mol/g}$ Gewebe gefunden, für Laktat $1,8$ bis $5,4$ $\mu\text{mol/g}$ (Sahlin et al., 1987; Tsintzas et al., 2000; Watt et al., 2004). Pyruvat kann unter intensiver körperlicher Belastung oder nach der Anstrengung in der Erholungsphase im Muskel bis zu $1,51$ $\mu\text{mol/g}$, Laktat bis zu 113 $\mu\text{mol/g}$ ansteigen (Putman et al., 1999; Sahlin et al., 1976). Wird in Ruhe im Blut ein erhöhter Laktatspiegel (> 2 mM) ermittelt, so wird zusätzlich die Pyruvatkonzentration im selben Gewebe bestimmt. Eine Laktazidose, der Anstieg des Laktatgehaltes im Blut bei gleichzeitigem Abfall des pH-Wertes, kann in ausgeprägten Fällen zu einem Schock und Versagen der Nierenfunktion führen (Riede und Schaefer, 1999; Wilichowski et al., 1997). Unter physiologischen Bedingungen weist das L/P-Verhältnis Werte von $4:1$ bis $20:1$ auf (Clay et al., 2001; Keul et al., 1968; Luft, 2001). Ein normaler L/P-Quotient im Blut bei stark erhöhtem Laktatwert deutet auf eine angeborene Defizienz der PDH oder Pyruvatcarboxylase hin. Deutlich erhöhte L/P-Verhältnisse (bis > 50) mit Laktazidose sind auf Defekte in Komplexen der Atmungskette zurückzuführen (Korenke, 2002; Wilichowski et al., 1997). Eine niedrige Laktat- mit gleichzeitig erhöhter Pyruvatkonzentration deutet auf eine LDH-Defizienz hin (Cornelio und Di, 1985).

Bei der symptomatischen Therapie von Mitochondriopathien ist zu berücksichtigen, dass die biochemischen Defekte heterogen sind, gewebespezifische und/oder zeitabhängige Expressionen zeigen und kombiniert auftreten können. Ziel der Therapien ist im Allgemeinen, die mitochondriale ATP-Produktion zu steigern und einen Rückstau von Metaboliten des Intermediärstoffwechsels zu reduzieren. Daher gibt es verschiedene Prinzipien zur Behandlung. Durch spezifische Maßnahmen wird versucht, die endogene Überproduktion von Stoffwechselprodukten zu regulieren; Enzymdefekte sollen durch Elektronenakzeptoren oder -donatoren überbrückt werden; bei noch bestehender Restaktivität betroffener Enzyme sollen diese durch Gabe von Cofaktoren, Vitaminen und Enzymaktivatoren erhöht werden (Przyrembel, 1987; Wilichowski et al., 1997). Hierzu zählen z.B. Faktoren, die die Aktivität der PDH direkt oder indirekt erhöhen. Zu letzteren zählt Dichloroacetat (DCA), welches nach seiner chemischen Struktur ein Pyruvatanalogon ist und durch Inhibition der PDH-Kinase (PDK) als

indirekter PDH-Aktivator fungiert, da dieser Enzymkomplex durch Phosphorylierung inaktiviert wird (Klyuyeva et al., 2007). Als weitere Maßnahme für Betroffene mit mitochondrialen Defekten gilt der Schutz vor oxidativen Schäden durch die Gabe von Antioxidantien. Störungen der oxidativen Phosphorylierung scheinen mit einer gesteigerten Bildung von Sauerstoffradikalen einherzugehen, welche eine Destabilisierung der inneren Mitochondrienmembran und eine zunehmenden Schädigung der dort lokalisierten Enzymsysteme bewirken. Zur Behandlung werden hier Vitamin E oder Coenzym Q10 eingesetzt (Wilichowski et al., 1997).

1.3 Pyruvat als Bestandteil des Redox-Systems

Der Begriff Redoxstatus ist nicht genau definiert; ursprünglich beschreibt er die Konzentrationsverhältnisse zwischen einzelnen interkonvertierbaren oxidierten und reduzierten Formen spezifischer Redoxpaare (wie z.B. Laktat/Pyruvat, $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+ / \text{NAD(P)}^+$, GSH / GSSG). Schafer und Buettner (2001) schlagen den Term „Redoxmilieu“ vor, welcher sich nicht nur auf den Status eines einzelnen Redoxpaares bezieht, sondern den Status eines „Sets“ mehrerer Paare in biologischen Flüssigkeiten, Organellen, Zellen oder Geweben beschreibt. Normalerweise liegt zwischen oxidativen und reduktiven Prozessen ein Gleichgewicht vor. Das Redoxmilieu des intrazellulären Milieus wird durch verschiedene redoxaktive Komponenten, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS), beeinflusst. Man spricht von „oxidativen Stress“, wenn ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von ROS und Neutralisierung dieser Substanzen durch zelleigene Schutzmechanismen vorliegt. ROS entstehen im Organismus natürlicherweise als Nebenprodukt der Zellatmung in den Mitochondrien. Nicht-physiologische Ursachen der Entstehung von ROS sind z.B. UV-Strahlung, Umweltgifte, Zigarettenrauch, aber auch gegen Krebs gerichtete Therapien wie ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika. Freie Radikale schädigen biologisches Gewebe dadurch, dass sie Moleküle wie DNA, Lipide oder Proteine angreifen und damit Veränderungen des Erbguts verursachen, empfindliche Störungen der Membranfunktionen hervorrufen oder Aktivitäten von Enzymen verändern.

Zum Schutz vor diesen reaktiven Komponenten stehen der Zelle verschiedene Abwehrsysteme zur Verfügung. Das wichtigste ist das Glutathion-System (siehe Abbildung 1-1). Unter physiologischen Bedingungen liegt Glutathion größtenteils in seiner reduzierten Form (GSH) vor. Das intrazelluläre GSH/GSSG-Verhältnis liegt normalerweise bei $\geq 100:1$. Die extrazelluläre Glutathionkonzentration ist 100- bis 1000-fach geringer als die innerhalb der Zelle (Schafer und Buettner, 2001). Der Pentosephosphatweg (PPP) reguliert den GSH/GSSG-Quotienten durch die Bereitstellung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$, welches für die Reduktion von GSSG zu GSH durch die Glutathionreduktase benötigt wird. Neben GSH/GSSG spiegeln auch L/P und $\text{NADH} + \text{H}^+ / \text{NAD}^+$ den Redoxstatus der Zelle wider. Im Gegensatz zu Glutathion liegen

cytosolische Nikotinamadenindinukleotide unter aeroben Bedingungen hauptsächlich in der oxidierten Form (NAD^+) vor. Das Verhältnis von $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ ist abhängig von der Glykolyse und der Zellatmung und ist daher eng mit der Umwandlung von Pyruvat zu Laktat durch die LDH verknüpft. Das $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ -Verhältnis liegt im Bereich von 1:10 bis 1:2000 (Mitka, 2005; Schafer und Buettner, 2001). Bei den Angaben wird nicht zwischen den Zellkompartimenten unterschieden.

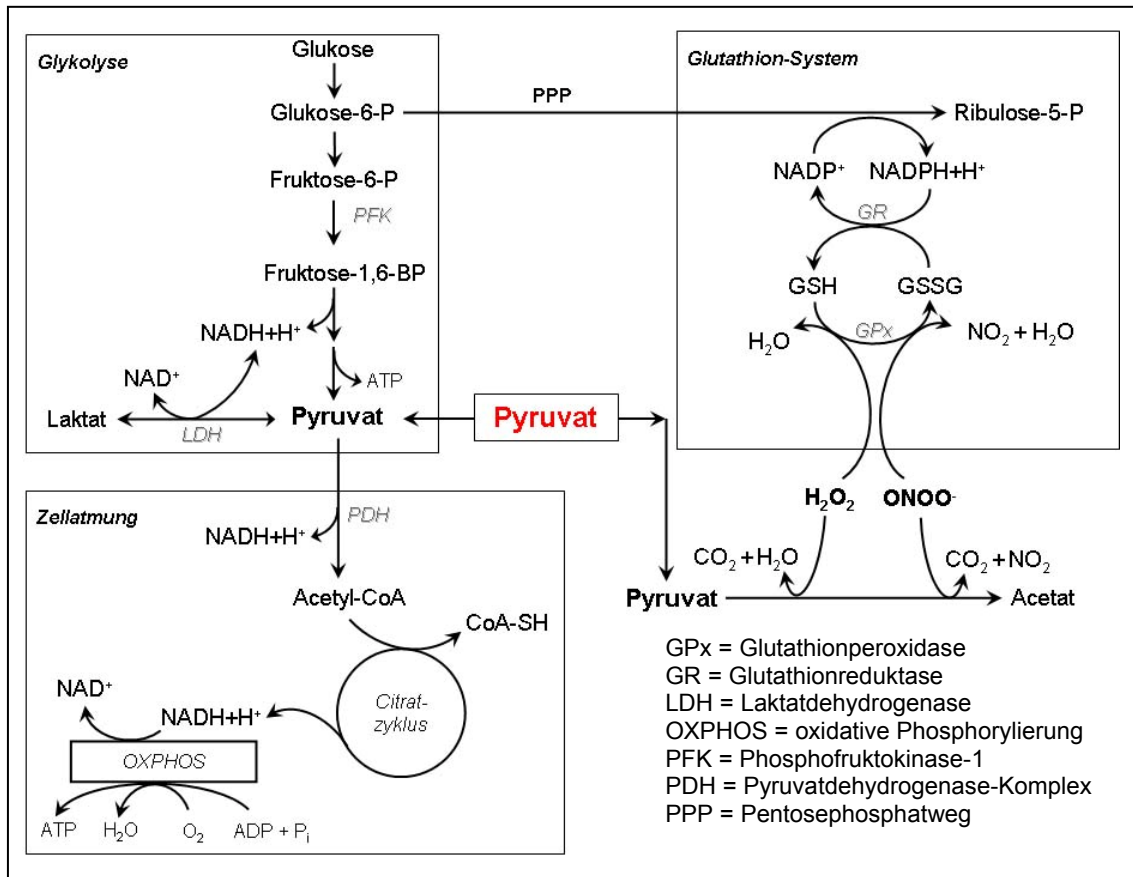


Abbildung 1-1: Pyruvat in Zusammenhang mit Glukoseabbau, Zellatmung und antioxidativem System.

Pyruvat entsteht bei der Glykolyse und kann über die LDH in Laktat umgesetzt werden. Durch Decarboxylierung von Pyruvat durch die PDH entsteht Acetyl-CoA, welches in den Citratzyklus eintritt. Die hier entstehenden Reduktionsäquivalente werden durch die oxidative Phosphorylierung in Energie in Form von ATP umgesetzt. Wird der glykolytische Flux in Richtung Pentosephosphatweg gelenkt, so entsteht $\text{NADPH}+\text{H}^+$, welches Glutathion in seiner reduzierten Form (GSH) hält, in der es protektiv gegenüber reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, wie z.B. H_2O_2 oder ONOO^- , wirkt. Auch Pyruvat kann durch seine antioxidativen Eigenschaften diese Substanzen nicht-enzymatisch, wie hier dargestellt, neutralisieren und so zum Zellschutz beitragen.

Als klassischer Parameter für den Redoxstatus wird das L/P-Verhältnis verwendet, welches unter physiologischen Bedingungen im Blut zwischen 4:1 und 20:1 liegt. Pyruvat übt gegensätzliche Effekte auf den Redoxstatus in Cytosol und Mitochondrienmatrix aus: Im Mito-

chondrium wird das Verhältnis von $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ durch Oxidation von Pyruvat durch die PDH und den Citratzyklus erhöht; im Gegensatz dazu wirkt Pyruvat im Cytosol oxidativ; erhöhte Konzentrationen führen hier über das LDH-Gleichgewicht zu einem verringerten $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ -Verhältnis (Mallet und Sun, 1999).

Pyruvat hat auf direktem chemischen Weg antioxidative Wirkung (siehe Abbildung 1-1); es decarboxyliert nicht-enzymatisch H_2O_2 bzw. Peroxynitrit und macht diese Substanzen unschädlich (Mallet und Sun, 2003; O'Donnell-Tormey et al., 1987; Salahudeen et al., 1991). Da Pyruvat über MCT aus der Zelle heraus und in die Zelle hinein transportiert werden kann, ist es sowohl als intra- als auch extrazelluläres Antioxidans anzusehen (Desagher et al., 1997).

Es konnte gezeigt werden, dass Pyruvat einen steigernden Einfluss auf die $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -Konzentration und damit auf das $\text{NADPH}+\text{H}^+/\text{NADP}^+$ -Verhältnis hat. Erhöhte Pyruvatkonzentrationen führen zu einem Anstieg der Citratkonzentration im Mitochondrium. Citrat wird ins Cytoplasma transportiert, wo es die Phosphofruktokinase inhibiert, was bei ausreichender Konzentration von NADP^+ zu einer gesteigerten Produktion von $\text{NADPH}+\text{H}^+$ durch den Pentosephosphatweg führen kann. Erhöhte $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -Konzentrationen steigern wiederum das GSH/GSSG-Level, was zum Zellschutz beiträgt. (Mallet und Sun, 2003; Mongan et al., 2002).

1.4 Der Energiehaushalt von Tumorzellen

Tumorzellen weisen im Vergleich zu normalen Zellen genetische, biochemische und histologische Besonderheiten auf. Eine auffällige Besonderheit von Tumorzellen ist im Energiestoffwechsel zu finden. Maligne Zellen beziehen häufig einen Großteil ihres ATPs aus der Glykolyse, durch eine erhöhte Aufnahme von Glukose, einen erhöhten glykolytischen Flux und die Reduzierung von Pyruvat zu Laktat. Dabei wird das für den Ablauf der Glykolyse erforderliche Oxidationsmittel NAD^+ regeneriert. Dieser Prozess findet in Tumorzellen sogar in Anwesenheit von Sauerstoff statt („aerobe Glykolyse“) und wurde erstmals 1929 von Otto Warburg beobachtet (Gatenby und Gillies, 2004; Zu und Guppy, 2004). Erhöhte Expressionsraten glykolytischer Enzyme, LDH und Glukosetransportern sind neben Defekten der mitochondrialen Atmung Gründe für den gesteigerten Glukoseverbrauch (Moreno-Sanchez et al., 2007; Semenza, 2007).

Die Mehrzahl solider Tumoren weist sich durch einen gegenüber normalen Geweben erniedrigten Sauerstoffpartialdruck (pO_2) aus. Obwohl ein solcher Zustand üblicherweise als „ O_2 -Mangel“ oder auch als „Hypoxie“ bezeichnet wird, existiert kein einheitlicher pO_2 , der als generelle Grenze zur Hypoxie anzusehen ist. Vielmehr ist der Begriff methodisch definiert. So spricht man beispielsweise von einer strahlenbiologischen Hypoxie, wenn Zellen durch ver-

minderte O_2 -Zufuhr messbar strahlenresistent werden. Dies ist im Allgemeinen bei pO_2 -Werten von weniger als 10 mmHg der Fall (Hockel und Vaupel, 2001). Unter diesen Bedingungen reichern Zellen den Transkriptionsfaktor HIF-1 α (Hypoxie inducible factor-1 α) an, der als Heterodimer mit HIF-1 β das Protein HIF-1 bildet. Dieses beeinflusst eine Vielzahl von Genen, darunter auch solche, die in Zusammenhang mit der glykolytischen Aktivität stehen. Dazu gehören alle glykolytischen Enzyme sowie LDH und Glukosetransporter (Semenza, 2007). HIF-1 α inhibiert außerdem indirekt die Aktivität der PDH, indem es die Expression der PDH-Kinase-1 (PDK1) erhöht, die die PDH durch Phosphorylierung im inaktiven Zustand hält (Simon, 2006). Somit wird auch unter Sauerstoffmangel der Glukoseabbau verstärkt gefördert.

Nicht alle Tumorzellen sind ausschließlich auf die Glykolyse angewiesen. Einige favorisieren die Bereitstellung von ATP durch die oxidative Phosphorylierung, andere betreiben beide Wege gleichermaßen (Moreno-Sanchez et al., 2007).

1.5 Zusammenhang zwischen Glykolyse und Tumormalignität

Durch die gesteigerte Glykolyserate wird im Tumorgewebe verstärkt Laktat gebildet. Eine klinisch diagnostische Relevanz dieses Metabolits konnte in verschiedenen unabhängigen Studien an drei unterschiedlichen Tumorentitäten gezeigt werden. So korreliert ein hoher Gehalt an Laktat im Primärtumor mit einem verstärkten Risiko der Metastasierung in Karzinomen des Gebärmutterhalses (Walenta et al., 2000), des Kopf-Hals-Bereichs (Brizel et al., 2001) und in Adenokarzinomen des Rektums (Walenta et al., 2003). In den Studien der beiden zuerst genannten Entitäten konnte eine signifikant verringerte Überlebensrate der Patienten mit so genannten Hochlaktattumoren im Gegensatz zu solchen mit Niedriglaktattumoren festgestellt werden.

Andere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem Glukosestoffwechsel und der Strahlensensibilität solider Tumoren, Tumormodellen (Sphäroid) und Tumorzellen herstellen. Demnach weisen Tumorzellen, bei denen die Glykolyse inhibiert wird, eine höhere Sensibilität gegenüber Bestrahlung (fraktioniert und Einzeldosis) auf, bzw. zeichnen sich Hochlaktattumoren durch eine stärkere Strahlenresistenz aus (Gorlach und Acker, 1994; Lin et al., 2003b; Quennet et al., 2006). Gorlach & Acker (1994) und Yaromina et al. (2006) konnten dabei keinen Zusammenhang mit der Sphäroid- bzw. Tumoroxygenierung feststellen.

1.6 Pyruvat als prognostischer Faktor in der Tumorthherapie?

Ansätze der Tumorthherapie sind neben vielseitigen anderen Strategien die Behandlung mit Röntgen- oder ionisierender Strahlung und/oder der Einsatz von Chemotherapeutika. Dabei entstehen im Gewebe ROS, die auf unterschiedliche Weise die Zellen schädigen. Durch die gesteigerte Glykolyserate im Tumorgewebe wird vermehrt Pyruvat produziert, welches z.B. unter Hypoxie zu einer Akkumulation von Laktat im Gewebe führen kann oder unter Umständen selbst angereichert wird. Durch seine antioxidativen Eigenschaften kann Pyruvat Zellen vor metabolischem Stress schützen. Im Falle von Tumorzellen würde dies dem Tumor einen Vorteil gegenüber solchen Therapieansätzen schaffen, die auf der Induktion von metabolischem Stress durch ROS beruhen. Ein hoher Pyruvatgehalt im soliden Tumor sollte demzufolge mit einer erhöhten Strahlenresistenz einhergehen. Quennet et al. (2006) konnten einen solchen Zusammenhang zwischen Laktat, welches ebenfalls antioxidative Eigenschaften besitzt (Groussard et al., 2000), und der Strahlensensibilität in humanen Xenotransplantaten finden. Als Maß für die Strahlensensibilität eines Tumors wurde die so genannte TCD₅₀ (Tumor Control Dose) herangezogen. Sie ist definiert als die Strahlendosis, die benötigt wird, um 50 % eines Tumorkollektivs lokal zu entfernen (Yaromina et al., 2006). Ob Pyruvat allein oder aber das L/P-Verhältnis als Abbild des Redoxstatus im Tumorgewebe eine prädiktive Aussage über die Strahlensensibilität und damit den Behandlungsmöglichkeiten solider Tumoren zulässt, ist bisher unklar.

1.7 Aufgabenstellung

Aufgabenstellung und Ziel des vorliegenden Projekts war die biochemische und experimentelle Entwicklung eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von Pyruvat und die Darstellung der räumlichen Verteilung dieses Metabolits in schockgefrorenen Gewebeproben. Der Nachweis sollte über eine gekoppelte Biolumineszenzreaktion erfolgen, deren Lichtemission mit Hilfe eines hoch-sensitiven Videosystems mit computergestützter Bildverarbeitung registriert werden kann.

Biolumineszenz ist die Fähigkeit einiger Lebewesen, wie z.B. von Mikroorganismen, Insekten oder Bewohnern der Tiefsee, Licht im sichtbaren Bereich zu erzeugen. Sie hat bei den einzelnen Arten völlig verschiedene Aufgaben; so dient sie zum Anlocken von Fortpflanzungspartnern oder Beutetieren, zur Kommunikation, als Warn- oder Drohgebärde; sie kann aber auch zur Abschreckung, Ablenkung oder Tarnung dienen. Die Funktion der Biolumineszenz im Leben der leuchtenden Organismen ist aber oft nur unzureichend geklärt. Biolumineszenz ist eine spezielle Form der Chemilumineszenz und entsteht natürlicherweise durch biochemische Reaktionen in Zellen, bei denen chemische Energie in Form von Lichtquanten abge-

geben wird. Eine Schlüsselposition nehmen die so genannten Luziferasen ein: Sie katalysieren die Umsetzung organischer Substratmoleküle zu energetisch angeregten Intermediaten. Bei der Rückkehr in den Grundzustand senden diese die frei werdende Energie in Form von Licht aus. Es handelt sich dabei also um eine so genannte kalte Emission, da die chemische Energie ohne Wärmeentstehung abgegeben wird. Die eingehende Erforschung der Biolumineszenz begann im 19. Jahrhundert. Schon 1887 erkannte R. DuBois, dass für die Biolumineszenz jeweils eine Luziferase und ein Luziferin notwendig sind (Luziferase-Luziferin-Modell). Die Aufklärung der molekulargenetischen Vorgänge begann 1982 mit dem Transfer von Biolumineszenzgenen des Leuchtbakteriums *Vibrio harveyi* in *E. coli* (Winkler und Sicher, 1996).

Viele analytische Nachweisverfahren in den Bereichen Biologie, Chemie und Medizin nutzen mittlerweile Biolumineszenz-basierte Techniken. Sie werden z.B. zum Nachweis oder Interaktion von Proteinen oder als so genannte Reporter bei Analysen der Genregulation, zum quantitativen Nachweis von ATP, zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen, aber auch als Bioindikator für Luftverschmutzungen verwendet. *In vivo* können Genexpressionsraten transgener Tiere überwacht oder das Wachstum von Tumoren und Metastasen mit Hilfe spezieller Sonden beobachtet werden (Roda et al., 2004; Sadikot und Blackwell, 2005; Welsh und Kay, 2005).

Biolumineszenz macht mit Hilfe einer speziellen Technik aber auch die Quantifizierung und räumliche Darstellung von Metaboliten des Glukose- und Energiestoffwechsels in Geweben möglich. Dazu werden zwei unterschiedliche Biolumineszenzsysteme verwendet. ATP wird in einer direkten Lichtreaktion durch die Luziferase des Amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* umgesetzt (Abbildung 2-6) (McElroy und DeLuca, 1983). Bei den Nachweisen von Laktat und Pyruvat handelt es sich um gekoppelte Enzymreaktionen, deren letzter und damit Licht-produzierender Schritt durch die Luziferase aus dem Meeresbakterium *Photobacterium fischeri* katalysiert wird. Der Laktat-Nachweis wird im Detail unter Abschnitt 2.7.2 beschrieben, die biochemischen Reaktionen sind in Abbildung 2-7 dargestellt. Die Grundlagen der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzreaktion werden im Detail in Abschnitt 2.5.1 beschrieben. Abbildung 2-5 zeigt die gekoppelten biochemischen Reaktionen.

Die Pyruvat-abhängige Lichtreaktion sollte soweit etabliert werden, dass eine Kalibrierung und damit Quantifizierung unbekannter Proben möglich ist. Zudem sollte ein direkter Vergleich der Metabolitverteilung mit der histologischen Struktur der Kryoschnitte erfolgen und damit die Datenerfassung in definierten Geweberegionen ermöglicht werden. Anhand von geeignetem Probenmaterial sollte die neue Methode angewendet und die Gewebeproben hinsichtlich dieses Stoffwechselprodukts und anderer Parameter analysiert werden. Die Frage, ob Pyruvat als prognostischer Faktor klinisch relevant sein könnte, sollte eruiert werden.

Durch Kombination der bereits etablierten Laktat-abhängigen Biolumineszenzmethode (Mueller-Klieser und Walenta, 1993) sollte die Darstellung des regionalen L/P-Verhältnisses durch topographische Überlagerung mit Bildern der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz mit Hilfe von speziellen Softwareprogrammen erarbeitet werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Gewebeproben und Tumormaterial

2.1.1 Gewebeproben für Referenzmessungen

Schweineleber für die Gewebehomogenate, die für die Wiederfindungsexperimente der Biolumineszenzmethode verwendet wurden, stammte aus dem Lebensmittelfachhandel. Sie wurde bis zur Verarbeitung bei +5 °C gelagert.

2.1.2 Tumormaterial

Bei dem untersuchten Tumormaterial handelt es sich um Xenotransplantate (zur Erläuterung siehe Abschnitt 2.1.3) humaner Tumorklinien aus dem Kopf-Hals-Bereich der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Baumann (Strahlentherapie und Onkologie, Technische Universität Dresden). Das Material stammt aus einem DFG-finanzierten Projekt (Mu 576/14-1,-2,-3), welches in unserer Arbeitsgruppe bearbeitet wurde (Quennet, 2007).

Des Weiteren wurden Biopsien zur Verfügung gestellt, die aus gemeinsamen Projekten von Herrn Prof. Dr. Dr. Reichert (Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Mainz) und Prof. Dr. Dr. A. Lehr (Pathologisches Institut, Mainz) stammen.

2.1.2.1 Xenotransplantate

Xenotransplantate entstehen durch die Transplantation lebender Zellen oder Gewebe von einer Spezies in eine andere. In der vorliegenden Arbeit wurden acht humane, auf NMRI (nu/nu) Mäuse xenotransplantierte Plattenepithelkarzinomzelllinien aus dem Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) analysiert; die Zelllinien sind in Tabelle 2-1 näher beschrieben. Die UTSCC-Linien wurden im Labor von Dr. Grénman aus Tumorgewebe *in vitro* etabliert. FaDu ist eine in Dresden kultivierte Sublinie der Zelllinie FaDu (ATCC: HTB-43). Die weiteren Tumorklinien wurden käuflich erworben; XF354 vom Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, SAS von der Health Science Research Resources Bank und Cal33 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ). Die Mäuse stammen aus dem Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät der TU Dresden. Die hier verwendeten Xenotransplantate entstammen Tumoren, die durch Zellinjektionen der entsprechenden Linien etabliert und anschließend in kleine Stücke (ca. 1 mm im Durchmesser) zerteilt wurden. Diese wurden nach einer Ganzkörperbestrahlung (4 Gy; 200 kV Röntgen, 0,5 mm Cu Filter, 1 Gy/min) den 7-14 Wochen alten Tieren unter Anästhesie subkutan ins rechte Hinterbein transplantiert. Direkt nach der Entnahme des Tumors wurde dieser in flüssigen Stickstoff überführt und dann bei wenigstens -20 °C aufbewahrt. Der Versand des Pro-

benmaterials nach Mainz erfolgte stets auf Trockeneis. Für die Durchführung der beschriebenen Experimente an Mäusen lag eine Tierversuchsgenehmigung des Regierungspräsidiums Dresden vor. Als strahlenbiologisches Charakteristikum der Tumorkollektive lokal zu kontrollieren. Weitere Details zu den Versuchstieren, der Implantationstechnik, dem Bestrahlungsplan, der strahlenbiologischen Charakterisierung und der Tumorentnahme finden sich in Yaromina et al. (2006).

Tabelle 2-1: Charakterisierung der auf Mäuse xenotransplantierten humanen Plattenepithelkarzinomlinien.

Tumor	Ursprung	Histologie	TCD ₅₀ [95 % KI]**
Cal33	Zunge Primärtumor	Grad II	105,2 [90,1; 140,6]
FaDu	Hypopharynx Primärtumor	Grad IV	85,2 [78,0; 95,6]
SAS	Zunge Primärtumor	Grad IV	126,7 [115,0; 140,2]
UT-SCC-5	Zunge Metastase	Grad II	129,8 [99,9; 168,8]
UT-SCC-14	Zunge rekurrenter Primärtumor	Grad II	52,1 [46,4; 58,3]
UT-SCC-15	Zunge Primärtumor	Grad I	78,1 [63,9; 108,8]
UT-SCC-45	Mundboden persistierender Primärtumor	Grad II	45,4 [33,8; 51,3]
XF354	Mundboden LK-Metastase	Grad I	47,4 [40,9; 54,6]

*TCD₅₀ = Tumor Control Dose nach Yaromina et al. (2006)

**KI = Konfidenzintervall.

Alle weiteren Angaben sind der Dissertation von V. Quennet (2007) entnommen bzw. Informationen der AG Baumann, TU Dresden.

2.1.2.2 Humanbiopsien

Bei den analysierten Proben handelt es sich um Biopsien maligner Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs aus Zahnextraktionsmaterial.

Die Entnahme der Biopsien fand vor der eigentlichen Tumorsektion statt. So war auszuschließen, dass sich die Metabolitgehalte durch operative Manipulation veränderten. Die Biopsien wurden sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und weiterhin bei -80 °C aufbewahrt. Klinische Daten der Patienten sind in Tabelle 2-2 aufgeführt. Dort ist die so genannte TNM-Klassifizierung der Biopsie angegeben. "T" steht für Tumor und bezeichnet die Ausdehnung des Primärtumors, wobei ein Tumor, der mit T1 klassifiziert wurde, höchstens 2 cm beträgt, bis hin zu T4, einem Tumor größer als 5 cm. "N" steht für Nodus und beschreibt das (Nicht-)Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen. Dabei

bedeutet N0, dass es keine Anzeichen für einen Lymphknotenbefall gibt, Zahlen bis 3 zeigen einen zunehmenden Befall der Lymphknoten an. "M" steht für Metastase und stellt das Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen dar. Dabei zeigt M0 keine Anzeichen, M1 jedoch die Existenz von Metastasen an.

Tabelle 2-2: Klinische Daten der Patienten der HNSCC-Biopsien.

Biopsiebezeichnung	Spender	Probenentnahme	T	N	M
HF	♀	20.03.1998	4	0	0
TR02	♂	07.06.2000	–	1	0
TR03	♀	06.12.2000	1	0	0
TR04	♂	21.12.1998	4	2	0
TR06	♂	12.01.1999	2	1	0
TR10	♂	03.08.2000	4	2	0
TR11	♂	22.01.2001	2	2	0
TR18	♂	16.05.2000	4	2	0
TR19	♂	31.07.2000	2	0	0

T = Tumor; N = Nodus; M = Metastase.

2.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung der Gefrierschnitte wurden die Gewebeproben der humanen HNSCC-Biopsien zunächst für 20 Minuten in das Kryomikrotom gelegt, um einen Ausgleich der Temperatur innerhalb des Kryostats und des zu schneidenden Objekts zu gewährleisten. Anschließend erfolgte das Aufbringen der Probe mit Hilfe von Einbettmedium auf einen Metallblock. Bei einer ausreichenden Größe wurden zur späteren Orientierungshilfe parallele Stichkanäle mit Hilfe einer speziellen Biopsiegabel in das Gewebe eingestochen. Abbildung 2-1 zeigt die bei -20 °C angefertigten Schnittfolgen. Aufeinander folgend wurden jeweils drei Schnitte für die Histologie (10 µm), je ein Schnitt für die ATP- bzw. Laktat-abhängige Biolumineszenzmessung (16 µm) und ein Schnitt für die Verwendung für die Pyruvat-abhängige Biolumineszenzmessung (20 µm, siehe unten) angefertigt. Diese Reihenfolge (Serie) wiederholte sich drei- bis viermal. Nach jedem Umstellen der Schnittdicke erfolgte ein Fehlschnitt. Schnitte für die Biolumineszenzmessungen wurden auf 60 x 24 mm große, kurz vorgekühlte Deckgläser aufgenommen und sofort für 10 Minuten auf eine 100 °C heiße Heizplatte gelegt. Durch diese Maßnahme erfolgte die Denaturierung und Inaktivierung von im Gewebe vorkommender Enzyme. Zusätzlich verdampfte so die komplette Feuchtigkeit aus dem Gewebeschnitt. Bis zur Biolumineszenzmessung lagerten die Schnitte bei -20 °C. Für die Histologie wurden die Gewebeschnitte auf spezielle Adhäsionsobjektträger aufgenommen. Superfrost Plus-Objektträger zeichnen sich durch eine permanente positive La-

dung aus, wodurch sie frische Gefrierschnitte durch elektrostatische Anziehungskraft binden, ohne dass spezielle Haftstoffe oder Proteinbeschichtungen notwendig sind. Des Weiteren vermeidet Superfrost Plus-Glas bei den nachfolgenden Färbeverfahren unerwünschte Hintergrundfärbungen. Nachdem die Schnitte für die Histologie über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet waren, konnten sie für 7 Minuten in Aceton fixiert und luftgetrocknet werden. Die Lagerung der fixierten Objekte erfolgte bis zur immunhistochemischen Färbung bei Raumtemperatur.

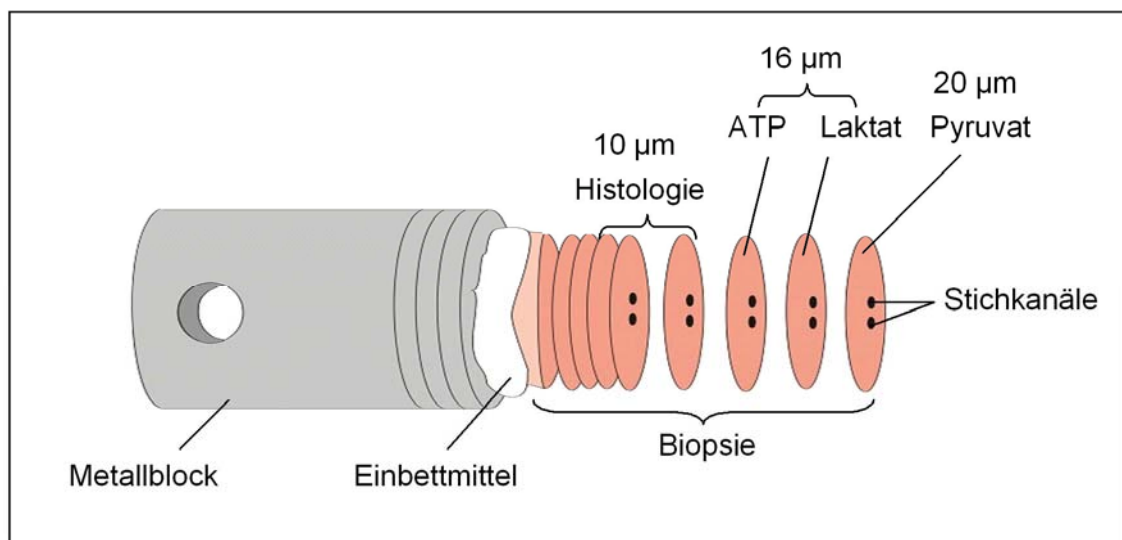


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung zur Herstellung von Schnittserien.

Gewebebeuren wurden im Kryostat bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Serien geschnitten. Schnitte für histologische Untersuchungen wurden $10\text{ }\mu\text{m}$, solche für die Bestimmung von ATP und Laktat $16\text{ }\mu\text{m}$, die für Pyruvat $20\text{ }\mu\text{m}$ dick geschnitten. Stichkanäle in der Biopsie dienten der Orientierung bei der späteren computergestützten Überlagerung der Schnitte.

Die aus Dresden stammenden Xenotransplantate wurden dort in Serien geschnitten. Unmittelbar vor dem Schneiden erfolgte auch hier das Einbringen von parallelen Stichkanälen in den Tumor zur späteren Orientierung. Von jeder Tumorklinie wurden zehn bis zwölf Biopsien hergestellt und geschnitten. Diese unterteilten sich in je fünf bzw. sieben Segmente, wobei aus jedem Segment Schnittserien hergestellt wurden. Daraus folgt, dass für jede Tumorbiose bis zu 7 Schnittserien und damit bis zu 7 Einzelschnitte für Messungen der Metabolite Laktat, ATP und Glukose zur Verfügung standen. Diese Messungen wurden im Rahmen des zeitgleich laufenden DFG-geförderten Projekts (Mu 576/14-1,-2,-3) von Verena Quennet durchgeführt und ausgewertet (Quennet et al., 2006; Quennet, 2007). Für die Bestimmung von Pyruvat dienten lediglich Schnitte vom Ende des jeweils letzten Segments. Allerdings waren nicht von jeder Tumorklinie und Tumorbiose Schnitte verfügbar. Ein paralleler Schnitt

diente zur Strukturfärbung mit HE. Schnittdicken und Fixierungen erfolgten wie oben beschrieben. Für Pyruvat wurden die Schnitte anfänglich 16 µm dick geschnitten. Später wurden die Schnitte aufgrund einer höheren Lichtausbeute 20 µm dick geschnitten (siehe hierzu Abschnitt 3.5 und Abbildung 3-12).

2.3 Histologische Untersuchungen

2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)

Die HE-Färbung ist die gebräuchlichste Übersichtsfärbung, die Zellkerne und cytoplasmatische Strukturen anfärbt. Sie erlaubt unter anderem eine Differenzierung zwischen vitalem und nekrotischem Gewebe. Die Kryoschnitte (10 µm Dicke) wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Fixierung erfolgte für 7 Minuten bei Raumtemperatur in Aceton. Die HE-Färbung entsprach den üblichen Standardprotokollen.

2.3.2 Cytokeratin-Färbung an Gewebeschnitten humaner HNSCC-Biopsien

Mit Hilfe der Biolumineszenztechnik ist es möglich, Metabolitvorkommen bestimmten Regionen innerhalb des der Messung zugrunde liegenden Kryoschnittes zuzuordnen. Dies erfordert die Anfertigung benachbarter Serienschnitte (siehe Abbildung 2-1). Die Identifizierung von Tumorzellen epithelialen Ursprungs, wie es bei den hier untersuchten HNSCC der Fall ist, erfolgte anhand der Markierung des epithelialen Markers Cytokeratin. So konnte für diesen spezifischen Gewebetyp der Metabolitgehalt innerhalb eines Kryoschnittes berechnet werden. Cytokeratine sind Eiweiße, die zur Stabilisierung der Struktur und Form einer Zelle beitragen. Zurzeit sind 20 verschiedene Isoformen bekannt. Die Cytokeratine 1-8 gehören zur neutral-basischen Typ-B Subfamilie, die Cytokeratine 9-20 zur sauren Typ-A Subfamilie. In epithelialen Intermediärfilamenten bilden diese Proteine Heterodimere aus Typ-A und Typ-B Cytokeratinen. Welche Cytokeratine eine Zelle exprimiert, hängt vom Typ des Epithels, dem Grad der Differenzierung und dem Entwicklungsstadium ab. Die Cytokeratin-Färbung eignet sich somit zur Detektion des Tumorgewebes in den hier untersuchten Biopsien des Kopf-Hals-Bereichs. Der hier verwendete Multi-Cytokeratin Antikörper stellt ein Gemisch dar, das verschiedene Isoformen erkennt. In Kombination mit der Beurteilung des HE-gefärbten Parallelschnitts ist somit eine eindeutige Zuordnung von Tumor- und Normalgewebe innerhalb eines Kryoschnittes möglich.

Kryoschnitte von 10 µm Dicke wurden nach dem Trocknen über Nacht für 7 Minuten bei Raumtemperatur in Aceton fixiert und anschließend für 20 Minuten luftgetrocknet. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und kurz in Aqua dest. rehydriert. Alle weiteren Schritte fanden bei Raumtemperatur statt. Endogene Peroxidasen wurden für 20 Minuten mit 0,6%iger H₂O₂-Lösung (in 40 % Methanol in PBS) blockiert. War die Bildung von Luftblasen

durch die Entstehung von Sauerstoff sehr stark, wurde erneut mit H_2O_2 inkubiert, bis die Blasenbildung nachgelassen hatte. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für je 2 Minuten in PBS/Tween20 (PBS mit 0,1 % Tween20) gewaschen. Die Inkubation des primären Antikörpers gegen humanes Cytokeratin (1:500 in Antikörperverdünnungspuffer) erfolgte für 1 Stunde in der feuchten Kammer. Als Negativkontrolle diente je ein Schnitt der zu untersuchenden Biopsie; hier wurde statt des primären Antikörpers lediglich PBS aufgebracht. Es wurde erneut dreimal je 2 Minuten in PBS/Tween20 gewaschen und anschließend unspezifische Bindungsstellen mit Ziegen-Normalserum (20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Antikörperverdünnungspuffer) für 30 Minuten blockiert. Nach einem weiteren, wie oben beschriebenen Waschschrift erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers gegen Kaninchen für 30 Minuten in der feuchten Kammer. Anschließend wurden die Schnitte erneut gewaschen. Zuletzt fand die Detektion des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers mit Hilfe von DAB für 5 Minuten statt. Dabei wurde das Chromogen 1:50 in Substratpuffer, der unter anderem H_2O_2 als Substrat enthält, verdünnt. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase bildet mit seinem Substrat einen Komplex, wobei DAB als elektronenspendendes Chromogen fungiert. Die frei werdenden Protonen oxidieren das Chromogen zu einem braunen Endprodukt. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für je 2 Minuten in PBS und danach in Aqua dest. getaucht und zuletzt für ca. 3 Minuten in Hämalaun gefärbt. Bläuen, Entwässern und Eindecken verlief nach standardisiertem Protokoll.

2.4 Das bildgebende Biolumineszenzverfahren

Zur Bestimmung des ATP- und Laktatgehalts in Gewebeschnitten wurden bereits bestehende, auf Biolumineszenz beruhende Techniken verwendet. Diese werden in Abschnitt 2.7 beschrieben. Für weitere Informationen zur Bestimmung dieser Metabolite siehe Walenta et al. (2004) und Mueller-Klieser und Walenta (1993). Darüber hinaus wurde eine neue Technik zur Quantifizierung von Pyruvat und dessen räumlicher Verteilung in Kryoschnitten beliebiger Gewebe entwickelt. Das Prinzip der biochemischen Reaktionen ist in Abschnitt 2.5.1 beschrieben und schematisch dargestellt (siehe Abbildung 2-5). Die methodische Etablierung der Biochemie und des Messverfahrens ist ebenfalls in Abschnitt 2.5 erklärt und wird bezüglich ihrer Anwendbarkeit im Ergebnisteil charakterisiert.

2.4.1 Messaufbau und Registrierung

Die Apparatur zur Registrierung der Biolumineszenz ist in Abbildung 2-2 dargestellt. Sie besteht aus einer metallischen Messform mit Reaktionsmulde innerhalb einer thermostatisierten Kammer mit Schublade. Diese befindet sich auf dem Objektisch eines Mikroskops mit einem 1,25x-Objektiv. An das Mikroskop ist ein System aus Photonenverstärker und orts-

empfindlicher, digitaler CCD-Kamera angeschlossen. Über eine Verbindungsschnittstelle werden die digitalen Daten auf einen Computer übertragen. Die gesamte Anordnung aus Mikroskop, Messkammer, Photonenverstärker und Kamera befindet sich innerhalb einer „Black Box“, um die Detektion von Hintergrundlicht zu vermeiden.

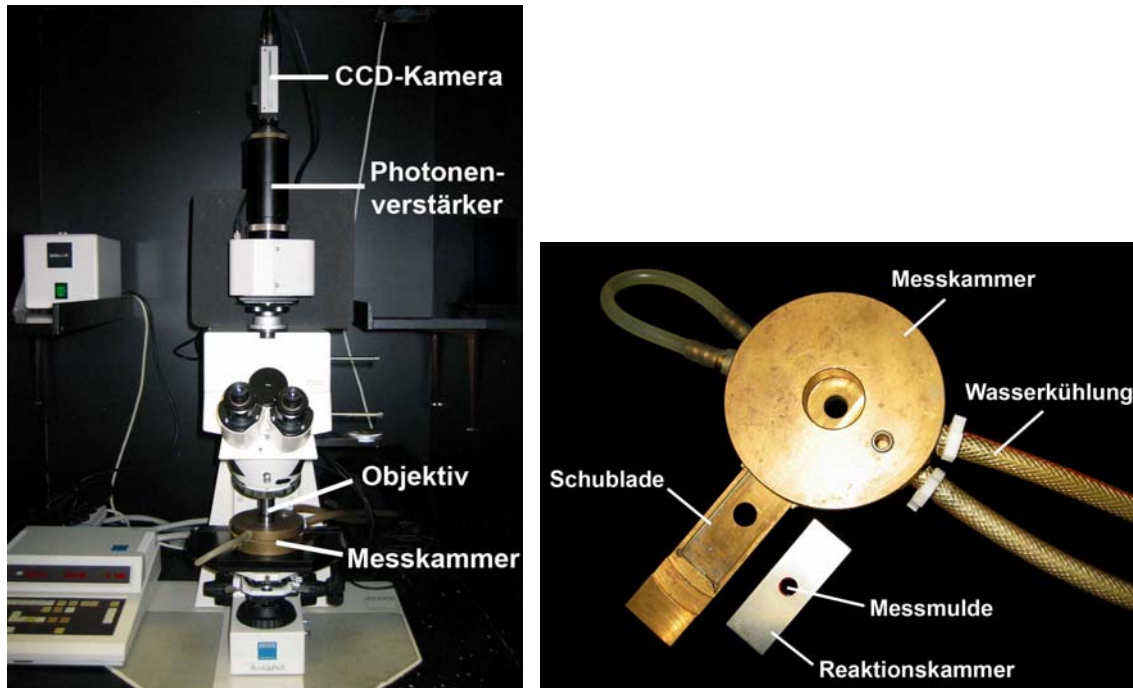


Abbildung 2-2: Schema der Biolumineszenzapparatur.

Die Biolumineszenzapparatur besteht aus einer thermostatisierten Messkammer (detaillierte Darstellung auf der rechten Seite) auf dem Objektisch eines Mikroskops mit angeschlossenem Photonenverstärker und CCD-Kamera zur Registrierung der Biolumineszenz. Die gesamte Apparatur befindet sich in einem lichtgeschützten Schrank innerhalb eines klimatisierten Raumes. Auf einem Deckglas befindliche Gefrierschnitte werden kopfüber in eine Enzymlösung getaucht, die sich in der Messmulde der Reaktionskammer befindet. Dieses „Sandwich“ wird in die Schublade der thermostatisierten Messkammer auf dem Objektisch des Mikroskops überführt. Die einsetzende Lichtemission wird mit einem hoch-empfindlichen Photonenverstärker und einer CCD-Kamera aufgenommen.

2.4.2 Das Prinzip der Photonenregistrierung

Bei den Biolumineszenzreaktionen entstehen sehr schwache Lichtereignisse. Sie liegen im Bereich von weniger als 10^8 Photonen/($\text{mm}^2 \cdot \text{s}$). Um diese geringen Lichtintensitäten registrieren zu können, muss das Nachweissystem sowohl eine sehr empfindliche Aufnahme- als auch Verstärkereinheit besitzen. Dies wird durch das Hintereinanderschalten einer Photokathode, einer zweistufigen Mikrokanalplatte (Multichannel-Plate, MCP) und einem Phosphorschirm erreicht. Eine CCD-Kamera nimmt dann das Leuchten des Phosphorschirms auf. In Abbildung 2-3 ist die Registriereinheit und deren Funktionsweise schematisch dargestellt.

Die MCP ist entscheidend für die Intensität und Auflösung des Bildes. Im Folgenden wird daher die Funktionsweise eines solchen Verstärkers näher beschrieben.

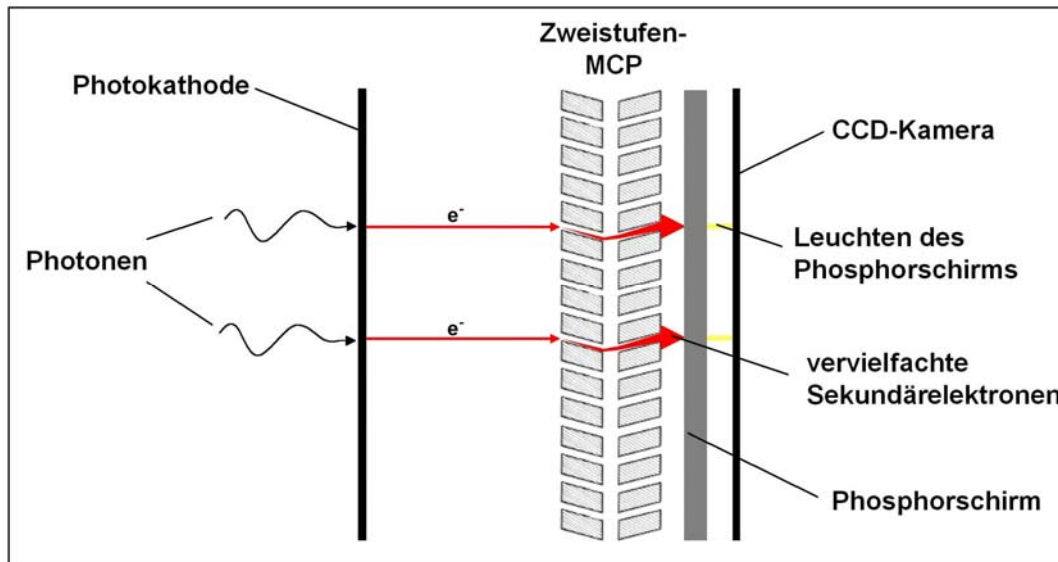


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Registriereinheit der Biolumineszenz.

Das auf die Photokathode auftreffende Photon löst ein Elektron aus, welches durch den Multi-channel-Plate vervielfacht wird. Die Sekundärelektronen treffen dann auf einen Phosphorschirm auf, dessen Leuchten von einer nachgeschalteten CCD-Kamera registriert wird. *Modifiziert nach Informationen der Firma Hamamatsu.*

2.4.3 Der Multichannel-Plate-Verstärker

MCPs sind flächenhafte, bildauflösende Sekundärelektronenvervielfacher. Sie bestehen aus Millionen sehr dünner leitfähiger Glaskapillaren, die einen Durchmesser von 6 bis 25 μm haben. Diese werden verschmolzen und zu dünnen Platten geschnitten, wobei die Dicke dieser Platten typischerweise bei 0,48 mm liegt. Auf der Eingangs- und Ausgangsseite befinden sich Elektroden. Trifft ein Photoelektron durch die elektrostatische Spannung in eine solche Faser ein, trifft es auf die Kanalwand und löst dort weitere Elektronen aus. Die Kanäle sind um 5° bis 15° gegen die Plattenachse gedreht, so dass die einfallenden Elektronen mit Sicherheit mehrmals die Kanalwand treffen. Sie werden dann von der zwischen den Platten längs der Kanäle anliegenden elektrischen Spannung beschleunigt und vervielfachen sich bei jedem Wandstoß. Jeder Kanal funktioniert also als ein unabhängiger Sekundärelektronenmultiplikator. An der Austrittsseite hat sich die Zahl der Elektronen durch Vielfachstöße mit der Kanalwand um das ca. 1000fache erhöht. Durch eine Nachbeschleunigungsstrecke werden die verstärkten (vervielfachten) Elektronen auf den eigentlichen Detektor gelenkt, zum Beispiel wie hier, auf einen Phosphorschirm. Dort lösen die Sekundärelektronen ein Leuchten aus. Ein Schema eines Multichannel-Plates ist in Abbildung 2-4 dargestellt.

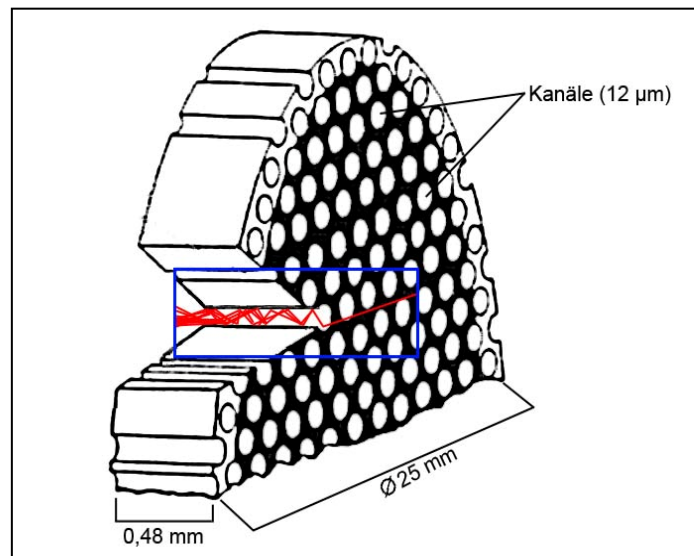


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung eines Multichannel-Plates.

Das Multichannel-Plate besteht aus Millionen einzelner Glasfaserkanäle, die jeweils unabhängig voneinander als Sekundärelektronenvervielfacher (blauer Kasten) dienen. *Informationen der Firma Hamamatsu nachempfunden.*

2.4.4 Verarbeitung der Bildinformation

Das Leuchten des Phosphorschirms wird durch eine CCD-Kamera aufgenommen. Es können also direkt zweidimensionale Intensitätsverteilungen registriert werden. Das System bietet einen speziellen Aufnahmemodus für schwache Lichtereignisse, der als *Photon Counting Acquisition* bezeichnet wird. Dabei werden im Abstand von 0,04 Sekunden die auf dem Phosphorschirm entstehenden Leuchtflecke registriert und anschließend im Bildspeicher akkumuliert. Durch die Messzeit wird die Anzahl der kumulierten Teilbilder festgelegt. Bei einer Messzeit von 60 Sekunden entspricht dies einer Addition von 1500 Einzelbildern. Die Einzelbilder besitzen eine Auflösung von 768x574 Pixel; jedes Pixel hat eine Informationstiefe von 16bit. Die gewonnenen Bilder werden im „tagged image file format“ (TIFF) gespeichert. Die Software ImageJ kann diese Graustufenbilder mit 16bit Tiefe direkt verarbeiten. Für das Auswerten mit Photoshop müssen die 16bit-Bilder in ein 8bit-Format umgewandelt werden.

2.4.5 Durchführung der Biolumineszenzmessung

Biolumineszenzmessungen erfolgten in einem auf 22 °C temperiertem und abgedunkeltem Raum. Vor der Registrierung der Biolumineszenz wurde ein Durchlichtbild des Gewebeschnittes angefertigt, um die Intensitätsverteilungen der Lichtreaktion neben HE- und Cytokeratin-gefärbten Parallelschnitten histologischen Strukturen zuordnen zu können. Für die Messung wurde das mit einem Gewebe- bzw. Standardschnitt versehene Deckglas mit der Oberseite nach unten und mittig auf der Mulde der metallischen Messform ausgerichtet und

arretiert. Die Mulde wurde mit 60 μl Enzymlösung gefüllt und der Schnitt luftblasenfrei mit der Lösung in Kontakt gebracht. Dieses „Sandwich“ wurde in die thermostatisierte Kammer (20 °C für ATP und Laktat, 30 °C für Pyruvat) innerhalb des Mikroskops transferiert. Nach einer für das jeweilige zu bestimmende Stoffwechselprodukt definierten Inkubationszeit erfolgte die Registrierung der Lichtemission für einen festgelegten Zeitraum.

2.5 Entwicklung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzmethode

2.5.1 Biochemische Reaktionen der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz

Das biochemische Prinzip basiert auf der Lumineszenz des Meeresbakteriums *Photobacterium fischeri*. Abbildung 2-5 zeigt die Reaktionsfolge der Biolumineszenz mit Pyruvat als Ausgangssubstrat. Dieses wird mittels spezifischer Enzyme mit dem $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$ -System gekoppelt, welches via Flavinmononukleotid (FMN und FMNH_2) mit der bakteriellen Luziferase verbunden wird. Pyruvat wird durch die PDH oxidativ decarboxyliert, wobei Acetyl-CoA und CO_2 entstehen. Cofaktoren/-enzyme dieser Reaktion sind Thiaminpyrophosphat (TPP), Coenzym A (CoA) und Nikotinadenindinukleotid (NAD^+). Anschließend wird das dabei entstehende $\text{NADH}+\text{H}^+$ durch die $\text{NAD(P)H}:\text{FMN}$ -Oxidoreduktase (NFO) zu FMNH_2 umgesetzt. Die Licht produzierende Reaktion wird an das generierte $\text{NADH}+\text{H}^+$ gekoppelt. Das Enzym Luziferase katalysiert die Oxidation von FMNH_2 und Decanal, einem langkettigen aliphatischen Aldehyd. Bei diesem Prozess entsteht Licht, welches der initialen Pyruvatkonzentration proportional war. Dies war eine entscheidende Voraussetzung für die quantitative Pyruvatbestimmung in unbekanntem Gewebeprobe.

Zunächst wurde die „Basisreaktion“ der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzreaktion, also die Umsetzung von Pyruvat durch die PDH, am Photometer und am Microplate Reader etabliert und optimiert. Danach wurden die Licht erzeugenden Reaktionen mit dieser Basisreaktion gekoppelt und die Biolumineszenz anhand von Standards definierter Pyruvatkonzentrationen in der Biolumineszenzapparatur getestet und weiter optimiert. Erst dann erfolgte das Kalibrieren der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzmethode mit Hilfe von Standardschnitten (siehe Abschnitt 2.8.1). Zuletzt konnten so Gewebeprobe anhand der Kalibrierungen hinsichtlich ihres Pyruvatgehalts und dessen Verteilung innerhalb des Schnittes untersucht werden.

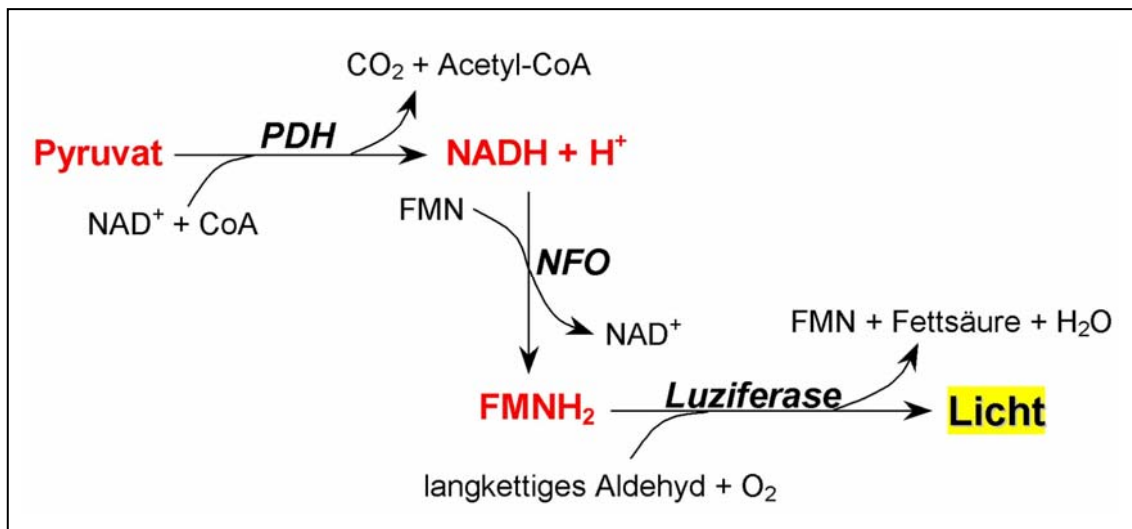


Abbildung 2-5: Biochemische Grundlagen der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzreaktionen.

Pyruvat wird durch die Pyruvatdehydrogenase (PDH) decarboxyliert. Das dabei entstehende $\text{NADH} + \text{H}^+$ wird durch die NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase (NFO) unter Bildung von FMNH_2 umgesetzt. Dieses geht als Substrat in die sich anschließende Lichtreaktion ein, die von der bakteriellen Luziferase katalysiert wird.

2.5.2 Etablierung der Basisreaktion an Photometer und Microplate Reader

Zunächst wurde die Basisreaktion der neuen Biolumineszenzmethode, also die Pyruvatdehydrogenase-Reaktion allein, photometrisch getestet und optimiert. Dazu wurde die Zusammenstellung der enzymatischen Komponenten, Cofaktoren und Puffer geändert. Der erste Versuch entsprach der Testprozedur für das Enzym PDH gemäß dem Protokoll der Firma Sigma (Sigma Prod. No. P-5194 and P-7032). Die Konzentrationen dieses Ansatzes waren: 51 mM MOPS-Cl (pH 7,4), 0,2 mM MgCl_2 , 0,01 mM CaCl_2 , 0,3 mM TPP, 0,12 mM CoA, 2 mM NAD^+ , 2,64 mM L-Cystein (pH 7,4), 0,01 U/ml PDH und 5,1 mM Pyruvat. Wenn nicht anders beschrieben, wurden diese Grundkomponenten verwendet und variiert. Für alle Optimierungstests wurden Pyruvatstandards in PBS (pH 7,4) angesetzt. Solche, die älter als vier Wochen waren, wurden verworfen und durch frisch angesetzte Lösungen ersetzt. Da später zu messende Gewebeextrakte in Perchlorsäure vorlagen, wurde der beste Test noch einmal mit in Perchlorsäure angesetzten Standards in einem Tris-gepufferten System gemessen. Dies wurde für weitere Konzentrationsbestimmungen unbekannter Proben in Perchlorsäure beibehalten.

2.5.3 Kopplung der Basisreaktion an die Licht erzeugende Reaktion

Zu der photometrisch getesteten Basisreaktion wurden die Komponenten der Lichtreaktion (FMN, Decanal, NFO und Luziferase) zugegeben und in die Reaktionsmulde der Biolumineszenzapparatur pipettiert. Dazu wurden zunächst Standardlösungen gegeben und Photonen für einen festgelegten Zeitraum registriert. Später erfolgte dieselbe Prozedur anhand von Standardschnitten definierter Pyruvatkonzentrationen und Schnittdicke (siehe Abschnitt 2.8.1). Die gekoppelten Reaktionen wurden so weit optimiert, bis sich die entstehende Lichtintensität nicht wesentlich steigern ließ.

2.6 Stabilität von Pyruvat

Um auszuschließen, dass endogene Enzyme die Biolumineszenzreaktion negativ beeinflussen und die zu untersuchenden Metabolite weiter verstoffwechselt werden, mussten die Gewebeschnitte zunächst hitzefixiert werden. Mithilfe des LDH-abhängigen photometrischen Tests (Abschnitt 2.10.3) wurden sowohl hitzebehandelte (30 Minuten, 121 °C, unter Druck) und sonifizierte (30 Minuten auf Eis), als auch nicht behandelte wässrige Pyruvatlösungen anhand von Standardkurven miteinander verglichen.

2.7 Enzymlösungen für die Biolumineszenzreaktionen

2.7.1 Enzymlösung für den ATP-Nachweis

Das biochemische Prinzip der ATP-abhängigen Biolumineszenzreaktion ist in Abbildung 2-6 dargestellt. Die Luziferase aus dem Amerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* katalysiert mit Magnesium als Cofaktor eine Adenylierung des Substrats Luziferin. Das entstehende Adenylsäureanhydrid wird unter Abspaltung von AMP zu einer energiereichen Dioxetanverbindung oxidiert. Durch eine sich anschließende Decarboxylierung wird der Grundzustand unter Aussenden eines Lichtquants wieder hergestellt.

Für die Enzymlösung des Nachweises von ATP wurden 5 g gefriergetrocknete Abdomen von *Photinus pyralis* fein gemörsert und zu 100 ml eines HEPES-Arsenat-Puffers (0,2 M HEPES mit 0,1 M Na₂HAsO₄, pH 7,6) gegeben. Arsenat dient als kompetitiver Inhibitor der Luziferase, wodurch die Lichtreaktion zeitlich gestreckt wird. So werden längere Integrationszeiten bei geringer Änderung der Lichtintensitäten möglich. Die Suspension wurde in einem Homogenisator unter Eiskühlung zerrieben. Die in den Abdomen vorhandenen Luziferase sowie das Luziferin wurden dadurch in Lösung gebracht. Unlösliche Bestandteile wurden für 10 Minuten bei 4 °C und 725 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, worin die Kontrolle des pH-Wertes erfolgte. Die Lösung wurde mit 200 µl 1 M MgCl₂ versetzt, portioniert und bei -80 °C gelagert. Vor der Messung musste die aufgetaute Enzymlösung für 30 Sekunden zentrifugiert werden. Nur der Überstand wurde für die Messungen verwendet.

Die Technik der hier verwendeten ATP-abhängigen quantitativen Biolumineszenz wurde erstmals 1990 von Walenta et al. (1990) beschrieben.

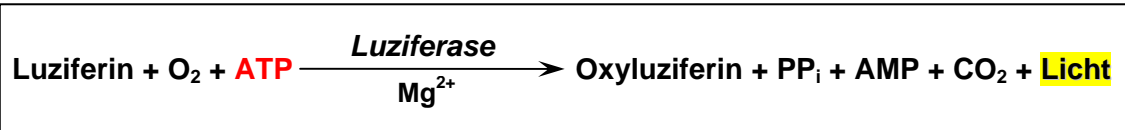


Abbildung 2-6: Biochemische Reaktion der ATP-abhängigen Biolumineszenz.

ATP und Luziferin werden unter Sauerstoffverbrauch durch das Enzym Luziferase des Amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* in AMP, PP_i, Oxyluziferin und CO₂ umgewandelt. Bei dieser Reaktion entsteht Licht mit einem Emissionsmaximum bei ca. 560 nm.

2.7.2 Enzymlösung für den Laktat-Nachweis

Zum Nachweis von Laktat wurde wie für den Pyruvatnachweis die Luziferase des Meeresbakteriums *Photobacterium fischeri* verwendet. Die Licht produzierende Reaktion besteht aus zwei Stufen, die ebenfalls von der NFO und der bakteriellen Luziferase katalysiert werden (siehe hierzu Abbildung 2-7). Das spektrale Maximum des ausgesandten Lichts liegt im blaugrünen Bereich nahe 500 nm.

Die Enzymlösung für den Nachweis von Laktat bestand aus 50 mM Glutamat, 160 mM NAD⁺, 0,4 mM FMN, 0,5 mM DTT, 0,5 mM Decanal (in Methanol), 463 U/ml Laktatdehydrogenase, 67 U/ml Glutamat-Pyruvat-Transaminase, 15 mU/ml Luziferase und 8 U/ml NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase aus *Photobacterium fischeri*. Die Reaktionslösung wurde in einem 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen. Zur Technik der Laktat-abhängigen Biolumineszenz siehe Mueller-Klieser und Walenta (1993).

2.7.3 Enzymlösung für den Pyruvat-Nachweis

Die Enzymlösung für den Pyruvatnachweis via Biolumineszenz bestand aus folgenden Grundkomponenten: MgCl₂, CaCl₂, TPP, CoA, NAD⁺, L-Cystein, PDH, FMN, Decanal, NFO und Luziferase in MOPS-Cl (pH 7,4). Die Optimierung der Lösung zählte zu den experimentellen Kernaufgaben der vorliegenden Arbeit.

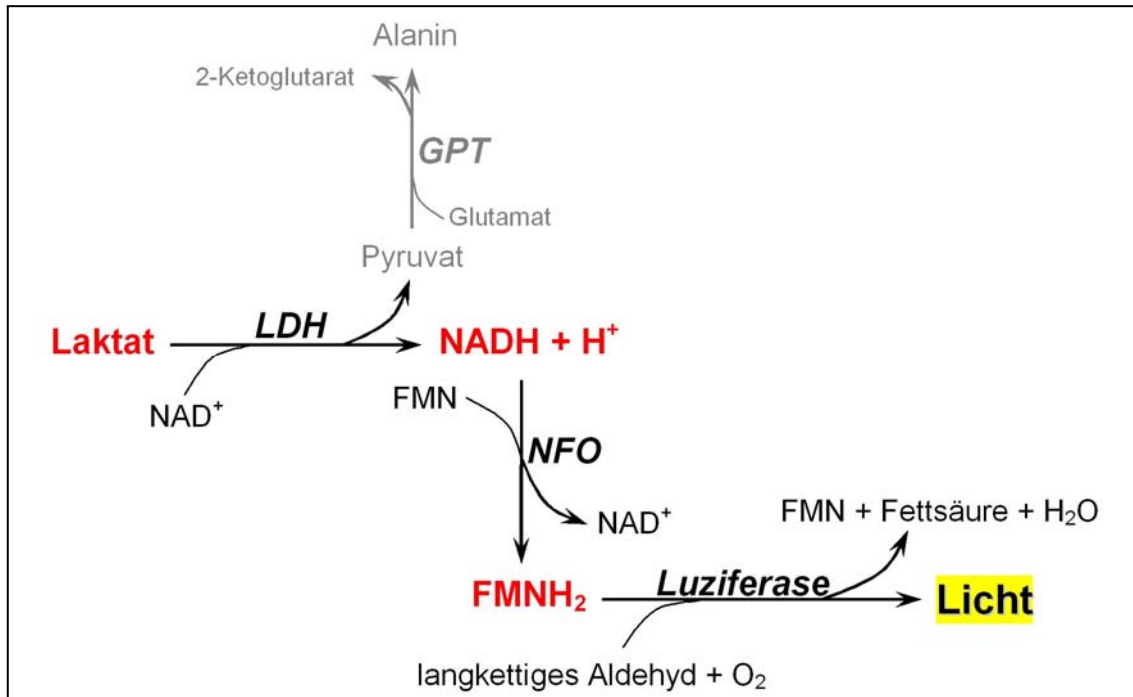


Abbildung 2-7: Biochemische Reaktionen der Laktat-abhängigen Biolumineszenz.

Laktat wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH) in Pyruvat umgewandelt. Dieses wird durch die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) weiter umgesetzt und kann so nicht mehr in die Umkehrreaktion eingehen. So verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht der LDH-katalysierten Reaktion zugunsten der Pyruvatbildung. Das bei der LDH-katalysierten Reaktion entstehende NADH+H⁺ wird durch die NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase (NFO) unter Bildung von FMNH₂ umgesetzt. Im nachfolgenden Schritt wird dieses unter Aussendung von Licht durch die bakterielle Luziferase oxidiert.

2.7.4 Analyse der Eigenschaften der Reaktionslösungen

Die Reaktionslösungen für die Biolumineszenzmethoden unterscheiden sich je nach nachzuweisendem Metaboliten in verschiedenen Eigenschaften, wie z.B. maximaler Leuchtintensität, Zeit bis zum Erreichen des Kinetikmaximums, Temperaturoptimum und Integrationszeitraum. Durch die Aufnahme einer Reaktionskinetik in Echtzeit über einen Zeitraum von 5 Minuten wurden für die einzelnen Enzymlösungen die in Tabelle 2-3 aufgelisteten Parameter ermittelt.

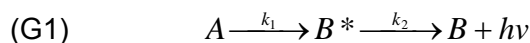
Tabelle 2-3: Messparameter der Enzymlösungen zur Erfassung von ATP, Laktat und Pyruvat in der bildgebenden Biolumineszenz.

Enzymlösung	Temperaturoptimum (°C)	Inkubationszeit (Sekunden)	Integrationszeitraum (Minuten: Sekunden)
ATP	21	30	1:00
Laktat	21	20	1:30
Pyruvat	30	8 - 12	1:30-2:00

2.8 Kalibrierung der Biolumineszenz

Bei der quantitativen Bestimmung von Metaboliten mit Hilfe der bildgebenden Biolumineszenztechnik nutzt man die Tatsache, dass das emittierte Licht proportional zur Umsatzrate des nachzuweisenden Stoffwechselprodukts ist. Durch Referenzmessungen an Gewebeäquivalenten mit bekannten Metabolitkonzentrationen, die gleichmäßig über einen speziell angefertigten, so genannten Standardschnitt verteilt sind, wird eine Kalibrierung erreicht. Durch die Messung einer Konzentrationsreihe innerhalb einer definierten Aufnahmezeit und den daraus resultierenden Lichtintensitäten wird eine Kalibrierungskurve erstellt. Daraus können später Lichtintensitäten unbekannter Proben rechnerisch eindeutigen Konzentrationen zugeordnet werden.

Bei der Biolumineszenzreaktion wird durch eine chemische Reaktion die lichtinduzierende Substanz, hier mit A gekennzeichnet, umgesetzt, wobei ein elektronisch angeregter Molekülkomplex B^* gebildet wird. Dieser kehrt anschließend unter Aussendung von Licht $h\nu$ in den Grundzustand B zurück.



Die vereinfachte Annahme bedeutet, dass diese beiden Teilreaktionen geschwindigkeitsbestimmend sind. Wenn man davon ausgeht, dass die Bildung von B^* quasi simultan zu dessen Verbrauch abläuft, dann gilt für die Konzentrationsänderung von B^* über die Zeit, eine Reaktion 1. Ordnung, folgende Gleichung:

$$(G2) \quad \frac{d[B^*]}{dt} = k_1[A] - k_2[B^*]$$

Für die Konzentration von A gilt:

$$(G3) \quad [A] = [A]_0 \times \exp(-k_1 t)$$

$[A]_0$ stellt hier die Anfangskonzentration des lichtinduzierenden Substrats, zum Beispiel Pyruvat, dar. Setzt man dies in Gleichung (G2) ein und löst die Differentialgleichung, dann ergibt sich:

$$(G4) \quad B^*(t) = \text{const} \times [A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t))$$

Die ausgesandte Lichtintensität I ist der Zerfallsrate von B^* und damit der Konzentration von B^* proportional.

$$(G5) \quad I = \text{const} \times k_2 [B^*]$$

So erhält man den zeitlichen Verlauf der ausgesandten Lichtintensität:

$$(G6) \quad I(t) = \text{const} \times [A]_0 \frac{k_1 \times k_2}{k_2 - k_1} (\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t))$$

Nach dieser Gleichung sind in Abbildung 2-8 theoretische Kinetikkurven dargestellt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Bildung von B^* parallel zu dessen Verbrauch abläuft.

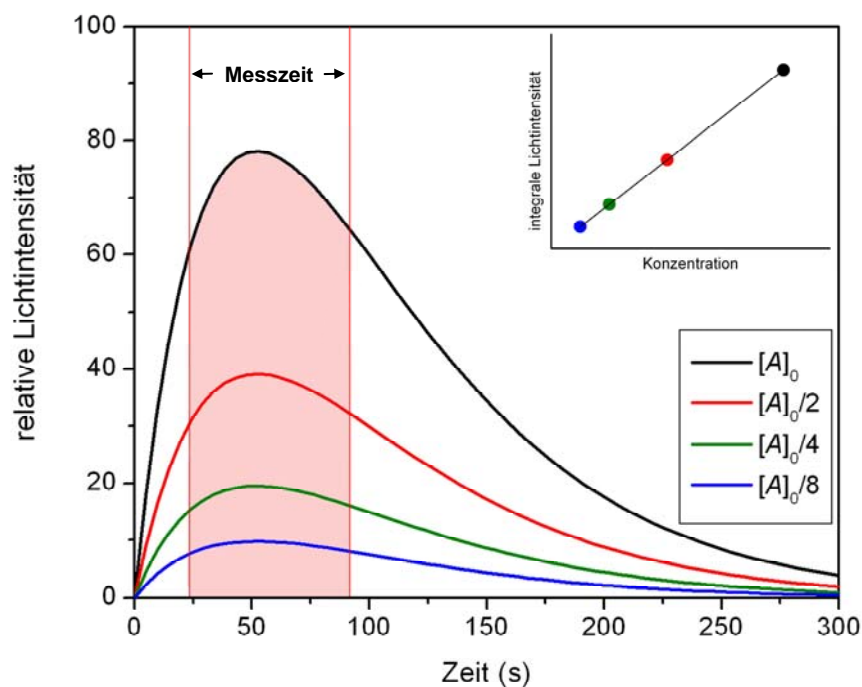


Abbildung 2-8: Ermittlung von Inkubations- und Integrationszeit für Biolumineszenzmessungen.

Vier theoretische Kinetikkurven nach Gleichung (G6) sind dargestellt. Die optimale Integrationszeit um das Maximum der Kinetikreaktion ist rot unterlegt. Die Zeit bis zum Beginn der Messzeit – und damit der Registrierung entstehender Photonen – stellt die Inkubationszeit dar. Die Ausgangskonzentration $[A]_0$ des lichtinduzierenden Substrats wurde vom höchsten Wert beginnend jeweils halbiert. Die Kalibriergerade ergibt sich aus der integralen Lichtintensität als Funktion der Zeit.

Ausgehend von der Kinetik einer Biolumineszenzreaktion (G6) ist die Lichtintensität zu jedem Zeitpunkt proportional zur Ausgangskonzentration $[A]_0$ der lichtinduzierenden Substanz. Dies gilt ebenso für das Integral der Lichtintensität innerhalb eines festen Zeitintervalls:

$$(G7) \quad \int_{t_0}^{t_1} I(t) dt = const \times [A]_0$$

Die Details zu den Biolumineszenzkinetiken wurden von Schwickert (1995) beschrieben.

Damit ist es für die Messung von Metaboliten in Gewebeschnitten möglich, die regionale Konzentration der Ausgangssubstanz zu bestimmen, indem man das aus dem Schnitt emittierte Licht für ein definiertes Zeitintervall ortsabhängig integriert. Dabei wählt man vorzugsweise einen Bereich um das Maximum der Intensität (siehe Abbildung 2-8), um so die Integrationszeit bei hoher Lichtausbeute gering zu halten und weiterhin eine Lateraldiffusion von Enzymen und Substrat zu minimieren. Bei Einsatz von Gewebeäquivalenten mit bekannten und gleichmäßig verteilten Metabolitkonzentrationen zur Kalibrierung, ergibt sich nach Gleichung (G7) ein linearer Zusammenhang zwischen dem Gehalt des Stoffwechselprodukts zu Beginn der Messung und ausgesandter Lichtintensität. Voraussetzung für die Verwendung einer solchen Kalibrierung ist die exakt gleiche Schnittdicke von Standard und Gewebeprobe (siehe hierzu auch Abbildung 3-12).

2.8.1 Standardschnitte für die Kalibrierung der Biolumineszenz

Zur Kalibrierung der Biolumineszenzmessungen von ATP und Laktat wurden ausschließlich in Einbettmedium eingerührte Standards verwendet. Für die Kalibrierung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz wurden sowohl diese als auch Gewebehomogenatstandards benutzt (siehe Abschnitt 2.8.3). Standards in Einbettmedium wurden im Gegensatz zu Gewebehomogenatstandards und Gefrierschnitten von Tumorproben nicht hitzefixiert.

2.8.2 Laktat und ATP

Je drei Volumenteile Einbettmedium wurden mit einem Volumenanteil Laktatlösung in 0,1 M Phosphatpuffer bzw. ATP-Lösung in HEPES-Arsenat-Puffer bekannter Konzentrationen für 30 Minuten gerührt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zur Herstellung der Standardschnitte wurden die zähflüssigen Suspensionen aufgetaut, drei- bis viermal invertiert und anschließend ein Tröpfchen auf einen vorgekühlten Metallblock aufgebracht und für ca. 10 Minuten im Kryostat gekühlt. Danach wurden $16\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ angefertigt. Die Schnitte wur-

den auf kurz vorgekühlte Deckgläser aufgenommen und für mindestens ein bis zwei Wochen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Gefriertrocknung aufbewahrt.

2.8.3 Pyruvat

2.8.3.1 Konzentrationsstandards in Einbettmedium

Die Pyruvatlösungen bekannter Konzentrationen wurden wie oben beschrieben in Einbettmedium eingerührt. Die Schnittdicke für die Biolumineszenzmessung betrug hier allerdings $20\text{ }\mu\text{m}$, da sie eine höhere Lichtintensität ergab (siehe hierzu Abbildung 3-12).

2.8.3.2 Konzentrationsstandards in Gewebehomogenaten

150 g Schweineleber wurde in etwa 2 cm^3 große Stücke geschnitten und für 40 Minuten bei $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ in PBS erhitzt. Nach Entnahme der Stücke aus der Flüssigkeit wurden sie mit Hilfe eines Mixers zu einem homogenen Brei zerkleinert. Anschließend wurde dieser durch ein feinmaschiges Metallsieb gepresst, um noch vorhandene kleinere Septen und Fasern zu entfernen. Im Falle eines zu trockenen Homogenats, wurde es mit PBS angefeuchtet und gut durchmischt. Im umgekehrten Fall wurde überschüssige Flüssigkeit durch Zentrifugieren beseitigt. Jeweils 3 g des so präparierten Leberhomogenats wurden mit je 0,5 ml einer Pyruvatlösung bekannter Konzentration in PBS (pH 7,4) versetzt und für mindestens 1 Minute kräftig durchmischt. Die Homogenate wurden für 2 Minuten mit Ultraschall behandelt (output control 60), für einige Minuten auf Eis gestellt und nochmals gut durchmischt. Je 1 g dieser Konzentrationsstandards wurden für HPLC und photometrische Tests entnommen; der Rest wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Für die Pyruvat-abhängige Biolumineszenzmessung wurden $20\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte der tiefgekühlten Leberhomogenatstandards hergestellt, auf kurz vorgekühlte Deckgläser aufgenommen und für 10 Minuten bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ hitzefixiert. Danach wurden die Schnitte bis zur Messung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.8.4 Erstellen von Kalibrierungskurven

Zur quantitativen Auswertung der Metabolitgehalte in Gewebeschnitten wurde zunächst für jeden Metabolit eine Kalibrierungskurve erstellt. Für die Pyruvatmessung erfolgte am gleichen Tag der Gewebemessung die Kalibrierung mit derselben Enzymlösung, für Laktat und ATP erfolgte nach Herstellung einer größeren Menge an Enzymlösung nur einmalig eine Kalibrierung. Für jeden Gewebestandard wurde in Zwei- bis Dreifachbestimmungen die mittlere Lichtintensität ermittelt und aus allen gewonnenen Werten eine Kalibrierungskurve erstellt. Dabei wurde mit Hilfe des Softwareprogramms Excel eine Anpassung mit der Box-Lucas-Funktion $y = a \cdot (1 - b^x)$ oder eine lineare Regression $y = a + b \cdot x$ vorgenommen.

2.9 Bildanalyse

2.9.1 Auswertung der Biolumineszenzdaten

Biolumineszenzbilder der Messungen von Standardschnitten wurden mit Hilfe der Software Wasabi und OriginLab ausgewertet. Dazu wurden die Lichtintensitäten im mittleren Bereich der Graustufenbilder der Biolumineszenzmessungen über die Fläche gemittelt und gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. Aus diesen Daten wurde wie oben beschrieben eine Kalibrierungskurve erstellt, anhand derer die Metabolitkonzentrationen der zu analysierenden Gewebeproben wie Xenotransplantate und Humanbiopsien berechnet wurden.

Die Biolumineszenzbilder der Gewebeschnitte wurden mit Digitalfotos von HE-gefärbten Parallelschnitten derselben Serie und den vor der Biolumineszenzmessung angefertigten Durchlichtbildern durch Optionen wie Drehen, Spiegeln oder Skalieren im Programm Photoshop topographisch überlagert. Das Ausrichten der Bilder wurde durch die zwei Stichkanäle und markante Strukturen innerhalb der Proben oder außergewöhnliche Umrisse der Schnitte erleichtert. Histologisch definierte Gewebebereiche wie Normal-, Maus- oder Tumorgewebe wurden anhand der HE- und immunhistologischer Cytokeratin-Färbung identifiziert und gekennzeichnet (Maske). Auf diese Weise entstanden so genannte „regions of interest“ (ROI), die selektiv ausgewertet werden konnten. Im Bestfall (ohne zusätzliche Fehlschnitte) erstreckte sich eine Schnittserie über den Bereich von 72 μm .

Zunächst mussten die Durchlichtbilder in ein 8bit-Format umgewandelt werden, um dort die Masken einzuzeichnen und zu markieren. Nach der Rückwandlung in das 16bit-Format konnte die markierte Maske auf das 16bit-Biolumineszenzbild gebracht werden. Alle nicht in der Maske befindlichen Areale wurden gelöscht, so dass ausschließlich aus der Region von Interesse ein 16bit-Histogramm der Graustufenverteilungen angefertigt wurde. Durch die Kalibrierungskurven konnte dann jedem Graustufenwert eine Konzentration zugeordnet werden. Um das Bild einer Metabolitverteilung optisch ansprechend darzustellen, konnten definierte Konzentrationsbereiche anhand der Kalibrierung in Falschfarben kodiert werden. Für die hier beschriebene Auswertung wurden die Softwareprogramme Photoshop CS, ImageJ, OriginLab und Excel verwendet.

2.9.2 Erstellen von L/P-Karten und Häufigkeitsverteilungen

Das Erstellen der L/P-Karten beinhaltete das genaue topographische Überlagern der jeweiligen Biolumineszenzbilder, das Markieren der ROIs, das Binarisieren der Bildinformationen und anschließend das Zuordnen von Konzentrationen zu Graustufen. Zuletzt wurde aus den so errechneten Werten der Quotient aus Laktat und Pyruvat gebildet, so dass aus dieser Information wiederum ein Bild erzeugt werden konnte.

Zunächst wurden sowohl die Durchlicht- als auch die Biolumineszenzbilder für Pyruvat und Laktat von 16bit in ein 8bit-Format umgewandelt (ImageJ). Alle weiteren Schritte erfolgten mit dem Programm Photoshop CS.

Das Durchlichtbild für Pyruvat wurde mit seinem korrespondierenden Biolumineszenzbild in Deckung gebracht und verankert. Das Foto des HE-gefärbten (für die Humanbiopsien zusätzlich Cytokeratin-gefärbten) Parallelschnittes wurde mit dem Durchlichtbild genau überlagert. Anschließend wurden das überlagerte und miteinander verankerte Durchlicht- und Biolumineszenzbild von Laktat in das Bild aufgenommen und mit HE- und Pyruvat-Durchlichtbild in Deckung gebracht. Nun wurden anhand der Durchlichtaufnahmen und des HE-Schnittes die ROIs – beispielsweise Tumor- oder Normalgewebe bei Humanbiopsien, bei Xenotransplantaten Tumor- oder Mausgewebe, z.B. Muskel oder Haut – auf jeweils neuen Ebenen farblich umrandet. Das so bearbeitete Bild wurde mit der Erhaltung aller Ebenen im tiff-Format gespeichert.

Je ein neues 8bit-Graustufenbild für jede ROI für jeweils Pyruvat bzw. Laktat wurde zur Erstellung der einzelnen auszuwertenden Areale erzeugt. Die Bildgröße wurde auf 768 x 574 Pixel und 72 dpi festgelegt, der Hintergrund wurde weiß eingestellt. Die farbigen Masken der oben beschriebenen überlagerten Bilder wurden markiert und die jeweilige Biolumineszenzebene in je ein neues Bild hinein kopiert. Dabei war unbedingt zu beachten, dass für Laktat und Pyruvat dieselben Markierungen benutzt wurden, um exakt denselben Bereich auszuwerten. Die so erzeugten Biolumineszenzbilder von definierten Arealen wurden unter der Bezeichnung der ROI als 8bit-Dateien im tiff-Format gespeichert.

Zum Binarisieren dieser Bilder – und damit zum späteren Anzeigen des auszuwertenden Bereichs in der Tabellenkalkulation – wurde erneut für jedes so generierte Bild ein neues Bild erstellt, und zwar in der Größe 256 x 256 Pixel und 72 dpi mit weißem Hintergrund in 8bit-Graustufen. Diese Pixelgröße spiegelte später jeweils eine Zelle in der Tabellenkalkulation wider. Aus den letzten Bildern wurden die Objekte mit Hilfe des „Zauberstabes“ markiert und in das jeweils neue Bild hinein kopiert. Der gesamte Bereich, der die Biolumineszenz enthält, wurde auf weiß eingestellt, der umliegende Bereich auf schwarz, so dass ein solches Bild ausschließlich aus weißen (RGB 255/255/255) und schwarzen (RGB 0/0/0) Bildpunkten bestand. Die so anfertigten Bilder wurden im tiff-Format gespeichert.

Mit dem Programm ImageJ wurden diese Bilder in eine Textdatei umgewandelt und diese in der Tabellenkalkulation geöffnet. In einer speziell angefertigten Formatvorlage wurden die Daten der binarisierten Bilder von Laktat und Pyruvat und die gleich großen korrespondierenden Graustufenbilder der Biolumineszenz der auszuwertenden Areale zusammengeführt. In die Vorlage wurden Informationen der ursprünglichen Bilder, wie zum Beispiel 16bit-Maximum, und Daten der Kalibrierung eingefügt. Damit wurde für jedes Pixel eines Bildes die entsprechende Konzentration berechnet.

Um den L/P-Quotienten zu erhalten, dividierte man die Werte der jeweiligen Tabellenblätter, so dass sich für jedes Pixel des Bildes ein Verhältnis ergab. Aus diesen Zahleninformationen in Form eines Textformats, die die Information über L/P-Verhältnis und dessen Verteilung im Schnitt enthielten, konnte wiederum ein Bild erzeugt werden, welches diese Informationen optisch besser darstellt.

2.10 Referenzmethoden

Die Methode der Pyruvatbestimmung durch die bildgebende Biolumineszenztechnik wurde durch mehrere unabhängige Referenzverfahren, die nicht auf der Basis der Biolumineszenztechnik beruhen, validiert. Es kamen drei photometrische und eine chromatographische Methode zum Einsatz.

2.10.1 Herstellen von Gewebeextrakten

Für die Bestimmung von Pyruvat mit Hilfe der Referenzmethoden wurden saure Extrakte hergestellt. Die Zugabe von Perchlorsäure zu Zellen oder Gewebeproben führt zur Fällung von Proteinen. Diese können abzentrifugiert und so aus der Probe entfernt werden.

Extrakte von Leberhomogenaten wurden wie folgt angefertigt: je 1 g Homogenat (siehe Abschnitt 2.8.3.2) wurde mit 0,2 ml 5 % Perchlorsäure versetzt und nach sehr guter Durchmischung für 30 Minuten auf Eis aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben bei 18390 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden zuletzt über Filtereinheiten (0,45 µm) zentrifugiert und bis zur Messung bei -20 °C aufbewahrt. Eine Neutralisation war nicht erforderlich, da das eingesetzte Probenvolumen im Vergleich zum Messvolumen sehr gering war.

2.10.2 PDH-Test am Photometer/Microplate Reader

Der PDH-Test entspricht der Basisreaktion der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzreaktion, die im Abschnitt 2.5.1 (siehe hierzu auch Abbildung 3-1) beschrieben ist.

Der Ansatz bestand aus folgenden Komponenten: 0,25 M MOPS-Cl (pH 7,4) bzw. 0,1 M Tris (pH 8,6), 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 2 mM TPP, 0,25 mM CoA, 6 mM NAD⁺ und 3 mM L-Cystein. Messungen saurer Extrakte in 5 % Perchlorsäure fanden in einem mit 0,25 M MOPS-Cl (pH 7,4) gepuffertem System statt, solche in 10 % Säure in 0,1 M Tris (pH 8,6).

Für die Messung im Photometer wurde ein Gesamtvolumen von 250 µl eingesetzt, das aus 233,34 µl des Reaktionsansatzes und 16,66 µl Pyruvatlösung bestand.

Für die Messung im Microplate Reader wurden je 75 µl des Ansatzes mit 10 µl Standard bzw. Probe in einem Well einer 96-Well-Platte gemischt und anschließend die Extinktion bei 340 nm bestimmt. Mit der Zugabe von 20 µl einer 0,6 U/ml konzentrierten PDH-Lösung in

50 mM MOPS-Cl (pH 7,4) wurden die Reaktion und die Registrierung der Messzeit gestartet. Nach 3sekündigem Schütteln der Platte wurde alle 5 Minuten die Extinktion bei 340 nm gemessen, bis zwischen zwei Messungen keine weitere Extinktionsänderung zu beobachten war. Sowohl für die Standards als auch für die Proben erfolgten Dreifachbestimmungen. Aus diesen Endpunktwerten und den Werten vor Zugabe des Enzyms wurde die Differenz gebildet (siehe Abbildung 3-3). Aus den Messungen der Standards konnte auf diese Weise eine Kalibrierung für die unbekanntenen Proben erstellt werden.

2.10.3 LDH-Test am Microplate Reader

Der LDH-Test basiert auf der Umwandlung von Pyruvat zu Laktat durch die Laktatdehydrogenase (LDH) (siehe Abbildung 2-9). Dabei wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert, was zu einer Extinktionsabnahme bei 340 nm führt.

Das Reaktionsgemisch setzte sich zusammen aus 0,1 M Triethanolamin (pH 7,6), 4 mM MgCl_2 , 30 mM KCl und 0,3 mM NADH. Je 75 μl der Lösung und 10 μl Probe bzw. Standard wurden in einem Well einer 96-Well-Platte gemischt, woran sich eine Extinktionsbestimmung bei 340 nm anschloss. Die Reaktion wurde mit 20 μl einer 10 U/ml konzentrierten LDH-Lösung in 0,1 M Triethanolamin (pH 7,6) gestartet und die Extinktionsabnahme in Abständen von 5 Minuten registriert. Wenn keine weitere Änderung zu erkennen war, konnte die Differenz aus den Werten vor Zugabe des Enzyms und den Endpunktwerten errechnet werden. Aus den Standards wurde eine Kalibrierung für die unbekanntenen Proben erstellt. Auch hier wurden für Standards und Proben mindestens Dreifachbestimmungen vorgenommen.

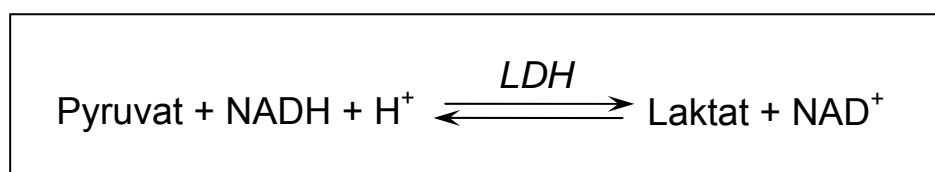


Abbildung 2-9: Schema der Laktatdehydrogenase-katalysierten Reaktion.

Die Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert die reversible Umwandlung von Pyruvat in Laktat mit dem Cosubstrat $\text{NADH} + \text{H}^+$ bzw. NAD^+ .

2.10.4 Kolorimetrischer Test am Microplate Reader

Der hier verwendete kolorimetrische Test ist eine Modifikation des in Anthon und Barrett (2003) beschriebenen Nachweises von Pyruvat in Zwiebeln. Die Reaktion basiert auf der chemischen Reaktion von Pyruvat mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) in das entsprechende Hydrazon. Durch Erhöhung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich färbt sich die Lösung je nach anfänglicher Pyruvatkonzentration gelb bis braun. Die Determinierung von

Ketosäuren mit Nitrophenylhydrazinen geht auf die Methode von Friedemann und Haugen (1943) zurück.

Je Well einer 96-Well-Platte wurden 20 µl Standard bzw. Probe und 20 µl DNPH-Lösung (0,01 g/50 ml 1 M HCl) gemischt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach erneutem Schütteln der Platte für 3 Sekunden im Microplate Reader erfolgte die Zugabe von 75 µl 0,7 M NaOH. Die Messung bei 405 nm wurde direkt danach vorgenommen, da der Farbkomplex nicht stabil ist.

2.10.5 HPLC

Zur Detektion von Pyruvat mittels HPLC diente eine so genannte „Organic Acid Resin“-Säule (Anionenaustauscher) von 300 x 8 mm. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter isokratischen Bedingungen mit 5 mM H₂SO₄ bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min. Das Elutionsmittel wurde vor der Verwendung durch 0,45 µm feine Poren filtriert.

50 µl proteinfreier filtrierter Extrakt bzw. Pyruvatstandard in 5 % Perchlosäure wurden in das HPLC-System injiziert. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 210 nm. Für Standards genügte eine Elutionszeit von 20 Minuten, Gewebeproben wurden 45 Minuten eluiert. Die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe des Programms ValueChrom. Diese Software zeichnet während einer Analyse fortwährend die eintretenden Absorptionsänderungen als Funktion der Zeit auf. So entstandene Graphen haben für bestimmte Substanzen einen typischen Kurvenverlauf, der im Idealfall einer Gaußverteilung ähnelt. Die Konzentration der zu messenden Substanz ist dabei dem Integral einer solchen Kurve proportional. Die ermittelten Flächen unter den Kurven von Standards und Proben wurden als Textdatei in das Programm Excel übertragen. Danach erfolgte die Erstellung von Kalibrierungskurven und daraus die Berechnung der Pyruvatkonzentration in unbekanntem Proben.

Die in den entsprechenden Abbildungen angegebenen Konzentrationen der Referenzmethoden beziehen sich in allen Fällen auf die Konzentration der eingesetzten Messlösung.

3 Ergebnisse

Die Etablierung einer neuen Methode zur quantitativen Bestimmung von Pyruvat und dessen räumlicher Verteilung in schockgefrorenen Gewebeschnitten gliederte sich in folgende Stufen: Zunächst wurde der Ansatz der PDH-katalysierten Basisreaktion (siehe Abbildung 3-1, grau unterlegter Kasten) für die spätere Pyruvat-abhängige Biolumineszenzreaktion etabliert und optimiert. Hierfür wurde die Stabilität von Pyruvat bezüglich Hitze und Ultraschallbehandlung analysiert. Anschließend wurde die Basisreaktion mit der Licht erzeugenden Reaktion (siehe Abbildung 3-1, gestrichelter Kasten) gekoppelt und optimiert. Danach erfolgten Kalibrierungen an gefriergetrockneten Standardschnitten. Die Pyruvatbestimmung via Biolumineszenz wurde mit verschiedenen unabhängigen Methoden wie HPLC und unterschiedlichen photometrischen Tests auf ihre Richtigkeit überprüft.

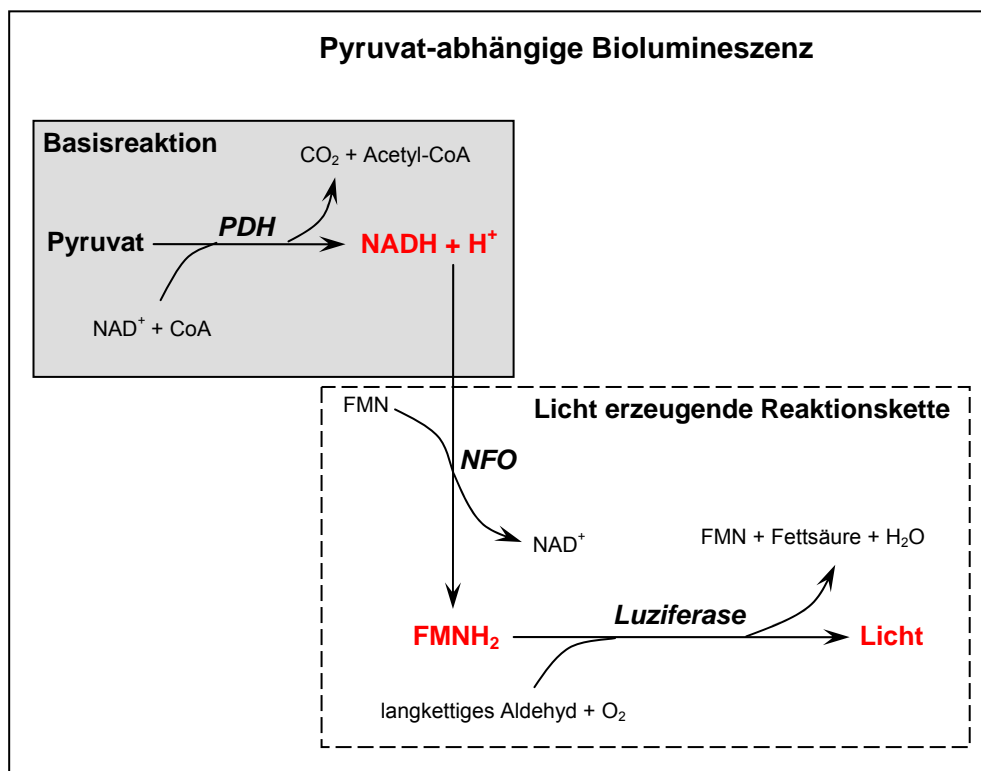


Abbildung 3-1: Pyruvat-abhängige Biolumineszenz.

Grau unterlegt ist die PDH-katalysierte Basisreaktion, bei der Pyruvat als Ausgangssubstrat durch die Pyruvatdehydrogenase (PDH) umgesetzt wird. Das bei dieser Reaktion entstehende NADH+H⁺ geht als Substrat in die durch die NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase (NFO) katalysierte Reaktion ein, bei der FMNH₂ entsteht. Im nachfolgenden Schritt wird dieses unter Aussendung von Licht durch die bakterielle Luziferase oxidiert.

Die so etablierte Methode wurde auf Schnitten von kryofixiertem Gewebe wie Experimentaltumoren und Humanbiopsien angewendet. Die räumliche Verteilung von Pyruvat innerhalb

eines Kryoschnittes lässt sich anhand von Falschfarben visualisieren, wobei jede Farbe einem definierten Gehaltsbereich zugeordnet ist. Die Auswertung innerhalb histologisch definierter Gewebeareale (im Weiteren verkürzt strukturassoziierte Auswertung genannt) wurde durch parallele HE- und Cytokeratin-gefärbte Schnitte ermöglicht. Zusätzlich wurde in diesen Geweben neben Pyruvat der Gehalt der Metabolite ATP und Laktat mit bereits bestehenden Biolumineszenztechniken bestimmt (Mueller-Klieser und Walenta, 1993).

Der letzte Teil der Ergebnisse zeigt die Kombination der neu etablierten Pyruvatbiolumineszenz mit der bereits bestehenden Laktatbiolumineszenz. Die digitalen Bilder von parallelen Schnitten für Laktat- und Pyruvatmessungen via Biolumineszenz und HE-Färbungen wurden präzise überlagert. Daraus resultierten die so genannten L/P-Karten, welche die regionale Verteilung der L/P-Verhältnisse in Geweben anschaulich machen.

3.1 Entwicklung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz

3.1.1 Optimierung der Basisreaktion am Photometer und Microplate Reader

Für erste Tests der Basisreaktion für die Pyruvat-abhängige Biolumineszenz wurde zunächst die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO_2 (siehe Abbildung 3-1) durch die Pyruvatdehydrogenase (PDH) anhand des Protokolls der Firma Sigma zur Testung des Enzyms durchgeführt. Das dabei entstehende NADH wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt. Abbildung 3-2 zeigt die Kinetik dieses ersten Ansatzes über einen Zeitraum von 20 Minuten. Dabei wurde alle 6 Sekunden ein Messpunkt genommen. Der lineare Bereich der Reaktion lag innerhalb der ersten 2 Minuten. Nach ca. 7 Minuten wies der Reaktionsverlauf eine Plateaubildung auf. Diese lässt sich durch den Verbrauch der Substrate und die Einstellung des Gleichgewichts erklären.

Der hier gezeigte Testansatz fungierte als Basis zur weiteren Optimierung der PDH-Reaktion. Er wird im Folgenden mit *Test A* gekennzeichnet. Ein Wellenlängenscan der Einzelkomponenten des Tests zeigte, dass alle Absorptionsmaxima unter 300 nm lagen und damit auch in höheren Konzentrationen nicht mit NADH bei 340 nm interferierten.

Am Photometer wurden diverse Änderungen des Reaktionsansatzes *Test A* bezüglich der Konzentrationen seiner Komponenten vorgenommen und die Kinetikverläufe, Extinktionen und Extinktionsänderungen pro Minute miteinander verglichen.

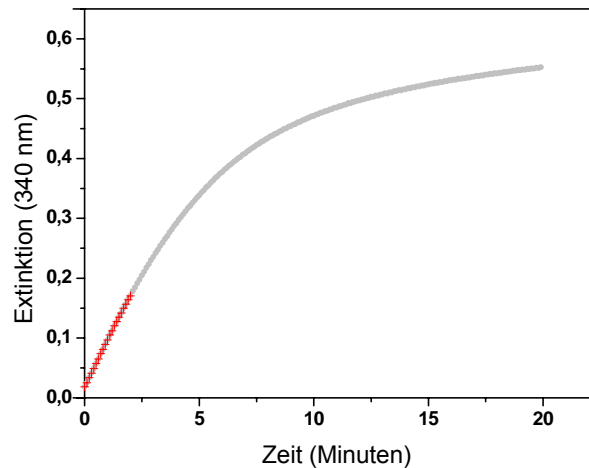


Abbildung 3-2: Testkinetik zur Überprüfung der PDH-Reaktion laut Protokoll der Firma Sigma.

Über einen Zeitraum von 20 Minuten wurde die Extinktionsänderung durch den Umsatz von Pyruvat (5 mM) und die Entstehung von NADH bei 340 nm photometrisch verfolgt. Der lineare Messbereich (rot) dieser Reaktion (*Test A*) liegt im Bereich der ersten zwei Minuten mit einer Extinktionsänderung von 0,08 (dE/min).

Da im Photometer jeweils nur eine Probe gemessen werden konnte, wurden einige Kombinationen der photometrischen Ansätze noch einmal im Microplate Reader mit Standardreihen von 0–2 mM Pyruvat gemessen. Dabei wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten alle 5 Minuten die Extinktion registriert. ΔE_{340} wurde mit Hilfe der Endpunkt-Methodik bestimmt. ΔE_{340} ergibt sich aus der Differenz der Extinktion 30 Minuten nach Start der Reaktion und vor Zugabe des Enzyms mit PDH. Abbildung 3-3 zeigt eine entsprechende Darstellung.

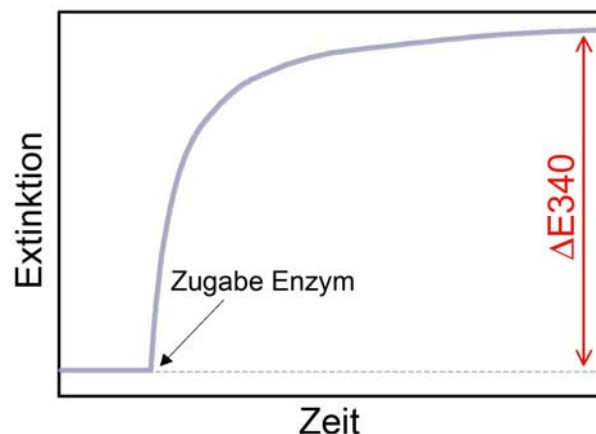


Abbildung 3-3: Theoretischer Reaktionsverlauf eines PDH-Tests und Bestimmung von ΔE_{340} mit Hilfe der Endpunkt-Methodik.

Dargestellt ist ein theoretischer Reaktionsverlauf eines PDH-Tests mit der Extinktion als Funktion der Zeit und der Annahme, dass das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der Produkte liegt und Cosubstrate deutlich höher konzentriert sind als das zu bestimmende Substrat. ΔE_{340} ergibt sich dabei aus der Differenz der Extinktion 30 Minuten nach dem Start der Reaktion mit dem Enzym PDH und vor Zugabe des Enzyms.

Abbildung 3-4 zeigt im Microplate Reader gemessene Standardreihen (Mittelwerte \pm SD aus Dreifachbestimmungen) mit verschiedenen Testansätzen. Genaue Angaben zur Zusammensetzung der Ansätze sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Die Berechnung von ΔE_{340} erfolgte wie in Abbildung 3-3 angegeben. Nach maximal 30 Minuten zeigten sich bei keinem der dargestellten Tests weitere Extinktionsänderungen.

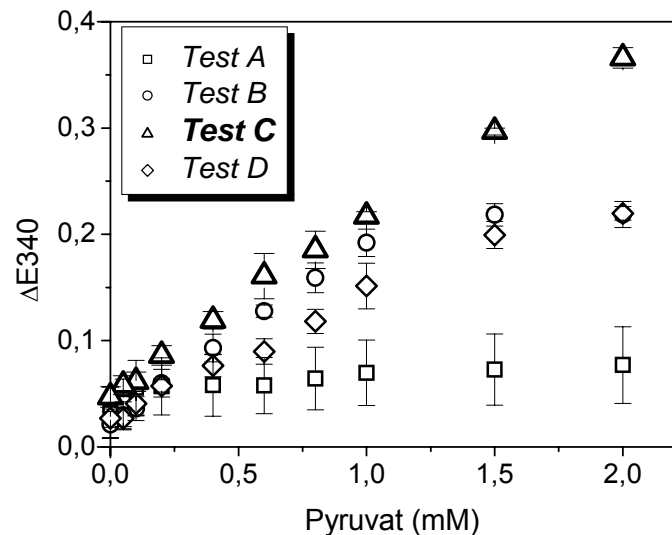


Abbildung 3-4: Standardreihen verschiedener Testansätze der PDH-Reaktion.

Gezeigt sind Standardkurven von Variationen der PDH-abhängigen Basisreaktion. *Test A* entspricht dem Testprotokoll für die PDH der Firma Sigma. *Test B* beinhaltet höhere Konzentrationen von $MgCl_2$, $CaCl_2$ und PDH. *Test C* enthält zusätzlich die doppelte Menge CoA und NAD^+ , *Test D* enthält das Enzym Carnitin-Acetyltransferase (CAT) zur Regenerierung von CoA . Die genauen Konzentrationsangaben der Ansätze finden sich in Tabelle 3-1. Standards wurden in PBS angesetzt. Gezeigt sind Mittelwert \pm SD ($n = 3$) für alle Messpunkte.

Test A entspricht der Testprozedur der Firma Sigma für das Enzym PDH. Der Ansatz weist im Vergleich zu allen anderen Tests die geringsten Extinktionsänderungen auf. Außerdem zeigt er keinen linearen Verlauf, was darauf hinweist, dass entweder Substrate der Reaktion limitierende Faktoren darstellen oder das Maximum der Enzymaktivität erreicht wird. *Test B* beinhaltet höhere Konzentrationen von $MgCl_2$, $CaCl_2$ und PDH. Hier sind insgesamt höhere Extinktionsänderungen zu sehen, ab 1,5 mM Pyruvat geht aber auch hier die Reaktion in ein Plateau über. Verglichen mit *Test A* beinhaltet *Test C* höhere Mengen aller Komponenten. Es zeigt sich eine lineare Abhängigkeit von ΔE_{340} und der Pyruvatkonzentration bis 2 mM. Da die PDH auch durch ihre Produkte gehemmt wird, wurde mit *Test D* versucht, das bei der Reaktion entstehende Acetyl-CoA mit Hilfe der Carnitin-Acetyltransferase (CAT) wieder in CoA umzuwandeln. Die Regenerierungsreaktion wurde allein im Photometer getestet und optimiert. Das Enzym CAT und sein Substrat D,L-Carnitin wurden in den als optimal geteste-

ten Konzentrationen dem PDH-Ansatz zugefügt (Abbildung 3-4, *Test D*). Es zeigte sich jedoch keine positive Wirkung auf die Reaktion. Die Extinktionen waren insgesamt sogar niedriger als bei *Test C* ohne CAT.

Tabelle 3-1: Reaktionsansätze für verschiedene PDH-Reaktionen.

	<i>Test A</i>	<i>Test B</i>	<i>Test C</i>	<i>Test D</i>
	Endkonzentration im Testansatz (Angaben in mM bzw. U/ml)			
MOPS-Cl (pH 7,4)	50	50	50	50
MgCl₂	0,2	10	5	5
CaCl₂	0,01	1	1	1
TPP	0,3	0,3	1	2
CoA	0,12	0,12	0,25	0,5
NAD⁺	2	2	4	6
L-Cystein (pH 7,4)	2,64	2,6	3	3
PDH	0,01	0,05	0,12	0,12
D,L-Carnitin	-	-	-	15
CAT	-	-	-	2

Da die Extinktionsänderungen von *Test C* am größten waren und die Standardkurve einen linearen Verlauf mit $R = 0,99929$ und $p < 0,0001$ zeigte, wurde dieser Test als Basisreaktion für die Pyruvat-abhängige Biolumineszenzreaktion ausgewählt.

3.1.2 Reproduzierbarkeit der Basisreaktion

Die Basisreaktion wies eine sehr gute Reproduzierbarkeit auf. Die Analyse erfolgte anhand unabhängiger Versuche an verschiedenen Tagen unter gleichen Versuchsbedingungen. *Test C* wurde an jedem Versuchstag frisch angesetzt. Pyruvatstandards von 0-2 mM lagen in PBS (pH 7,4) vor. In Dreifachbestimmungen wurde die Extinktion der Standards vor und 30 Minuten nach Zugabe der PDH bestimmt. Abbildung 3-5 zeigt die Extinktionsänderungen bei 340 nm in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration. Die Reaktion verläuft im Bereich von 0-2 mM Pyruvat linear mit $R = 0,99938$ und $p < 0,0001$. Aufgrund der sehr guten Reproduzierbarkeit der ausgewählten PDH-Reaktion (*Test C*) erfolgte nun die Kombination dieser Basisreaktion mit der Licht produzierenden Biolumineszenzreaktion.

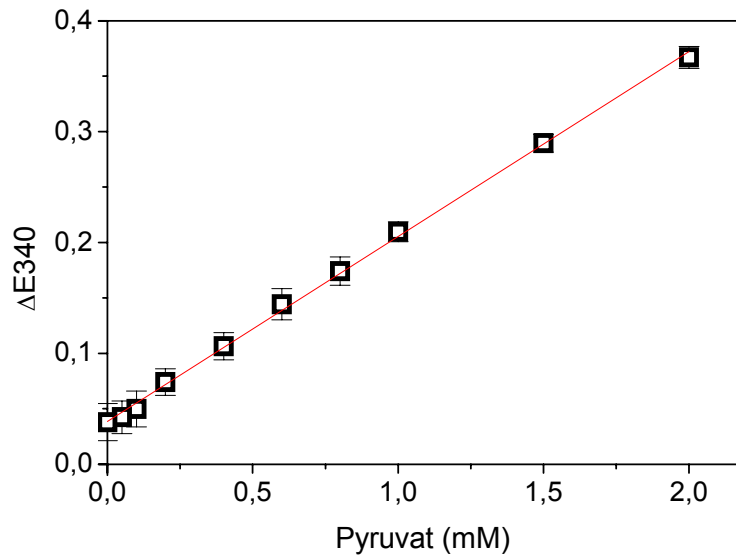


Abbildung 3-5: Reproduzierbarkeit der PDH-Reaktion.

Gezeigt ist ΔE_{340} als Funktion der Pyruvatkonzentration. Unabhängige Versuche des *Tests C* an vier verschiedenen Tagen mit jeweils Dreifachbestimmungen (Mittelwert \pm SD) je Konzentration. Standards von 0–2 mM Pyruvat wurden in PBS (pH 7,4) angesetzt. Eine lineare Anpassung ergab $y = 0,039 + 0,167 * x$ mit $R = 0,99938$ und $p < 0,0001$.

3.2 Stabilität von Pyruvat

Für die Biolumineszenzmessungen müssen Gefrierschnitte von Gewebeproben zur Inaktivierung von endogenen Enzymen für 10 Minuten bei 100 °C behandelt werden, damit bei der Messung gewebeeigene Enzyme nicht mit solchen in der Messlösung interferieren und der zu bestimmende Metabolit nicht weiter verstoffwechselt werden kann. Die Herstellung von Gewebeextrakten für Referenzmessungen beinhaltet daher zusätzliches Sonifizieren der Proben. Somit wurde die Stabilität von Pyruvat hinsichtlich Erhitzen und Ultraschallbehandlung untersucht. Mithilfe des LDH-abhängigen photometrischen Tests wurden sowohl mit Hitze behandelte und sonifizierte, als auch nicht behandelte wässrige Pyruvatlösungen miteinander verglichen. Abbildung 3-6 zeigt, dass weder die Behandlung mit Hitze, noch die mit Ultraschall einen abbauenden Effekt auf Pyruvat haben.

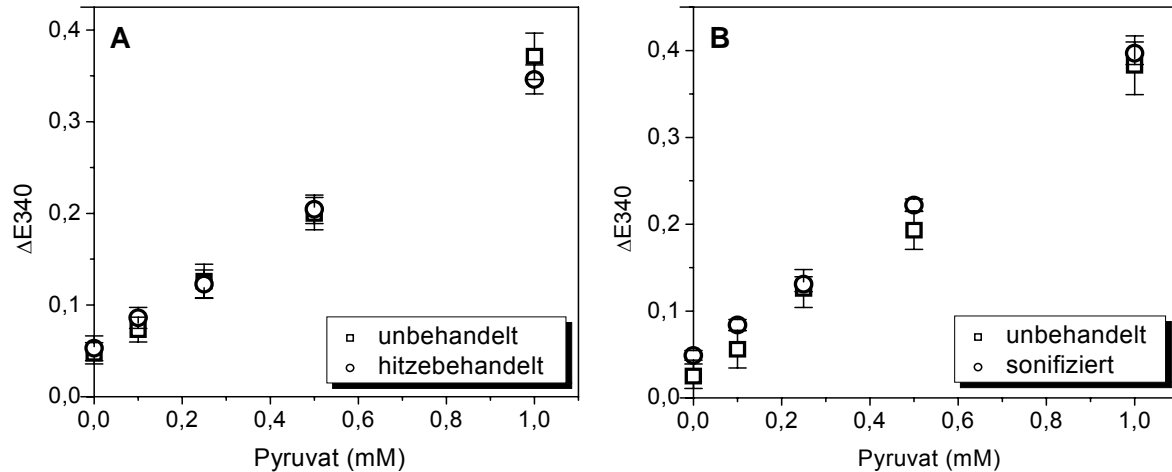


Abbildung 3-6: Stabilität von Pyruvat.

Gezeigt ist die Extinktionsänderung (ΔE_{340}) als Funktion der Pyruvatkonzentration. (A) Hitze- bzw. (B) Ultraschall-behandelte Pyruvatlösungen wurden mit Hilfe des LDH-abhängigen Tests auf ihre Stabilität überprüft. (A) Mittelwerte \pm SD aus Sechsfach- bzw. (B) Dreifachbestimmungen unbehandelter und behandelter Lösungen.

3.3 Kombination der Basisreaktion mit der Biolumineszenzreaktion

Zunächst erfolgte die Kombination der Basisreaktion und der Licht produzierenden Biolumineszenzreaktion. Dazu wurden die entsprechenden Reaktionsansätze zu gleichen Teilen gemischt. Die Zusammensetzung der Lichtreaktion laut Protokoll der Firma Roche für diesen ersten Versuch war wie folgt: 0,5 mM FMN, 10 mM Decanal (in Methanol), 50 mU/ml NFO und 7,5 mU/ml Luziferase. Die Ansätze für Basisreaktion und Licht erzeugende Reaktionskette wurden dabei doppelt konzentriert eingesetzt, zu gleichen Teilen gemischt und eine definierte Menge Pyruvatlösung zugesetzt. Anschließend erfolgte die Messung in der Reaktionsmulde der Biolumineszenzapparatur unter Registrierung der entstehenden Photonen in Echtzeit.

Da bei diesem Versuch bereits eine geringe Bildung von Licht zu erkennen war, wurden Standardschnitte in Einbettmedium hergestellt und an diesen die Pyruvat-abhängige Biolumineszenzreaktion weiter entwickelt. Wie bei der PDH-Basisreaktion fanden auch hier verschiedene Tests mit unterschiedlichen Enzym- und Reagenzienkonzentrationen statt. Als erstes wurde jeweils eine Kinetik des Reaktionsverlaufs für 3-5 Minuten aufgenommen, um die Lichtemission zu verfolgen und die Inkubations- und Messzeiten festzulegen.

Die Schnittdicke der Standards für Pyruvat in Einbettmedium betrug anfangs 16 μm . Da die Lichtintensitäten hier nur sehr geringe Werte ($< 1,6$ relative Lichteinheiten bei einem Pyruvatschnitt mit 2,2 $\mu\text{mol/g}$) aufwiesen, wurde die Schnittdicke auf 20 μm erhöht.

In Abbildung 3-7 sind Intensitätswerte der kombinierten Biolumineszenzreaktion bei unterschiedlichen NFO-Konzentrationen anhand eines 2,2 $\mu\text{mol/g}$ Standardschnittes mit 20 μm Schnittdicke aufgeführt. Die Luziferase-Konzentration wurde im Vergleich zum ersten Ansatz auf 15 U/ml erhöht. Die genaue Zusammensetzung dieses Ansatzes ist in Tabelle A1 im Anhang aufgeführt. Die Registrierung der Photonen fand nach einer Inkubationszeit von 8 Sekunden über einen Zeitraum von 1:25 Minuten statt. Eine Konzentration von mehr als 4 U/ml NFO im Reaktionsansatz führte zu keiner signifikant höheren Lichtemission.

Im Folgenden wurde die Biolumineszenzreaktion an Standardschnitten verschiedener Pyruvatkonzentrationen in Mehrfachbestimmungen getestet.

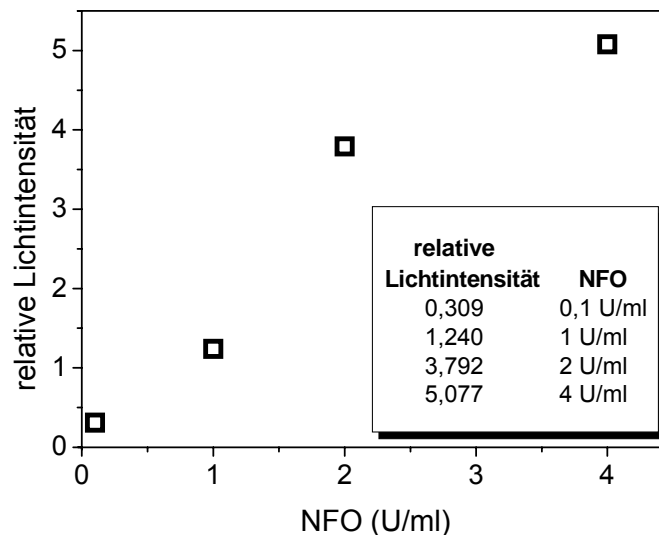


Abbildung 3-7: Relative Lichtintensitäten in Abhängigkeit von der NFO-Konzentration.

Verschiedene Reaktionsansätze der Pyruvat-induzierten Biolumineszenz unter Verwendung von vier Standardschnitten (20 μm) mit jeweils identischem Pyruvatgehalt von 2,2 $\mu\text{mol/g}$. Einzig die NFO-Konzentration wurde in den Ansätzen variiert. Im Kasten rechts unten sind die entsprechenden relativen Lichtintensitäten im Vergleich zur eingesetzten NFO-Konzentration aufgeführt.

3.4 Kalibrierung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz an Kryostatschnitten

Die erste Kalibrierung erfolgte an Pyruvatschnitten von 20 μm Dicke. Für den Ansatz der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz wurde der doppelt konzentrierte Ansatz der Basisreaktion und der der doppelt konzentrierten Licht produzierenden Reaktionslösungen zu gleichen Teilen gemischt. Die daraus resultierenden Endkonzentrationen bei der Messung sind in Tabelle 3-2 aufgeführt. Die Registrierung der Photonen fand nach einer Inkubationszeit von 8 Sekunden für einen Zeitraum von 1:10 Minuten statt. Abbildung 3-8 zeigt in (B) einen Ver-

lauf dieser Reaktion für einen 2 $\mu\text{mol/g}$ Standardschnitt. In (A) ist die Lichtintensität in Abhängigkeit von der eingesetzten Standardkonzentration dargestellt.

Der kinetische Verlauf der Reaktion über einen Zeitraum von 3 Minuten ist ebenfalls in Abbildung 3-8 (B) gezeigt. Der Start der Reaktion nach 8 Sekunden Inkubationszeit ist mit einem blauen Strich markiert, das Ende der Integrationszeit mit einem roten. Das Maximum der Reaktion lag innerhalb der gewählten Messzeit. Alle Standards wurden in Dreifachbestimmungen gemessen; gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD der Pyruvatstandardschnitte. Die Standardabweichungen der Mehrfachbestimmungen eines Standards waren insgesamt sehr gering. Die maximale Lichtintensität bei 2 $\mu\text{mol/g}$ betrug bei dieser Messung 6,33 relative Einheiten.

Tabelle 3-2: Zusammensetzung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzreaktionslösungen zu Abbildung 3-8.

Doppelt konzentrierte Basis- und Lichtreaktionslösungen wurden zu gleichen Teilen gemischt. Es sind die daraus resultierenden Endkonzentrationen angegeben.

	Konzentration im Test (mM bzw. mU/ml)	Konzentration und Ansatz der Stammlösungen*
MOPS-Cl (pH 7,4)	50	0,5 M
MgCl₂	5	1 M
CaCl₂	1	0,25 M
TPP	1	20 mM
CoA	0,25	10 mM
NAD⁺	4	0,2 M
L-Cystein (pH 7,4)	3	0,1 M
DCA	5	0,5 M
PDH	120	1,2 U/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)
FMN	0,5	10,5 mM
Decanal	10	1 M in 96 % Ethanol
NFO	3000	20 U/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)
Luziferase	15	60 mU/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)

*Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reagenzien in Aqua dest. gelöst.

Die BoxLucas1Mod-Funktion (OriginLab) wurde an die Messwerte der Standardreihe angepasst, wobei sich eine sehr gute Korrelation auf hohem Signifikanzniveau zwischen der eingesetzten Pyruvatmenge und daraus resultierender Lichtintensität ergab. Dies war eine entscheidende Voraussetzung für die Konzentrationsbestimmung unbekannter Proben.

Um noch mehr Photonen zu erfassen und damit die Lichtintensitäten insgesamt zu erhöhen, hätte die Messzeit um 30 Sekunden oder mehr verlängert werden können.

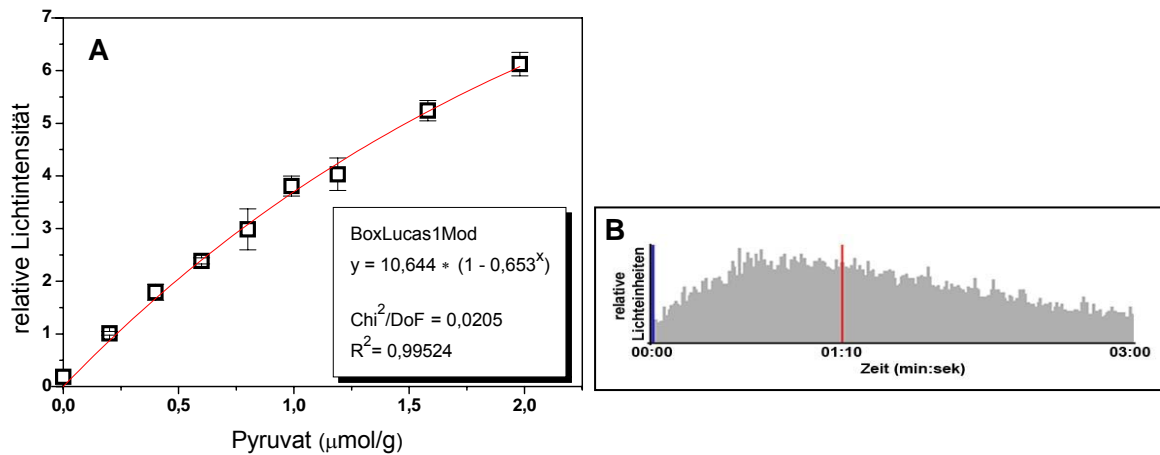


Abbildung 3-8: Standardkurve und Kinetikverlauf der Biolumineszenzreaktion für Pyruvatstandardschnitte.

(A) Standardkurve (Mittelwerte \pm SD von $n = 3$) von Pyruvatschnitten mit 20 μm Dicke, die mit dem in Tabelle 3-2 angegebenen Reaktionsansatz gemessen wurden. (B) Die zugehörige Kinetik über 3 Minuten wurde an einem 2 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvatstandardschnitt vorgenommen. Die Inkubationszeit betrug 8 Sekunden. Der Start der Photonenregistrierung ist mit einem blauen Strich markiert. Der rote Strich gibt die Integrationszeit der Standards an.

Im folgenden Versuch wurde die Messzeit verlängert und weitere Modifikationen am Reaktionsansatz vorgenommen, um die Lichtintensitäten insgesamt zu erhöhen. Abbildung 3-9 (B) zeigt den Kinetikverlauf der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzreaktion über 5 Minuten für einen 2 $\mu\text{mol/g}$ Standardschnitt. Der Ansatz ist im Anhang (siehe Tabelle A2) beschrieben. Er enthielt im Vergleich zu dem in Tabelle 3-2 angegebenen Ansatz die doppelte Menge TPP und 0,7 mM FMN. Die NFO lag mit gleicher Aktivität, aber in einem anderen Puffer vor. Hier wurde im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen nicht mehr mit separaten Basisreaktionslösungen und Licht produzierenden Reaktionslösungen gearbeitet; vielmehr wurden alle Komponenten von Beginn an zusammen pipettiert. Im Vergleich zu Abbildung 3-8 wurde hier besonders durch die längere Integrationszeit von 2:15 Minuten insgesamt eine höhere Lichtausbeute erzielt. Das Maximum lag für einen Standardschnitt von 2 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat bei 41,39 relativen Lichteinheiten. Eine lineare Regressionsberechnung, beruhend auf Einfach- oder Mehrfachbestimmungen der Standards, ergab auch hier eine hoch signifikante Korrelation zwischen Pyruvatkonzentration und emittiertem Licht ($R = 0,98915$ und $p < 0,0001$) (siehe Abbildung 3-9 (A)).

Im Folgenden wurde bei der Aufnahme der Kinetik eines jeweiligen Ansatzes darauf geachtet, dass der komplette Anstieg bis zum Erreichen der maximalen Lichtemission und ein etwa gleich langer Bereich nach dem Maximum als Integrationszeit verwendet wurden (siehe Abbildung 3-9).

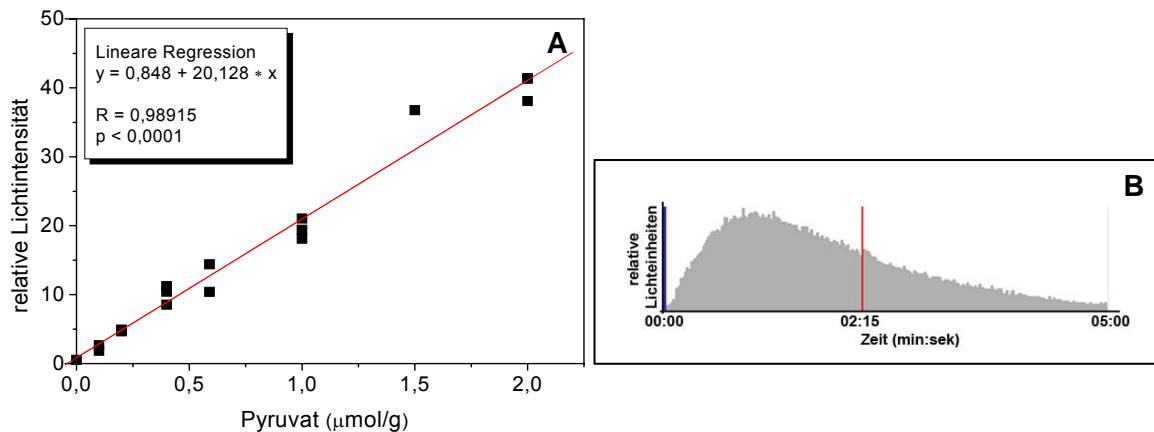


Abbildung 3-9: Standardkurve und Kinetikverlauf der in Tabelle A2 angegebenen Biolumineszenzreaktion.

(A) Standardkurve an Pyruvatschnitten (20 µm) mit dem in Tabelle A2 (siehe Anhang) angegebenen Reaktionsansatz. Die Messzeit, die für jeden Schnitt gleich gehalten wurde, ist in (B) durch den blauen und roten Strich gekennzeichnet. Es erfolgten Einfach- oder Mehrfachbestimmungen. (B) Die zugehörige Reaktionskinetik wurde über 5 Minuten an einem 2 µmol/g Standard (20 µm) vorgenommen. Der Beginn der Photonenregistrierung nach 12 Sekunden Inkubationszeit ist mit einer blauen Linie markiert. Die rote gibt die Integrationszeit (2:15 Minuten) für die Standards in (A) an.

Die hier gewählte Verwendung von initial bereits kompletten Enzymgemischen führte nach einiger Zeit zu einer Trübung des Reaktionsansatzes, die allerdings keine Auswirkung auf die Qualität hatte. Die Werte der Lichtintensitäten von Mehrfachbestimmungen eines Standards direkt nach Ansatz der Reaktionslösung oder bis zu vier Stunden später unterschieden sich nicht mehr als sonst. Aus diesem Grund wurde diese Art des Ansatzes der Reaktionslösungen beibehalten.

Abbildung 3-10 zeigt zum Vergleich an verschiedenen Tagen registrierte Intensitätswerte dreier gleichartiger Versuchsansätze der Biolumineszenzreaktion. Die Ansätze wurden am entsprechenden Messtag frisch angesetzt. Sie unterschieden sich nicht in der Zusammensetzung (siehe Tabelle A3), lediglich die Integrationszeiten variierten zwischen 1:30 Minuten und 2:00 Minuten. Die Inkubationszeit betrug bei allen Messungen 10 Sekunden. Es wurde dieselbe Charge Pyruvatstandard verwendet. Im Vergleich zu dem letzten gezeigten Ansatz (Abbildung 3-9) wurden in diesem 140 mU/ml PDH statt 120 mU/ml eingesetzt.

Die Mittelwerte \pm SD aller Messpunkte ergab auch hier einen hoch signifikanten Zusammenhang zwischen Pyruvatkonzentration und Lichtintensität. Im Vergleich zur vorherigen Reaktion (siehe Abbildung 3-9) waren die Lichtintensitäten höher. Die maximale Lichtintensität eines 2 µmol/g Pyruvatstandards betrug hier 78,97 relative Lichteinheiten. Allerdings ergaben die unabhängigen Messungen im Mittel eine Schwankung der Lichtintensität um den Faktor $1,4 \pm 0,3$ bei einer vorgegebenen Konzentration. Im Extremfall, wie z.B. hier bei den Stan-

dards mit einer Pyruvatkonzentration von 0,25 $\mu\text{mol/g}$, lag ein Unterschied um den Faktor 2 der gemessenen Lichtintensität vor. Bezogen auf Absolutwerte von Konzentrationen ist dies keine große Schwankung; prozentual gesehen, zeigt dies jedoch einen erheblichen Unterschied zwischen verschiedenen Versuchsansätzen. Die Schwankungen innerhalb einer Konzentration waren nicht auf die Variationen der Integrationszeit zurückzuführen. Ansatz 3, der die längste Messzeit hatte, ergab in allen Konzentrationen verglichen mit den Ansätzen 1 und 2 insgesamt niedrigere Werte der Lichtintensität. Dies hängt höchst wahrscheinlich mit der Lateraldiffusion des Metabolits während der Messwerterfassung zusammen.

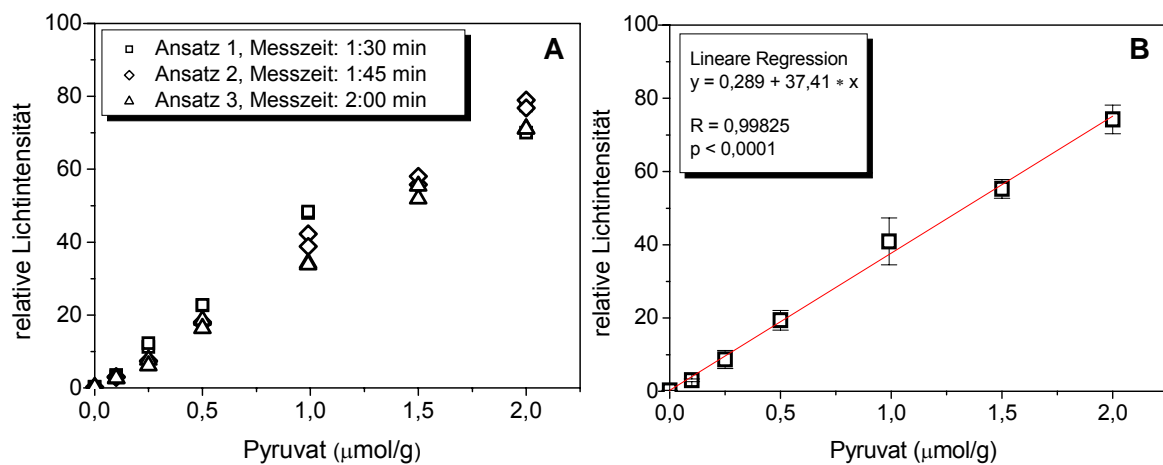


Abbildung 3-10: Unabhängige Ansätze der Biolumineszenzreaktion.

(A) Unabhängige Messungen von Pyruvatstandards (20 μm) an drei verschiedenen Tagen. Für jeden gemessenen Wert wurden Doppelbestimmungen durchgeführt (*Ausnahme*: Ansatz 3, hier wurde der 0 $\mu\text{mol/g}$ Standard nur einfach bestimmt). Der Reaktionsansatz war für alle Ansätze gleich und ist in Tabelle A3 im Anhang angegebenen. Die Messzeiten betragen für Ansatz 1 1:30, für Ansatz 2 1:45 und für Ansatz 3 2:00 Minuten. (B) Mittelwerte \pm SD aller in (A) gemessenen Standards. Die Ergebnisse der linearen Regression sind in der Graphik angegeben.

Aufgrund der Schwankungen wurde an jeden Messtag ein neues Reaktionsgemisch angesetzt und die optimale Integrationszeit bestimmt. Für die Kalibrierung zur Bestimmung des Pyruvatgehalts in unbekanntem Proben wurden täglich Lichtintensitäten von Standards in Zwei- bis Dreifachbestimmungen gemessen, die zum Erstellen einer Standardkurve dienten. Messungen bis 5 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat wiesen mit steigender Konzentration einen für enzymatische Reaktionen typischen, nicht-linearen Verlauf auf. Die BoxLucas1Mod-Funktion erwies sich dabei als Anpassung der Wahl (siehe Abbildung 3-11).

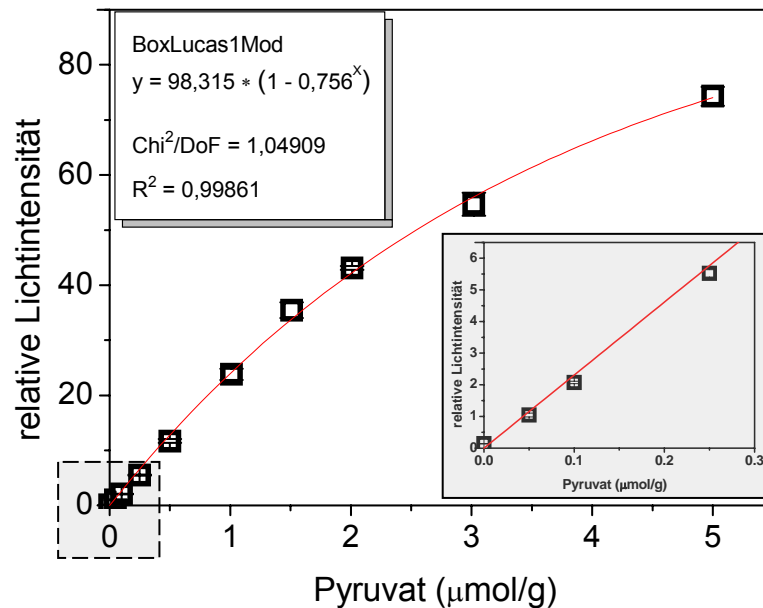


Abbildung 3-11: Biolumineszenzmessungen an Pyruvatstandards bis 5 µmol/g.

Standardkurve (Mittelwerte \pm SD mit $n = 3$) von Pyruvatschnitten (20 µm), die mit dem in Tabelle A4 (siehe Anhang) angegebenen Reaktionsansatz gemessen wurden. Rechts unten ist der grau unterlegte Bereich von 0-0,25 µmol/g Pyruvat vergrößert dargestellt. Die Inkubationszeit betrug je 10 Sekunden, die Messzeit 1:15 Minuten.

Eine Erhöhung der Enzym- und Substanzkonzentrationen (siehe Tabelle A4 im Anhang) erwies sich bezüglich der Lichtausbeute als nicht weiter vorteilhaft. Die Lichtintensitäten wiesen dabei insgesamt sogar geringere Werte auf (siehe Abbildung 3-11). Allerdings lässt sich an diesem Beispiel die sehr geringe Schwankung innerhalb eines Reaktionsansatzes bei gleicher Konzentration demonstrieren, die sich im Laufe der Arbeit bis auf wenige Ausnahmen bestätigte. Der größte Unterschied in den Werten der Lichtintensität innerhalb einer Konzentration lag hier bei 11,2 % für 0 µmol/g Pyruvat.

Die theoretisch kleinste unterscheidbare Gehaltsstufe von Pyruvat lag bei den besseren Reaktionsansätzen mit höheren Lichtintensitäten, wie sie in Abbildung 3-10 dargestellt ist, bei einem Pyruvatgehalt von 0,02 µmol/g. Ausgehend von einem Schnitt der Größe 1 cm² und 20 µm Dicke ergab sich daraus als abgeschätzte minimal detektierbare Menge ein Wert von 0,04 pmol Pyruvat.

3.5 Abhängigkeit der Biolumineszenzintensität von der Schnittdicke

Es konnte gezeigt werden, dass die Lichtintensität der Biolumineszenzreaktion in direktem Zusammenhang mit der Schnittdicke und damit auch mit der in die Reaktion eingehenden Gesamtmenge an Pyruvat stand. Abbildung 3-12 zeigt diese Korrelation in (A) anhand eines

1 $\mu\text{mol/g}$ Standards, der unterschiedlich dick geschnitten wurde. Die Schnittdicke wurde in 5 μm Abständen von 5–25 μm variiert. (B) zeigt die Abhängigkeit des bei der Biolumineszenzreaktion entstehenden Lichts von der Schnittdicke anhand zweier Standardreihen. Dabei unterschieden sich die Standards lediglich in ihrer Schnittdicke (16 μm bzw. 20 μm). Die Messungen der beiden Reihen erfolgten am selben Tag mit demselben Reaktionsansatz. Sowohl für (A) als auch für (B) sind Mittelwerte \pm SD von Dreifachbestimmungen gezeigt.

Beide Versuche demonstrieren eindrücklich die Notwendigkeit gleich dicker Schnitte von Standards und aktuellen Proben. Der Quotient aus den Steigungen der linearen Regression der in Abbildung 3-12 (B) gezeigten Messreihen von Pyruvatstandards spiegelt mit einem Wert von 1,31 ziemlich genau das Verhältnis von 1,25 zwischen den Schnittdicken von 20 μm und 16 μm wider.

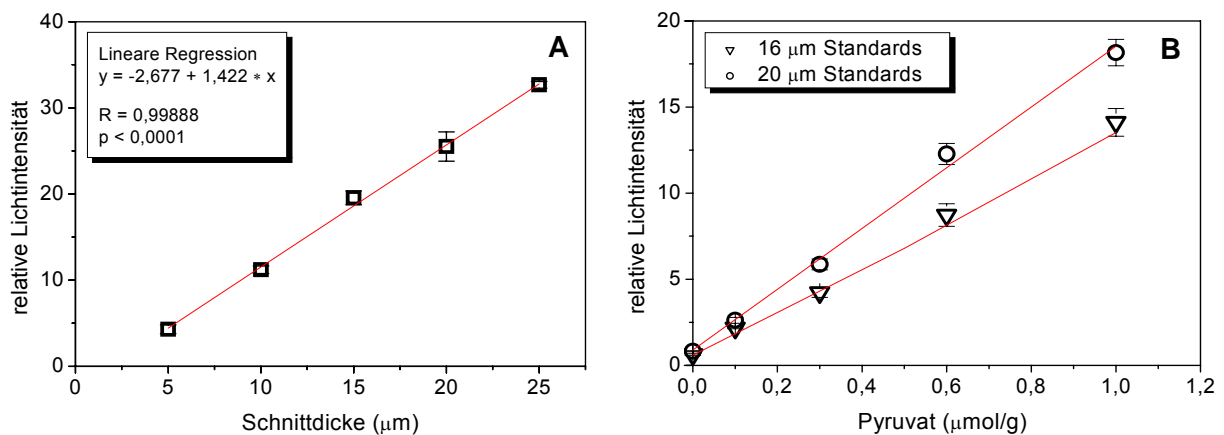


Abbildung 3-12: Lichtintensität in Abhängigkeit von der Schnittdicke.

(A) Relative Lichtintensität als Funktion der Schnittdicke bei einem konstanten Pyruvatgehalt von 1 $\mu\text{mol/g}$. (B) Standardkurven von Pyruvatschnitten mit 16 μm bzw. 20 μm Dicke. Lineare Regressionen ergaben für 16 μm $y = 0,590 + 13,46 * x$ mit $R = 0,99903$ und $p < 0,0001$ und für 20 μm $y = 0,886 + 17,651 * x$ mit $R = 0,99788$ und $p = 1,171e-4$.

3.6 Pyruvat-abhängige Biolumineszenzmethode: Wiederfindungsexperimente

Die Richtigkeit der neu etablierten Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzmethode wurde mit verschiedenen Referenzmethoden untersucht. Als Ersatz für das üblicherweise verwendete Einbettmedium zur Herstellung von Standards für die Biolumineszenz musste ein gewebeähnlicher Ersatz gefunden werden, der gleichermaßen für die Biolumineszenzmessungen geeignet war, sich also hitzefixieren ließ, sowie für eine gängige Extraktionsprozedur, z.B. eine Perchlorsäureextraktion, die zur Referenzmessung in Frage kam. Stücke von Schweineleber wurden daher unter Hitze inaktiviert und anschließend homogenisiert. Aus diesen

Leberhomogenaten wurden Pyruvatstandards und solche Proben angefertigt, die einen dem Untersucher unbekanntem Pyruvatgehalt enthielten und daher von einer anderen Person anzusetzen waren (Blindproben). Ansonsten wurden Standards und Blindproben auf die gleiche Weise behandelt. Sie wurden parallel sowohl für Biolumineszenzmessungen als auch für die verschiedenen Referenzmethoden präpariert. Für letztere wurden Perchlorsäureextrakte angefertigt, die mittels HPLC, zweier verschiedener enzymatischer Tests (PDH- bzw. LDH-Test) und einem nicht enzymatischen kolorimetrischen Test im Microplate Reader untersucht wurden. Für die Biolumineszenzmessungen wurden 20 µm dicke Schnitte aus den tiefgefrorenen Leberhomogenaten angefertigt und mit der neuen Methode untersucht.

3.6.1 Ergebnisse der Biolumineszenz

Mehrfachbestimmungen eines Pyruvatstandards von Leberhomogenaten ergaben im Allgemeinen einen größeren Fehler als Mehrfachbestimmungen der gängigen Standards in Einbettmedium (Abbildung 3-13 im Vergleich zu Abbildung 3-11). Dennoch ergab sich auch hier ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen Pyruvatgehalt und Lichtintensität mit $R^2 = 0,99892$ und $\text{Chi}^2 = 0,31188$.

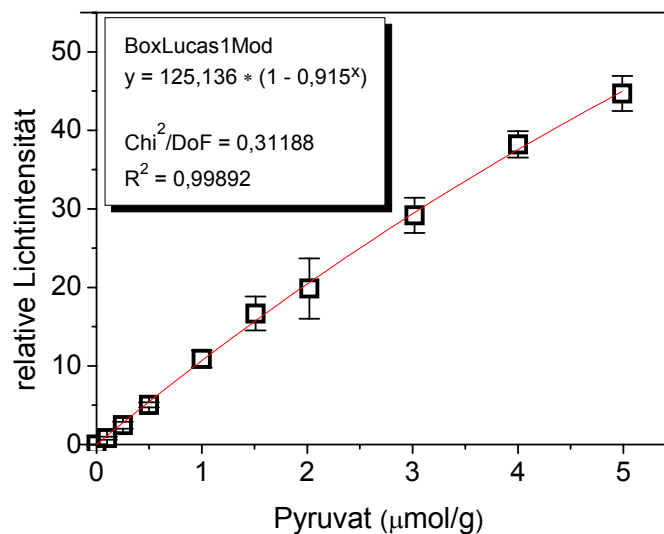


Abbildung 3-13: Biolumineszenz-Standardkurve von Leberhomogenaten.

Repräsentative Standardkurve von Leberhomogenaten, die mit Hilfe der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz gemessen wurden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$. Ergebnisse der nicht-linearen BoxLucas1Mod-Anpassung sind im Kasten links oben angegeben.

Von zehn gemessenen Blindproben ergaben sieben Proben eine Abweichung von $\leq 9\%$ vom tatsächlichen Pyruvatgehalt. Drei Proben wichen mit 13% bzw. 15% vom vorliegenden Pyruvatgehalt ab. Die Daten zu den Blindproben sind im Vergleich zu den Referenzmethoden im Anhang in Tabelle A5 und Abbildung 3-17 zusammenfassend dargestellt.

3.6.2 Ergebnisse der HPLC

Der Pyruvatgehalt der Standards und Blindproben von Leberhomogenaten wurde mit einer Anionenaustauscher-Säule bestimmt. Dabei wurden die Pyruvatpeaks anhand ihrer Retentionszeit identifiziert. Diese wurde zunächst mit Hilfe von reinen Pyruvatlösungen bestimmt. Die Retentionszeit von Pyruvat lag bei 8,51–8,60 Minuten. Abbildung 3-14 zeigt eine repräsentative Standardkurve aus Mittelwerten \pm SD von Dreifachbestimmungen (A) und ein korrespondierendes Chromatogramm (B) eines Leberhomogenatstandards. Der Pyruvatpeak war hier eindeutig zu identifizieren.

Das Ergebnis der Bestimmung von Pyruvat in den Blindproben ist in Tabelle A5 im Anhang dargestellt. Acht der zehn Proben wiesen eine Abweichung von $\leq 7\%$ vom tatsächlichen Pyruvatgehalt auf. Nur zwei der gemessenen Blindproben unterschieden sich mit 10 % (Nr. 2) bzw. 11 % (Nr. 1) deutlicher vom tatsächlich vorliegenden Gehalt.

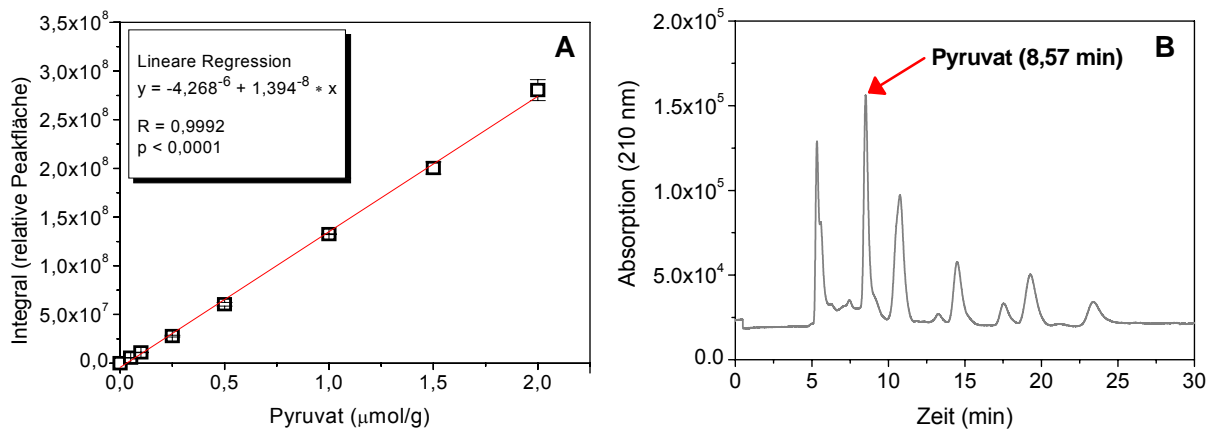


Abbildung 3-14: HPLC-Standardkurve und Chromatogramm.

(A) Repräsentative Standardkurve saurer Extrakte von Leberhomogenaten bekannter Pyruvatgehalte. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD mit $n = 3$. (B) Beispiel eines Chromatogramms über 30 Minuten eines Leberhomogenatstandards. Die Retentionszeit von Pyruvat betrug nach Injektion von 50 μl filtriertem Perchlorsäureextrakt 8,57 Minuten.

3.6.3 Ergebnisse der enzymatischen photometrischen Tests

Mit zwei voneinander unabhängigen photometrischen Tests, die auf unterschiedlichen Reaktionsprinzipien beruhen, wurden die Perchlorsäureextrakte der Standards und Blindproben von Leberhomogenaten gemessen. Der PDH-Test spiegelt die Basisreaktion der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz wider. Der LDH-Test basiert auf dem Prinzip der Umwandlung von Pyruvat zu Laktat. Bei beiden Versuchen wird NADH durch die Extinktion bei 340 nm bestimmt. So kommt es während des Reaktionsverlaufs bei der PDH-Reaktion zu einer Zunahme, bei der LDH-Reaktion zu einer Abnahme der Extinktion. Abbildung 3-15 zeigt Kalibrierungskurven, die mit Hilfe der Endpunkt-Methodik durchgeführt wurden und ΔE_{340} in Ab-

hängigkeit des Pyruvatgehalts zeigen. Diese Kalibrierungen wurden zur Berechnung der Blindproben herangezogen.

Die Messungen der sauren Extrakte mit Hilfe des PDH-Tests zeigten in zwei Blindproben eine Abweichung vom tatsächlich enthaltenen Pyruvatgehalt von $\geq 14\%$. Diese beiden Proben (Nr. 1 und 2) lagen im unteren Bereich bis $0,3\ \mu\text{mol/g}$ Pyruvat.

Der LDH-Test zeigte nur in einem Extrakt eine sehr hohe Abweichung vom tatsächlichen Pyruvatgehalt in der Probe (Nr. 1). Die übrigen Blindproben wiesen Abweichungen von $\leq 9\%$ auf. Alle Ergebnisse sind in Tabelle A5 im Anhang zusammengefasst.

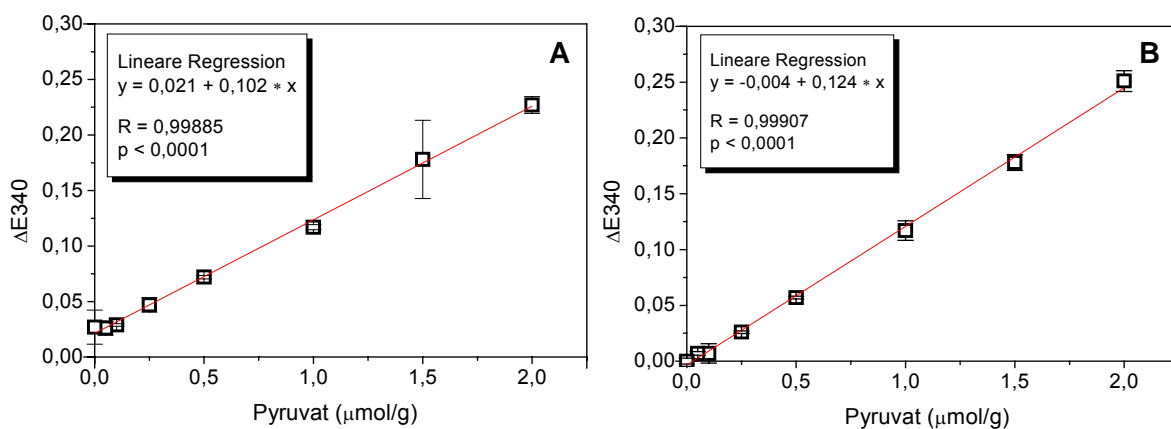


Abbildung 3-15: Photometrische Tests – Standardkurven von Leberhomogenaten mit definiertem Pyruvatgehalt.

Standardkurven saurer Extrakte von Leberhomogenaten, die mit Hilfe des (A) PDH-Tests bzw. (B) LDH-Tests gemessen wurden. Für alle Messpunkte sind Mittelwerte \pm SD von Dreifachbestimmungen gezeigt.

3.6.4 Ergebnisse des kolorimetrischen photometrischen Tests

Neben der HPLC diente ein weiterer nicht-enzymatischer Test zur Kontrolle der neu etablierten Biolumineszenzmethode. Der Test beruht auf einem Protokoll von Anthon und Barrett (2003) und wurde so modifiziert, dass er im 96-Well-Format angewendet werden konnte. Der kolorimetrische Test war im Vergleich zu allen anderen Versuchen am wenigsten aufwändig. Auch hier wurden die Perchlorsäureextrakte der Standards und Blindproben von Leberhomogenaten in Dreifachbestimmungen gemessen. Abbildung 3-16 zeigt eine repräsentative Standardkurve der sauren Extrakte von Leberhomogenaten.

Acht der zehn gemessenen Blindproben zeigten im Wiederfindungsexperiment mit Hilfe des kolorimetrischen Tests Abweichungen zum tatsächlich enthaltenen Pyruvatgehalt von $\leq 10\%$. Lediglich zwei Proben (Nr. 1 und 6) wiesen höhere Abweichungen auf (39 % bzw. 13 % niedriger im Vergleich zu den tatsächlich vorliegenden Gehalten), wobei Probe Nr. 1

auch in beiden enzymatischen Referenzmethoden auffällig war. Alle Messergebnisse und Abweichungen sind in Tabelle A5 im Anhang angegeben.

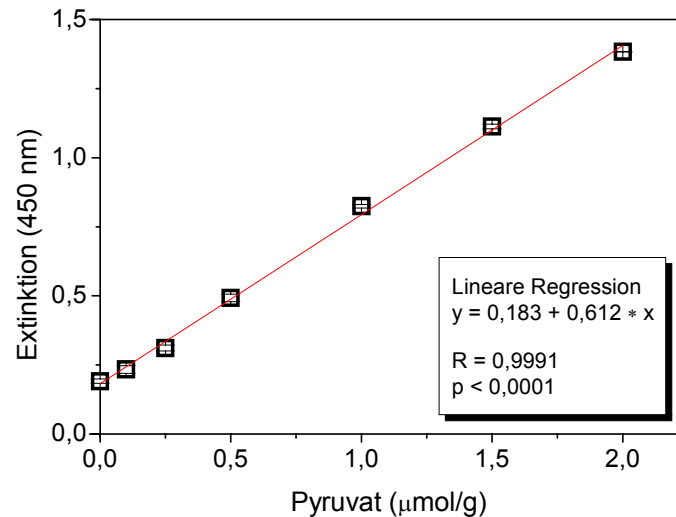


Abbildung 3-16: Kolorimetrischer Test – repräsentative Standardkurve von Leberhomogenaten definierter Pyruvatgehalte.

Standardkurve saurer Extrakte von Leberhomogenaten, die mit Hilfe des kolorimetrischen Tests mit Hilfe von DNPH gemessen wurden. Für alle Messpunkte sind Mittelwerte \pm SD von $n = 3$ gezeigt.

3.6.5 Zusammenfassung der Wiederfindungsexperimente

Die Wiederfindungsexperimente für die Pyruvat-abhängige Biolumineszenz wurden an zehn Blindproben durchgeführt. Diese wurden neben der Biolumineszenz auch mit vier verschiedenen unabhängigen Testverfahren untersucht, die sowohl auf enzymatischen als auch auf nicht-enzymatischen Prinzipien beruhten.

Größere Abweichungen wiesen die enzymatischen Referenzmethoden und der kolorimetrische Test bei der Probe mit dem geringsten Pyruvatgehalt (Nr. 1 mit $0,18 \mu\text{mol/g}$ Pyruvat) auf. Da sowohl das Biolumineszenzverfahren als auch die HPLC in dieser Probe viel geringere Fehler aufwiesen, ist davon auszugehen, dass es sich hier nicht um einen Pipettierfehler handelte, sondern entweder um ein Sensitivitätsproblem der entsprechenden Methoden oder um eine gerätespezifische Eigenart, die in diesem Bereich nur bei der Messung im Microplate Reader auftauchte. Bei diesen geringen Pyruvatgehalten lagen entsprechend kleine Extinktionsänderungen vor, die unter Umständen schon an der unteren Grenze der absoluten Messgenauigkeit dieses Geräts lagen.

Abbildung 3-17 zeigt die Ergebnisse aller Referenzmethoden und der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzmethode im Vergleich. Die gemessenen Gehalte sind als Funktion des tatsächlich enthaltenen Pyruvats der Blindproben aufgetragen. Die graue Linie in der Graphik

zeigt die Diagonale beider Parameter mit einer Korrelation von 1. Dies bedeutet, dass Punkte, die direkt auf dieser Linie liegen, keine Abweichung vom „Sollwert“ aufweisen.

Die hier entwickelte Biolumineszenzmethode zur quantitativen und zur regionalen Bestimmung von Pyruvat wies eine gute Wiederfindung in den Blindproben auf. Die größte Abweichung vom tatsächlichen Pyruvatgehalt lag in zwei von zehn Proben bei 15 %.

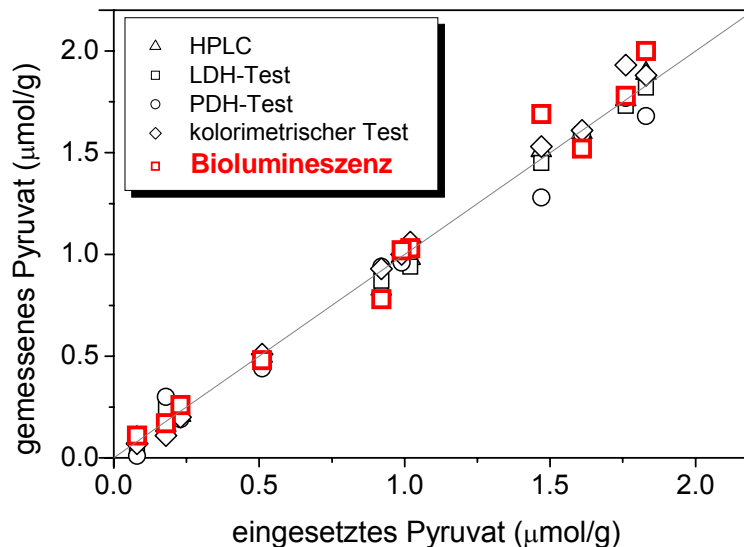


Abbildung 3-17: Zusammenstellung der Wiederfindungsexperimente.

Gezeigt sind mittels Biolumineszenz (rot) und Referenzmethoden (schwarz) bestimmtes Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$) in Blindproben als Funktion des tatsächlich vorliegenden Gehalts. Die graue Linie symbolisiert die Diagonale mit einer Korrelation von 1,0. Alle gezeigten Werte stammen aus Mittelungen von Dreifachbestimmungen. Die gemessenen Werte der Biolumineszenz- und aller Referenzmessungen sind in Tabelle A5 im Anhang aufgelistet.

In weiteren Versuchen wurde Tumormaterial – humane Xenotransplantate und Biopsien des Kopf-Hals-Bereichs – mit der neuen Methode untersucht. Dabei wurde sowohl eine Quantifizierung des Metabolitgehalts verschiedener Gewebeareale innerhalb eines Kryoschnittes vorgenommen, als auch die regionale Verteilung von Pyruvat untersucht.

3.7 Anwendungsbeispiele der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz

Die Quantifizierung und räumliche Darstellung von Pyruvat erfolgte an Xenotransplantaten humaner Plattenepithelkarzinomzelllinien und an humanen Tumorbiopsien aus der Kopf-Hals-Region (HNSCC). Das Tumormaterial wurde sofort nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff eingebracht, um den *in vivo* Metabolitstatus zu fixieren. Die korrekte Handhabung der Entnahme und der Erhalt der Gewebewitalität wurden bei jeder Biopsie zunächst durch die Messung von ATP überprüft. Vor dem Schneiden wurden bei ausreichend großen Gewe-

beprobten zur späteren Orientierung und Zuordnung der Metabolitverteilung zu strukturellen Merkmalen mit Hilfe einer speziellen Gabel zwei parallele Kanäle in die Biopsie gestochen. HE-gefärbte Parallelschnitte dienen der histologischen Beurteilung der Proben. Um das digitale Graustufenbild zur Lokalisation und Quantifizierung von Pyruvat innerhalb eines Gewebeschnittes deutlicher zu veranschaulichen, erfolgte die Kodierung definierter Konzentrationsbereiche in Falschfarben.

3.7.1 Darstellung der strukturassoziierten Auswertung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz anhand eines HNSCC-Xenotransplantats

Die vielfältigen Möglichkeiten der bildgebenden Biolumineszenzmethode sind in Abbildung 3-18 exemplarisch veranschaulicht: In (A) ist ein HE-gefärbter Kryoschnitt eines HNSCC-Xenotransplantats gezeigt, bei dem histologisch definierte Areale wie Tumor-, Muskel- oder Bindegewebe und Haut graphisch durch Konturzeichnungen hervorgehoben sind. (B) zeigt eine kalibrierte Pyruvatverteilung in Falschfarben eines Folgeschnittes von (A).

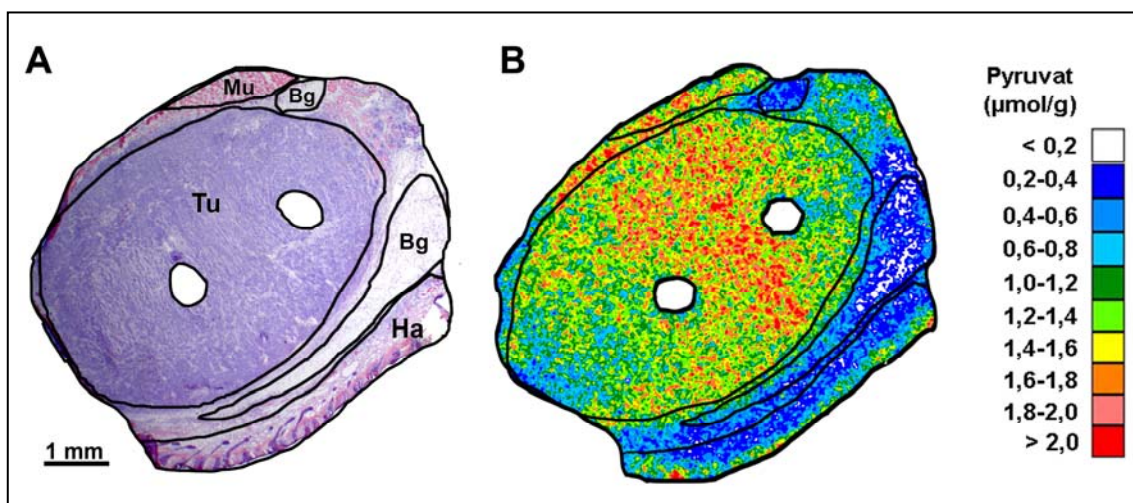


Abbildung 3-18: HE-Färbung und räumliche Verteilung von Pyruvat innerhalb eines Xenotransplantatschnittes.

(A) HE-gefärbter Kryoschnitt eines HNSCC-Xenotransplantats. Gewebespezifische Areale sind mit Konturen gekennzeichnet. Tu = vitales Tumorgewebe, Bg = Bindegewebe, Mu = Muskelgewebe und Ha = Haut. (B) Falschfarbencodiertes Digitalbild eines Parallelschnittes nach Biolumineszenzmessung von Pyruvat. Die eingezeichneten Konturen der gewebespezifischen Areale entsprechen (A). Zwei parallele Stichkanäle innerhalb der Biopsie dienen der korrekten Orientierung zur gewebespezifischen Auswertung.

Die in Abbildung 3-18 (A) markierten Areale lassen sich mit Hilfe der entsprechenden Computersoftware auf das Bild in (B) übertragen. Somit ist eine selektive Analyse der Pyruvatverteilung in den genannten Gewebearealen möglich. Die zu den gekennzeichneten Arealen korrespondierenden statistischen Analysen der Pyruvatkonzentrationen in Form von Häufig-

keitsverteilungen innerhalb der entsprechenden Fläche sind in Abbildung 3-19 aufgeführt. Den höchsten Pyruvatgehalt mit 1,14 $\mu\text{mol/g}$ wiesen Muskel- und vitales Tumorgewebe auf.

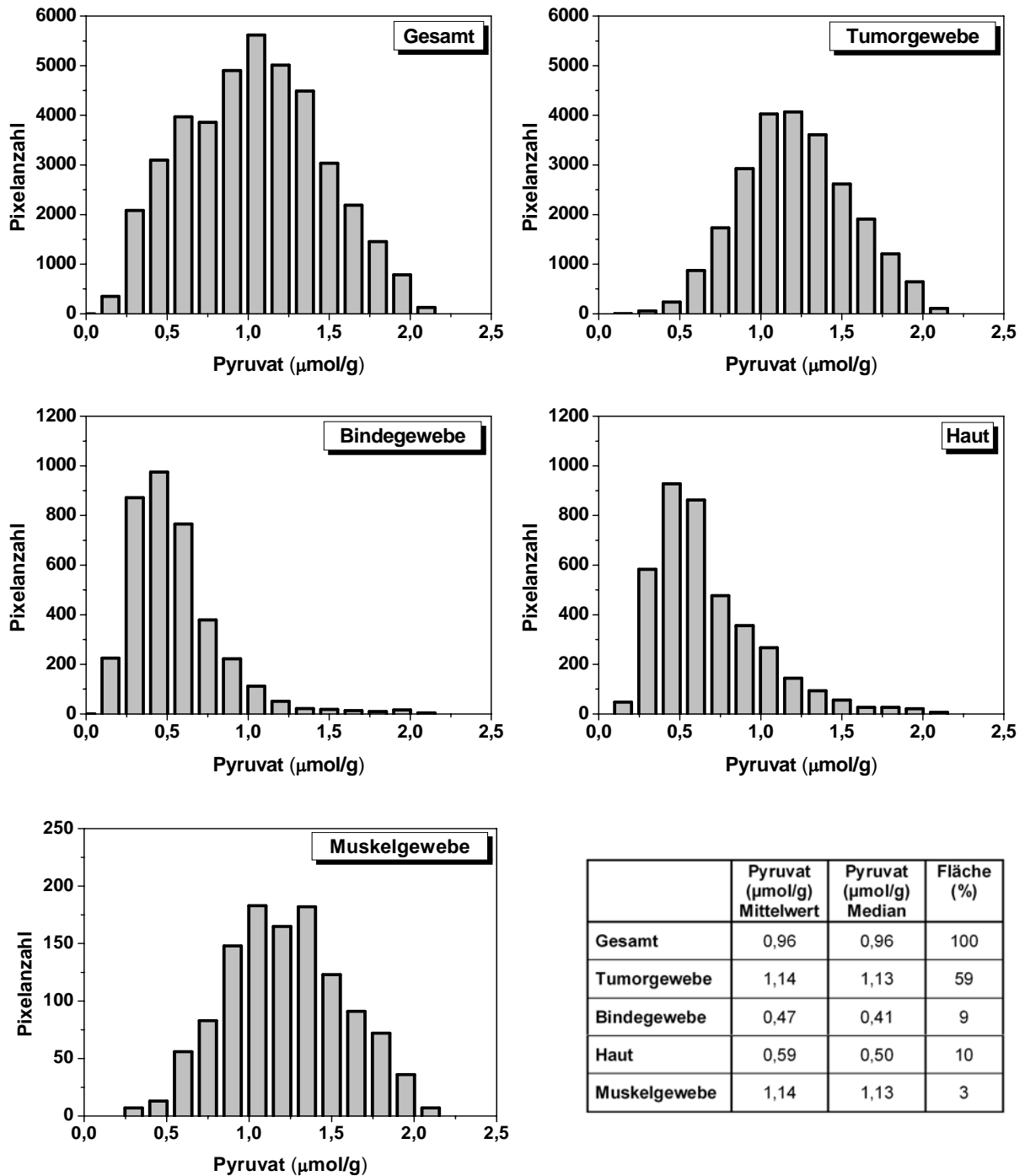


Abbildung 3-19: Statistische Auswertung der Pyruvatverteilung aus den in Abbildung 3-18 gekennzeichneten Arealen.

Häufigkeitsverteilungen des Gehalts an Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$) innerhalb eines Kryoschnittes. Mittelwert und Median der entsprechenden Areale und deren Flächenanteil in % bezogen auf den gesamten Schnitt sind in der Tabelle rechts unten angegeben.

Die einzelnen Pyruvatwerte ($\mu\text{mol/g}$) sind im Tumor- und Muskelgewebe einer Normalverteilung entsprechend verteilt. Nur wenige Stellen wiesen Werte über $2,0 \mu\text{mol/g}$ und unter $0,5 \mu\text{mol/g}$ Pyruvat auf. Der Anteil des vitalen Tumorgewebes am Gesamtschnitt betrug 59 %, Muskelgewebe nur 3 %. Bindegewebe und Haut machten 9 % bzw. 10 % Flächenanteil aus; hier war die Verteilung des Pyruvatgehalts verschoben, d.h. die Mittelwerte lagen in höheren Bereichen als die Mediane. Der Flächenanteil für Bindegewebe und Haut, der über $1,0 \mu\text{mol/g}$ Pyruvat lag, entsprach nur 7 % für das Bindegewebe und 16 % für die Haut. Im Vergleich dazu lag der Flächenanteil von Tumor- und Muskelgewebe, der über $1,0 \mu\text{mol/g}$ lag, bei 76 % bzw. 74 %. Die über die Fläche gemittelten Werte von ATP, Laktat und Pyruvat in den separat ausgewerteten Gewebearealen sind in Tabelle 3-3 zusammengestellt. Der Mittelwert für Pyruvat der gesamten Fläche des Parallelschnittes lag bei $0,96 \mu\text{mol/g}$. Tumor- und Muskelanteil wiesen im Durchschnitt höhere Pyruvatwerte ($1,14 \mu\text{mol/g}$) im Vergleich zur gesamten Fläche des Schnittes auf, Bindegewebe und Haut niedrigere ($0,47 \mu\text{mol/g}$ bzw. $0,59 \mu\text{mol/g}$). Der ATP-Gehalt des gesamten Parallelschnittes lag bei $0,8 \mu\text{mol/g}$. Sowohl Muskel- als auch Tumorgewebe wiesen höhere ATP-Werte auf ($1,3 \mu\text{mol/g}$ bzw. $1,0 \mu\text{mol/g}$), Bindegewebe und Haut wesentlich niedrigere ($0,1 \mu\text{mol/g}$ bzw. $0,3 \mu\text{mol/g}$). Der mittlere Laktatgehalt dieses Kryoschnittes lag bei $12,1 \mu\text{mol/g}$. Laktat im vitalen Tumorgewebe war mit $15,9 \mu\text{mol/g}$ um den Faktor 1,3 höher als in der gesamten Schnittfläche. In Muskel- und Bindegewebe wurden Werte von $11,0 \mu\text{mol/g}$ bzw. $6,8 \mu\text{mol/g}$ Laktat ermittelt. Aus den über die entsprechenden Flächen gemittelten Werten für Laktat und Pyruvat wurden die L/P-Quotienten gebildet. Das Muskelgewebe wies mit 9,6 den niedrigsten, das Bindegewebe mit 14,9 den höchsten Verhältniswert auf. Tumorgewebe und Haut lagen bei 13,9 bzw. 10,5.

Tabelle 3-3: ATP, Laktat und Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$) in ausgewählten Arealen des in Abbildung 3-18 und 3-19 gezeigten HNSCC-Xenotransplantatschnittes und L/P-Verhältnisse. Die ausgewählten Areale sind in Abbildung 3-18 gekennzeichnet.

	ATP	Laktat	Pyruvat	L/P
Gesamt	0,8	12,1	0,96	12,6
Tumorgewebe	1,0	15,9	1,14	13,9
Muskelgewebe	1,3	11,0	1,14	9,6
Bindegewebe	0,1	6,8	0,47	14,5
Haut	0,3	6,2	0,59	10,5

3.7.2 Pyruvat-, Laktat- und ATP-Bestimmungen in HNSCC-Xenotransplantaten

Von acht Tumortalinien (Ca133, FaDu, SAS, UTSCC-5, -14, -15, -45 und XF354) wurde in je 6 bis 12 Xenotransplantaten der Pyruvatgehalt gemessen, wobei dieser in den HNSCC-Xenotransplantaten im Mittel bei $1,24 \pm 0,20 \mu\text{mol/g}$ Pyruvat lag. In Tabelle 3-4 sind für jede der

acht Tumorklinien die Mittelwerte \pm SD von Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$) der gesamt ausgewerteten Flächen im Vergleich zu den ermittelten Werten innerhalb des vitalen Tumorgewebes und dessen Flächenanteil am Xenotransplantat angegeben. Abbildung 3-20 veranschaulicht noch einmal die Unterschiede des Pyruvatgehalts der gesamten Fläche der Kryoschnitte verglichen mit dem Gehalt des darin vorkommenden vitalen Tumorgewebes. Die Aufstellung der Daten erfolgte in alphabetischer Reihenfolge der Namensabkürzungen. Diese Anordnung wird im Folgenden sowohl für graphische Abbildungen als auch für Tabellen beibehalten.

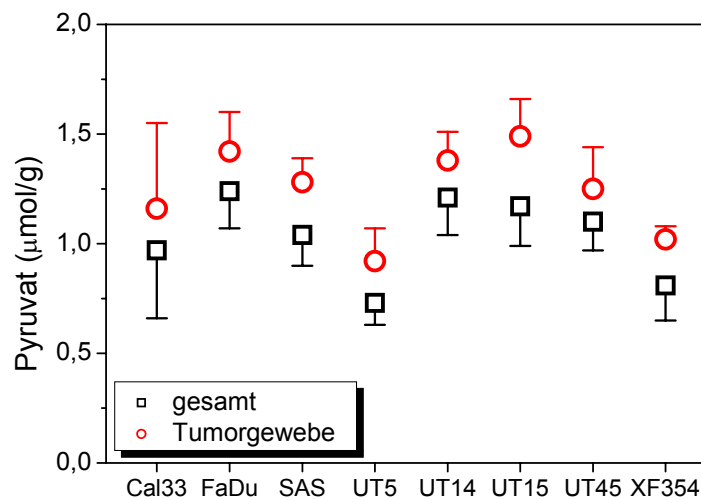


Abbildung 3-20: Bestimmung von Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$) in HNSCC-Xenotransplantaten.

Vergleich des Gehalts an Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$) im gesamten Gewebeschnitt (schwarze Kästen, Mittelwerte - SD) und im vitalen Tumorgewebe (rote Kreise, Mittelwerte + SD). Die Werte stammen aus 6 bis 12 Schnitten je Tumorklinie.

Alle acht Linien wiesen im Durchschnitt innerhalb des Tumorgewebes (rote Kreise) einen um 21 % höheren Gehalt an Pyruvat im Gegensatz zur gesamten Gewebefläche (schwarze Kästen) auf. In Tabelle 3-4 sind unter anderem die prozentualen Flächenanteile des Tumorgewebes bezüglich des gesamten Schnittes angegeben. Der Anteil des Tumorgewebes schwankte im Extremfall von nur 11,8 %, bezogen auf die Gesamtfläche des Kryoschnittes, bis hin zum entgegengesetzten Extrem, in dem 95 % des Gewebeschnittes aus vitalem Tumorgewebe bestand. Die prozentualen Anteile des vitalen Tumorgewebes bezüglich der gesamten Schnittfläche sind für alle gemessenen Kryoschnitte der Xenotransplantate im Anhang in Tabelle A6 aufgeführt.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer separaten Betrachtung und Auswertung unterschiedlicher histologischer Gewebetypen in Xenotransplantaten oder – wie im Folgenden gezeigt wird – auch in Humanbiopsien.

Tabelle 3-4: Pyruvatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) in HNSCC-Xenotransplantaten und Flächenanteile von vitalem Tumorgewebe am Transplantat. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD.

	gesamt ($\mu\text{mol/g}$)	vitales Tumorgewebe ($\mu\text{mol/g}$)	Pyruvat im vitalen Tumorgewebe (% bezogen auf gesamt)	Flächenanteil vitales Tumorgewebe (% bezogen auf gesamt)	N
Cal33	0,97 \pm 0,31	1,16 \pm 0,39	120	30 \pm 11	11
FaDu	1,24 \pm 0,17	1,42 \pm 0,18	115	54 \pm 20	11
SAS	1,04 \pm 0,14	1,28 \pm 0,11	123	43 \pm 16	12
UTSCC-5	0,73 \pm 0,10	0,92 \pm 0,15	126	42 \pm 14	6
UTSCC-14	1,21 \pm 0,17	1,38 \pm 0,13	114	60 \pm 24	10
UTSCC-15	1,17 \pm 0,18	1,49 \pm 0,17	127	24 \pm 7	11
UTSCC-45	1,10 \pm 0,13	1,25 \pm 0,19	114	38 \pm 10	6
XF354	0,81 \pm 0,16	1,02 \pm 0,06	126	34 \pm 6	3*

Detaillierte Angaben zu den Pyruvatwerten der einzelnen Xenotransplantate finden sich im Anhang in den Tabellen A7 und A8. Die Anzahl der gemessenen Tumore pro Linie ist in der letzten Spalte mit „N“ angegeben. Pro Tumor wurde ein Gewebeschnitt gemessen.

*Für XF354 wurden aus drei verschiedenen Tumoren je zwei Schnitte gemessen.

Die Ergebnisse der Metabolitbestimmungen aller acht Tumorlinien für ATP, Laktat und Pyruvat sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst. Die angegebenen Werte beziehen sich hier ausschließlich auf das vitale Tumorgewebe. Die Anzahl der untersuchten Kryoschnitte betrug für ATP und Laktat mindestens 33, die sich aus 11-13 Tumoren pro Linie \rightarrow wenigstens drei Serien zusammensetzten. Die Anzahl der analysierten Schnitte für Pyruvat ist in Tabelle 3-4 angegeben, wobei hier jeder Schnitt aus einem anderen Tumor stammte. Eine Ausnahme bildete die Linie XF354; hier wurden aus drei verschiedenen Tumoren dieser Linie je zwei Schnitte gemessen. Aus den Mittelwerten von Laktat und Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$) wurde innerhalb einer Linie das L/P-Verhältnis bestimmt.

Tabelle 3-5: ATP, Laktat und Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$) in vitalem Tumorgewebe von HNSCC-Xenotransplantaten und entsprechende L/P-Verhältnisse. Mittelwerte \pm SD sind dargestellt.

	ATP	Laktat	Pyruvat	L/P
Cal33	1,4 \pm 0,2	26,7 \pm 4,8	1,16 \pm 0,39	24,6 \pm 5,6
FaDu	1,4 \pm 0,7	16,9 \pm 2,4	1,42 \pm 0,18	12,0 \pm 1,8
SAS	0,8 \pm 0,3	17,1 \pm 3,9	1,28 \pm 0,11	13,3 \pm 2,1
UTSCC-5	1,5 \pm 0,4	25,9 \pm 3,9	0,92 \pm 0,15	27,3 \pm 4,9
UTSCC-14	2,0 \pm 0,6	11,8 \pm 3,6	1,38 \pm 0,13	8,9 \pm 2,5
UTSCC-15	2,5 \pm 0,3	14,6 \pm 2,4	1,49 \pm 0,17	9,8 \pm 1,3
UTSCC-45	1,3 \pm 0,3	18,1 \pm 2,9	1,25 \pm 0,19	14,4 \pm 3,5
XF354	1,5 \pm 0,5	7,2 \pm 1,5	1,02 \pm 0,06	7,2 \pm 0,8

Die Anzahl der untersuchten Schnitte betrug für ATP und Laktat mindestens 33, die sich aus 11-13 Tumoren pro Linie \rightarrow wenigstens drei Serien zusammensetzten. Die Anzahl der analysierten Schnitte für Pyruvat ist in Tabelle 3-4 angegeben.

In Bereichen von vitalem Tumorgewebe lagen die durchschnittlichen Werte für ATP der HNSCC-Xenotransplantate bei 0,8-2,5 $\mu\text{mol/g}$. Diese Regionen wiesen Laktatwerte von 7,2-26,7 $\mu\text{mol/g}$ auf. Detaillierte Angaben zu diesen Stoffwechselprodukten finden sich in der Dissertationsschrift von V. Quennet (2007) und in Quennet et al. (2006). Die ausführlichen Daten zu Cal33 sind im Anhang zusammengefasst (siehe Tabelle A9). Pyruvat wies in allen acht Tumorklinen sehr ähnliche Werte auf. Der Gehalt schwankte im Mittel zwischen 0,92 $\mu\text{mol/g}$ (UTSCC-5) und 1,49 $\mu\text{mol/g}$ (UTSCC-15). Das aus Laktat und Pyruvat resultierende Verhältnis lag im Bereich von 7,2 für XF354 und 27,3 für UTSCC-5.

Abbildung 3-21 zeigt, dass das L/P-Verhältnis der in dieser Arbeit untersuchten HNSCC-Xenotransplantate maßgeblich vom Laktatgehalt bestimmt wurde. Eine Spearman Analyse und eine lineare Regression ergaben eine hoch signifikante positive Korrelation dieser beiden Parameter.

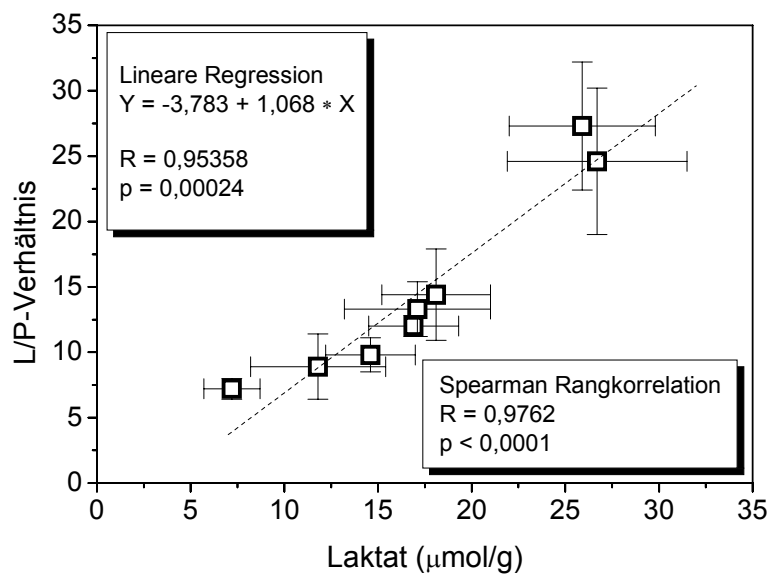


Abbildung 3-21: L/P-Verhältnis in acht Linien humaner HNSCC-Xenotransplantate als Funktion des Laktatgehalts.

Das L/P-Verhältnis von acht Tumorklinen ist in Abhängigkeit vom entsprechenden Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) aufgetragen. Es sind jeweils Mittelwerte \pm SD aller gemessenen Tumoren pro Linie gezeigt. Eine Spearman Rangkorrelation und eine lineare Regression ergaben eine hoch signifikante Korrelation der beiden Parameter.

3.7.3 Pyruvat-, Laktat- und ATP-Bestimmungen in humanen HNSCC-Biopsien

In neun Humanbiopsien des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) wurde Pyruvat mit Hilfe der neuen Biolumineszenzmethode ermittelt. Zur Identifizierung des Tumorgewebes innerhalb der Gewebeschnitte der Biopsien wurden Cytokeratinfärbungen vorgenommen. Die Qualitätskon-

trolle bezüglich Entnahmetechnik und Kryokonservierung erfolgte in einem Parallelschnitt durch eine ATP-Bestimmung. Des Weiteren wurde der Laktatgehalt ermittelt.

Bei der Biopsie TR02 war kein ATP nachweisbar, TR19 wies nur einen sehr geringen Gehalt von 0,1 $\mu\text{mol/g}$ auf (siehe Tabelle 3-6). Diese Proben wurden daher nicht weiter bearbeitet. Bei der Biopsie TR18 konnte nur ein ca. 5%iger Anteil an Tumorgewebe festgestellt werden. Da die Probe insgesamt sehr klein war, wurde auch diese nicht weiter charakterisiert. Die übrigen sechs Biopsien wurden auf ihren Pyruvat- und Laktatgehalt hin überprüft. In den Fällen, in denen Normalgewebe in der Biopsie enthalten war, wurde dieses separat vom vitalen Tumorgewebe ausgewertet. Aus den über die entsprechenden Flächen gemittelten Laktat- und Pyruvatdaten wurde das L/P-Verhältnis für das vitale Tumorgewebe und den Normalgewebeanteil bestimmt.

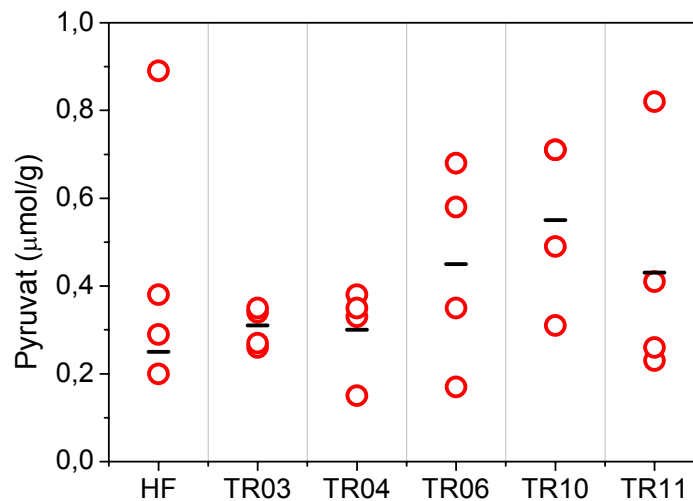


Abbildung 3-22: Pyruvatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) in vitalem Tumorgewebe humaner HNSCC-Biopsien.

Rote Kreise zeigen den ermittelten Gehalt von Pyruvat im vitalen Tumorgewebe einzelner Parallelschnitte (rote Kreise). Die Mittelwerte der vier Serien einer Biopsie sind jeweils als schwarze Balken dargestellt.

Abbildung 3-22 zeigt Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$) im vitalen Tumorgewebe von sechs Humanbiopsien. Dargestellt sind jeweils vier Serienschritte (rote Kreise) einer Biopsie und der daraus resultierende Mittelwert (Balken). Insgesamt war hier der Pyruvatgehalt über alle Proben gemittelt ($0,41 \pm 0,09 \mu\text{mol/g}$) um den Faktor 3,02 niedriger als der der oben gezeigten Xenotransplantate. Den geringsten mittleren Pyruvatgehalt wies die Probe TR04 mit $0,30 \pm 0,10 \mu\text{mol/g}$ auf, den höchsten die Probe TR10 mit $0,55 \pm 0,16 \mu\text{mol/g}$. Da hier – im Gegensatz zu den Xenotransplantaten – für jede Biopsie vier Messungen erfolgten, ist die teilweise sehr heterogene Verteilung von Pyruvat innerhalb einer Tumorprobe zu erkennen. Auch die Werte für Laktat waren hier im Mittel ($8,9 \pm 6,2 \mu\text{mol/g}$) niedriger als die der Xenotransplantate. Sie

lagen im Bereich von $5,3 \pm 2,3 \mu\text{mol/g}$ bis $21,2 \pm 2,4 \mu\text{mol/g}$ Laktat im vitalen Tumorgewebe. Die Mittelwerte (\pm SD) der Laktat- und ATP-Bestimmungen sind in Tabelle 3-6 angegeben.

Tabelle 3-6: Pyruvat, Laktat und ATP ($\mu\text{mol/g}$) in humanen HNSCC-Biopsien. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD.

	Pyruvat ($\mu\text{mol/g}$)		Laktat ($\mu\text{mol/g}$)		ATP ($\mu\text{mol/g}$)
	vitales Tumorgewebe	Normalgewebe	vitales Tumorgewebe	Normalgewebe	gesamt
HF	$0,44 \pm 0,31$	$0,42 \pm 0,28$	$21,2 \pm 2,4$	$25,1 \pm 3,1$	$0,8 \pm 0,1$
TR02	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	$0,0 \pm 0,0$
TR03	$0,31 \pm 0,05$	0,24	$9,0 \pm 3,8$	$4,8 \pm 3,8$	$1,0 \pm 0,2$
TR04	$0,30 \pm 0,10$	$0,21 \pm 0,09$	$6,6 \pm 1,3$	$4,4 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,2$
TR06	$0,45 \pm 0,23$	-	$7,1 \pm 2,2$	-	$0,6 \pm 0,2$
TR10	$0,50 \pm 0,16$	-	$5,3 \pm 2,3$	-	$1,3 \pm 0,0$
TR11	$0,43 \pm 0,27$	0,2	$4,2 \pm 3,3$	$4,9 \pm 4,4$	$0,9 \pm 0,1$
TR18	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	$0,4 \pm 0,1$
TR19	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	$0,1 \pm 0,0$

n.e. = nicht ermittelt.

Vier der neun Biopsien enthielten Anteile von Normalgewebe (siehe Tabelle 3-6 und A11). In dreien dieser Proben lag der Pyruvatgehalt im Normalgewebe unter dem des vitalen Tumorgewebes. Auch hier wiesen alle Proben – wie es auch bei den Xenotransplantaten der Fall war – im Mittel höhere Pyruvatwerte im vitalen Tumorgewebe als im Normalgewebe auf. Auch der Laktatgehalt unterschied sich in Tumor- und Normalgewebe. Hier lagen zwei der vier Proben mit Normalgewebeanteil deutlich unter dem Laktatgehalt des vitalen Tumorgewebes. Die mittleren Flächenanteile von Tumor- und Normalgewebe am gesamten Gewebeschnitt sind in Tabelle 3-7 gezeigt. Die Messergebnisse für jeden einzelnen Schnitt sind im Anhang in Tabelle A10 aufgeführt.

Tabelle 3-7: L/P-Verhältnisse und prozentuale Anteile von vitalem Tumorgewebe und Normalgewebe humaner HNSCC-Biopsien. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD für das vitale Tumor- und Normalgewebe von jeweils vier Serienschnitten.

	L/P		Flächenanteil (% bezogen auf gesamt)	
	vitales Tumorgewebe	Normalgewebe	vitales Tumorgewebe	Normalgewebe
HF	$62,8 \pm 30,8$	$76,9 \pm 39,9$	24 ± 9	24 ± 7
TR03	$30,6 \pm 15,2$	19,9	66 ± 7	5 ± 3
TR04	$23,8 \pm 6,7$	$23,9 \pm 8,4$	60 ± 12	15 ± 3
TR06	$18,1 \pm 5,9$	-	61 ± 26	-
TR10	$11,2 \pm 7,1$	-	85 ± 12	-
TR11	$13,9 \pm 14,4$	23,0	79 ± 19	15 ± 2

Abbildung 3-23 zeigt die prozentualen Mittelwerte \pm SD des vitalen Tumorgewebes aus jeweils vier Serien der Humanbiopsien. Wie auch bei den Xenotransplantaten konnte bei den Humanbiopsien ein signifikanter, linearer Zusammenhang zwischen L/P-Verhältnis und Laktatgehalt der Tumoren festgestellt werden. Allerdings war hier die Spearman Rangkorrelation nicht so hoch signifikant wie bei den Xenotransplantaten (siehe Abbildung 3-21).

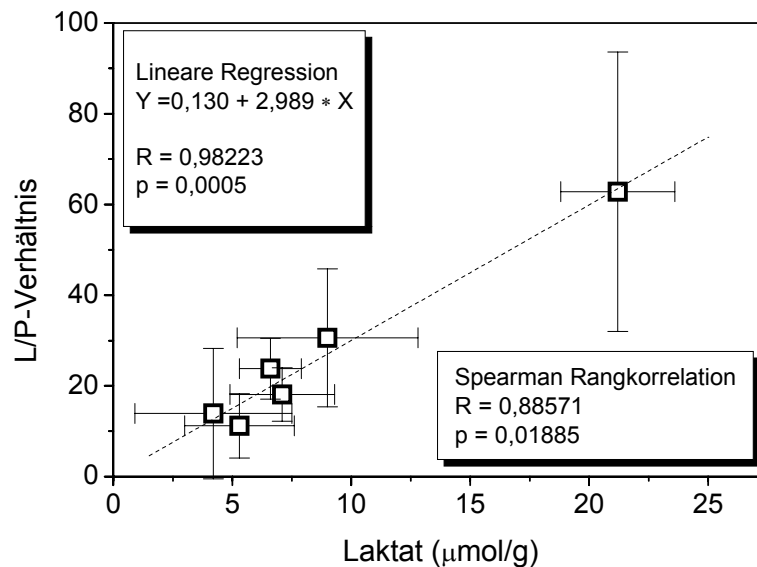


Abbildung 3-23: L/P-Verhältnis in humanen HNSCC-Biopsien als Funktion des Laktatgehalts.

Das L/P-Verhältnis von sechs Tumorklinen ist in Abhängigkeit von dem entsprechenden Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) aufgetragen. Es sind jeweils Mittelwerte \pm SD aus je vier Gewebeschnitten pro Biopsie gezeigt. Die lineare Regression ergab eine hoch signifikante Korrelation zwischen beiden Parametern. Die Rangkorrelation mit Hilfe der Spearman-Analyse ergab ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang.

3.8 Erstellen von L/P-Karten aus Laktat- und Pyruvatbiolumineszenzen

Die neu etablierte Pyruvatbiolumineszenz wurde mit der bereits bestehenden Laktatbiolumineszenz kombiniert, so dass die regionale Verteilung der L/P-Verhältnisse innerhalb von Geweben mittels einer L/P-Karte anschaulich gemacht werden konnte.

Anhand eines humanen xenotransplantierten Tumors wird hier exemplarisch die Erstellung einer L/P-Karte beschrieben. Da in diesem Fall zwischen den Parallelschnitten für Laktat und Pyruvat nur ca. 20 μm lagen, wurden die entsprechenden digitalen Biolumineszenzbilder anhand der Stichkanäle und anderer eindeutiger Merkmale möglichst genau in Deckung gebracht. So wurden für Laktat und Pyruvat dieselben gewebespezifischen Areale ausgewertet. Für jeden Punkt des jeweiligen Bildes wurde der Gehalt von Pyruvat und Laktat mit Hilfe der entsprechenden Kalibrierungen berechnet. Aus diesen Werten erfolgte die Berechnung des

L/P-Verhältnisses für jeden Bildpunkt. Ausgehend von diesem „Textbild“, das die Quotienten für jede XY-Koordinate enthielt, wurde ein Graustufenbild erzeugt. Dieses konnte analog zur Pyruvat- und Laktatdarstellung in Falschfarben kodiert werden.

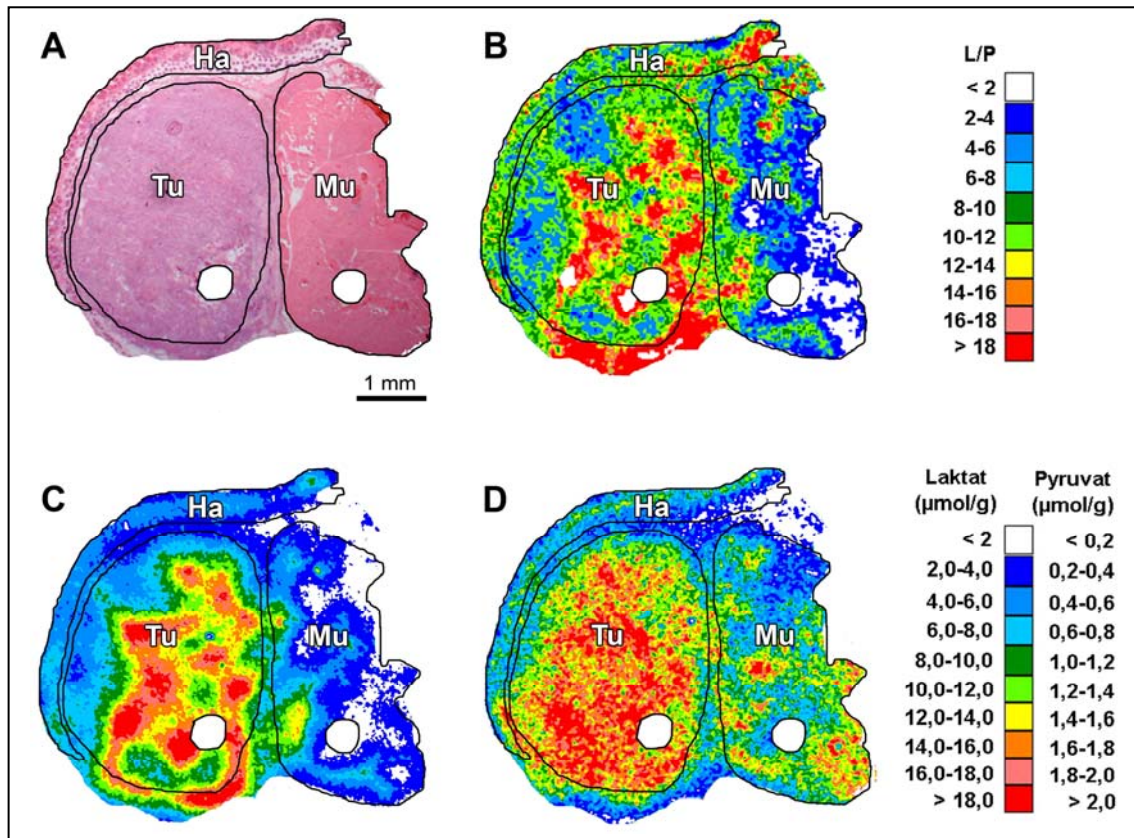


Abbildung 3-24: Erzeugung einer L/P-Karte in Falschfarben aus korrespondierenden Laktat- und Pyruvatverteilungen in einem humanen xenotransplantierten Karzinom der Kopf-Hals-Region (HNSCC).

Parallelschnitte von (A) HE, (C) Laktat und (D) Pyruvat. (B) zeigt die aus (C) und (D) erstellte L/P-Karte. Falschfarbenkodierte Konturen für die strukturassoziierte Auswertung definierter Areale innerhalb des Xenotransplantats sind eingezeichnet. Der für jede Farbe definierte Gehaltsbereich der Metabolite ist in der Farbskala rechts unten angegeben. Die Skala für die L/P-Verhältnisse ist rechts oben gezeigt. Abkürzungen: Ha = Haut, Mu = Muskel, Tu = Tumor.

Abbildung 3-24 zeigt die via Biolumineszenz ermittelte räumliche und quantitative Darstellung der Metabolite Laktat und Pyruvat von aufeinander folgenden Kryoschnitten eines HNSCC-Xenotransplantats und die daraus resultierende L/P-Karte. Wie für die einzelnen Stoffwechselprodukte ist es auch hier möglich, das L/P-Verhältnis in gewebespezifischen Arealen zu ermitteln und darzustellen. Mit Hilfe des HE-gefärbten Parallelschnittes konnte eine gewebsspezifische Auswertung am gezeigten Xenotransplantat vorgenommen werden. So konnte das vitale humane Tumorgewebe (Tu) unabhängig von angrenzenden, aus der Maus stammenden Gewebstypen wie Muskel (Mu) oder Haut (Ha) analysiert werden. Der

prozentuale Anteil des vitalen Tumorgewebes am Gesamtschnitt lag bei 45 %, der für Muskelgewebe bei 28 % und für Haut bei 10 %. Sowohl die Metabolitgehalte als auch die L/P-Verhältnisse sind in Falschfarben dargestellt. Die dazu korrespondierenden statistischen Analysen in Form von Häufigkeitsverteilungen von Laktat, Pyruvat und L/P innerhalb der gekennzeichneten Areale sind in Abbildung 3-25 dargestellt.

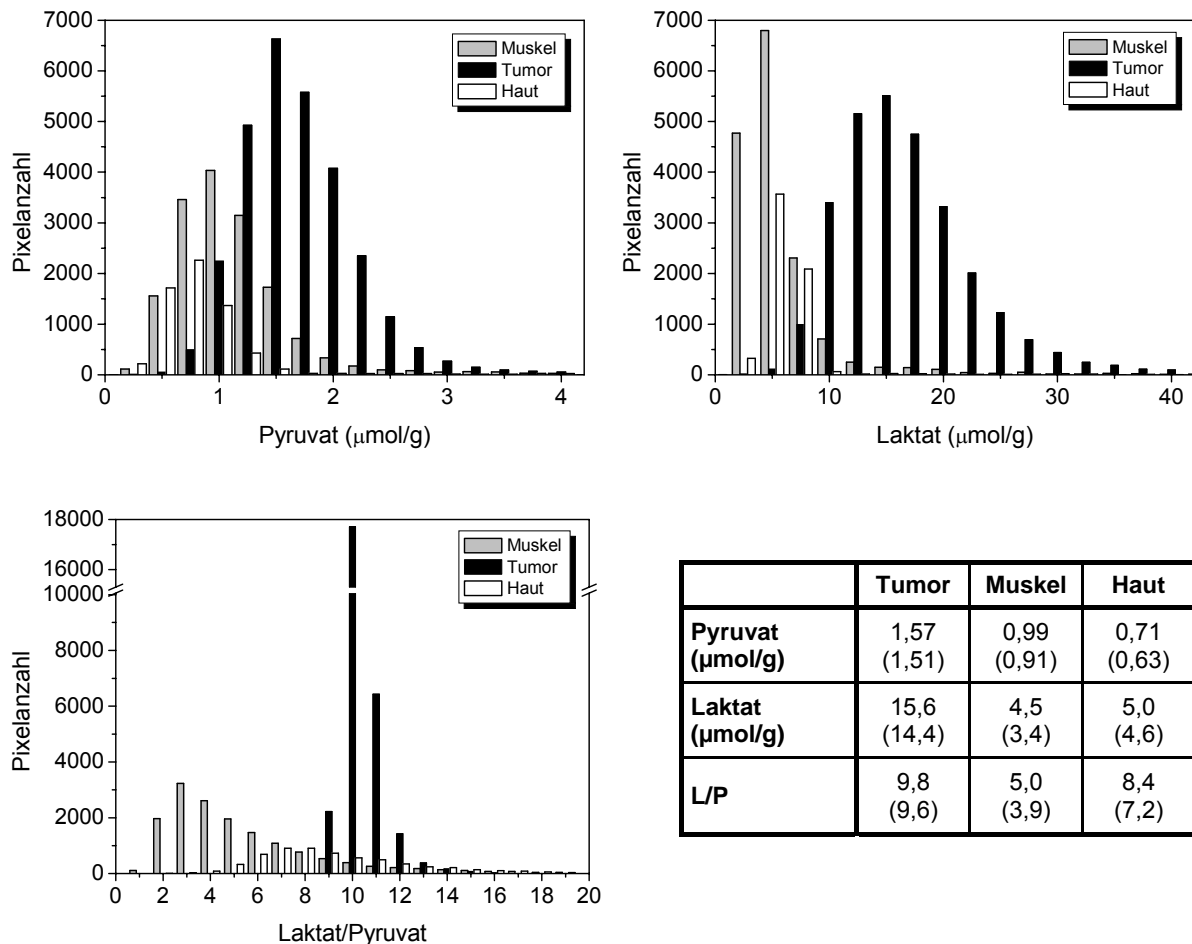


Abbildung 3-25: Statistische Auswertung der in Abbildung 3-24 gekennzeichneten Areale (Tu, Mu, Ha).

Häufigkeitsverteilungen für die Metabolite Laktat und Pyruvat in µmol/g und für die daraus resultierenden L/P-Verhältnisse. In der Tabelle rechts unten sind die Mittelwerte (und Mediane in Klammern) der Metabolite bzw. das L/P-Verhältnis innerhalb des angegebenen Gewebeareals dokumentiert. Grau: Muskelgewebe; weiß: Haut; schwarz: vitales Tumorgewebe.

Aus beiden Abbildungen geht hervor, dass Laktat und Pyruvat im Tumorgewebe des hier dargestellten Xenotransplantats höher konzentriert sind und über einen größeren Wertebereich verteilt vorliegen als im angrenzenden Muskelgewebe und der Haut. Auch das Verhältnis von Laktat zu Pyruvat ist im vitalen Tumorgewebe wesentlich höher als im Normalgewebe. Interessanterweise ist der Streubereich hier aber erheblich schmalere als in Haut und

Muskel. Im Vergleich zu Referenzangaben im Blut (siehe Abschnitt 1.2) liegen die Werte für Laktat und Pyruvat insgesamt sehr hoch. Dagegen sind die Werte für das L/P-Verhältnis in allen Gewebetypen im normalen Bereich.

4 Diskussion

Im Vordergrund dieses Abschnitts steht die methodische Diskussion der neu etablierten Pyruvat-abhängigen Biolumineszenz. Dabei sind neben den biochemischen Vorgängen der Reaktionen die Möglichkeit zur Kalibrierung sowie die Reproduzierbarkeit von Messungen und der experimentelle Aufwand wichtig. Des Weiteren werden die apparativen Möglichkeiten, insbesondere im Vergleich zu den anderen hier gezeigten Nachweismethoden und mit weiteren bildgebenden Verfahren diskutiert. Außerdem werden die Ergebnisse der Pyruvatbestimmung an Beispielen von Xenotransplantaten und Humanbiopsien bewertet. Interessant hierbei sind Fragen nach der Verwendung von Pyruvat als prognostischem Faktor in der Tumortherapie und der praktischen Durchführbarkeit von Biolumineszenzmessungen im klinischen Routinebereich.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Biolumineszenzmethode

4.1.1.1 Die Reaktionslösung für den Pyruvatnachweis

Die Basisreaktion der Bestimmung von Pyruvat mittels Biolumineszenz wurde, ausgehend vom Testprotokoll der Firma Sigma, soweit modifiziert, dass eine möglichst hohe Extinktion bei 340 nm (Entstehung von $\text{NADH}+\text{H}^+$) erzielt wurde. Die Bildung von $\text{NADH}+\text{H}^+$ war proportional zur eingesetzten Pyruvatmenge (siehe Abbildung 3-5). Bei der Biolumineszenzreaktion knüpft sich an $\text{NADH}+\text{H}^+$ als Substrat die NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase- und anschließend die Luziferasereaktion an (siehe Abbildung 2-5). Da die PDH auch durch ihre Endprodukte gehemmt wird, wurde versucht, das bei der Reaktion entstehende Acetyl-CoA mit Hilfe der Carnitin-Acetyltransferase wieder in CoA umzuwandeln, welches wiederum als Cosubstrat mit in die Reaktion eingehen kann. Abbildung 3-4 (*Test D*) zeigt allerdings, dass dieser Versuch keinen Vorteil gegenüber dem Ansatz ohne Carnitin-Acetyltransferase brachte.

Die an der Bestimmung von Pyruvat beteiligten Enzyme haben verschiedene Temperatur- und pH-Optima. Diese liegen für die aus *Sus scrofa* verwendete PDH bei 40 °C und einem pH-Wert von 6,5–7,5 (Hamada et al., 1976). Für die Messung mit $\text{NADH}+\text{H}^+$ als Substrat für die NFO werden ein pH-Wert von 8,5 und eine Temperatur von 22 °C verwendet, wobei dieses Enzym auch bei 50 °C noch seine volle Aktivität beibehält (Inouye, 1994; Nefsky und DeLuca, 1982). Für die Luziferasereaktion werden Messbedingungen von 23 °C bzw. 25 °C bei einem pH-Wert von 7,0 angegeben (Inlow und Baldwin, 2002; Low und Tu, 2002). Als Kompromiss aus diesen Angaben wurden für die Pyruvatbestimmung via Biolumineszenz ein pH-Wert von 7,4 und eine Messtemperatur von 30 °C gewählt. Variationen dieser Bedingun-

gen bezüglich der Lichtausbeute wurden aus Kostengründen nicht getestet. Es ist jedoch bekannt, dass diese Faktoren die Lichtintensität beeinflussen (Strehler und Cormier, 1953). Mit den von der Firma Roche angegebenen Mengen an einzusetzender NFO und Luziferase für die Biolumineszenzreaktion waren nur sehr geringe Lichtausbeuten mit Pyruvat als Substrat zu erzielen. Aus diesem Grund wurden höhere Enzymkonzentrationen gewählt (3 U/ml für die NFO und 15 mU/ml für die Luziferase). Diese brachten eine entscheidend höhere Lichtausbeute. Eine weitere Erhöhung der Konzentrationen dieser Enzyme erwies sich jedoch als nicht vorteilhaft (siehe Abbildung 3-9 im Vergleich zu Abbildung 3-10). Der kleinste unterscheidbare Gehalt für die Pyruvat-abhängige Biolumineszenz lag bei $0,02 \mu\text{mol/g}$, die kleinste nachweisbare Menge bei $0,04 \text{ pmol}$ Pyruvat. Eine Erhöhung der spezifischen Lichtausbeute wäre eventuell durch eine veränderte Zusammensetzung der Reaktionslösung möglich. Dies würde es erlauben, kleinere Stufen zu unterscheiden und insgesamt geringere Mengen Pyruvat zu detektieren und damit die Messgenauigkeit erhöhen. Da die Enzymelösungen ohnehin schon sehr kostenaufwändig waren, wurden hierzu keine weiteren Experimente vorgenommen.

Die Biolumineszenzreaktion basiert auf der Oxidation von FMNH_2 und einem langkettigen Aldehyd. Hastings et al. (1963a) zeigten, dass die Länge der Aldehyde, die der Luziferase als Substrat dienen, die Stärke der Lichtemission beeinflussen. Bei Verwendung von Aldehyden mit 12, 13 oder 14 Kohlenstoffatomen zeigten sich höhere Lichtintensitäten als bei solchen mit weniger C-Atomen (Hastings et al., 1963b). Das hier verwendete Decanal hat zehn Kohlenstoffatome. Durch Ersetzen dieses Aldehyds durch ein längerkettiges könnte also die Lichtintensität sehr wahrscheinlich erhöht werden. Aus Zeitgründen wurde dem aber nicht nachgegangen.

Essentiell für die Biolumineszenzreaktion ist molekularer Sauerstoff. Durch die Größe der Messkammer und des darin enthaltenen Volumens der Enzymlösung kann unter Umständen der Sauerstoffgehalt ein limitierender Faktor für die Reaktion sein. Daher ist es wichtig, das Integrationszeitfenster nicht zu weit in spätere Zeitbereiche zu verschieben, da dann eventuell nicht mehr genügend Sauerstoff für die Reaktion vorhanden ist. Eine Vergrößerung der Messmulde wäre möglich, würde aber eine Erhöhung des einzusetzenden Messvolumens bedeuten, was wiederum die Kosten pro Messung erhöhen würde.

Wie schon oben erwähnt, spielen bei der Lichtausbeute die gewählte Inkubationszeit sowie das Zeitfenster zur Integration eine große Rolle. Für die Pyruvatmessungen erwiesen sich Inkubationszeiten von 10 Sekunden als vorteilhaft, da die Reaktion schnell ihr Maximum erreichte. Eine Verlängerung der Messzeit resultierte zwar in höheren Lichtintensitäten, zu lange Messzeiten erwiesen sich jedoch als ungünstig, da sich das bei der PDH-Reaktion gebildete CO_2 gleichmäßig in Form von kleinen Blasen in der Messkammer ansammelte und dadurch Artefakte in Form von Reflektionen entstanden. Darüber hinaus verschlechtert eine zu

lange Integrationszeit die regionale Auflösung durch Substratdiffusion (Levin et al., 2003; Mueller-Klieser et al., 1988). Diese könnte durch Erhöhung der Viskosität der Reaktionslösung durch Polyvinylpyrrolidon oder Gelatine bei Messungen bei ca. 10 °C reduziert werden (Mueller-Klieser und Walenta, 1993). Levin et al. (2003) fanden dabei allerdings eine zu erwartende Reduktion der Lichtemission durch niedrigere Enzymaktivitäten und zudem eine erhöhte methodische Schwankung.

Wie in Abbildung 3-12 gezeigt ist, hängt die Intensität der Biolumineszenz von der Metabolitmenge des Schnittes ab und nicht vom Metabolitgehalt pro Gramm Probenmaterial. Diese Schlussfolgerung konnte aus den Experimenten mit Biolumineszenzmessungen an Standards verschiedener Schnittdicken gezogen werden. Auch Schwickert (1995) und Levin et al. (2003) konnten dies beobachten. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Signalintensität wäre die Herabsetzung des elektronischen Schwellenwertes zur Registrierung der Photonen im Kamerasystem. Allerdings ist damit ein stärkeres Rauschsignal verbunden.

4.1.1.2 Die Kalibrierung der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzmethode

Kalibrierungen der Lichtintensitäten wurden an unterschiedlich präparierten Standards durchgeführt. Sowohl für die Standards, die mit Einbettmedium hergestellt wurden, als auch für solche, die aus Leberhomogenaten angefertigt wurden, stellte sich ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen eingehendem Pyruvatgehalt, welcher sogar über dem zu erwartenden physiologischen Bereich lag, und emittiertem Licht dar (siehe Abbildung 3-11). Gewebestandards wiesen in Mehrfachbestimmungen größere Abweichungen auf als Standards in Einbettmedium, die insgesamt eine homogenere Struktur zeigten. Angesichts dieser Tatsache und der sehr aufwändigen Präparation der Gewebekomponenten sind für die Kalibrierung Standards in Einbettmedium vorzuziehen.

Die Lagerung einer gebrauchsfertigen Reaktionslösung wäre insofern von Vorteil, da so nur eine einmalige Kalibrierung eines großen Reaktionsansatzes nötig wäre. Die Aufbewahrung eines gebrauchsfertigen Ansatzes erwies sich aber als nicht vorteilhaft, da die Lichtausbeute des Ansatzes trotz Lagerung im tiefgefrorenen Zustand (-20 °C oder -70 °C) nachließ. Vermutlich ist dies auf die PDH zurückzuführen, die in einer 50%igen Glycerinlösung geliefert wird und somit auch bei niedrigen Temperaturen nicht einfriert. Durch die Verdünnung im Reaktionsansatz für die Pyruvat-abhängige Biolumineszenz friert das Enzym in der Lösung jedoch schon bei wenigen Graden unter Null ein. Höchst wahrscheinlich wird dadurch die Aktivität der PDH beeinträchtigt. Eine Lagerung ohne PDH ist kritisch, da es wegen der sehr viskösen Lösung erschwert wird, an jedem Tag exakt gleiche Volumina zu pipettieren, was unter Umständen eine erneute Kalibrierung nötig machen würde. Aus diesem Grund wurde an jedem Messtag ein neues Reaktionsgemisch angesetzt, die optimale Inkubations- und Integrationszeit bestimmt und vor jeder Messreihe eine Kalibrierung durchgeführt.

4.1.1.3 Apparative Möglichkeiten und Ortsauflösung

Das hier verwendete System zur Registrierung der Biolumineszenz ist eine Kombination aus Multichannel-Plate (MCP) mit Phosphorschirm und CCD-Kamera (siehe Abbildung 2-3). Ein MCP hat eine begrenzte Lebensdauer und stellt damit ein kritisches Verschleißteil dar. Neuere Kamerasysteme zur Registrierung von Photonen arbeiten mit moderneren Technologien, bei denen ein MCP nicht mehr nötig ist. Es handelt sich dabei um gekühlte, so genannte „back illuminated“ CCD-Kameras, bei denen die Signalintegration unmittelbar auf dem Chip erfolgt. Durch die Kühlung auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird das Hintergrundrauschen stark reduziert, was wesentlich längere Expositionszeiten möglich macht. Neben einer größeren Sensitivität haben diese Systeme ein höheres räumliches Auflösungsvermögen. Die Ortsauflösung der Biolumineszenztechnik hängt außerdem entscheidend von Faktoren wie der mikroskopischen Vergrößerung, Lichtintensität, Schnittdicke der Probe, Messtemperatur und Substratdiffusion ab. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren ist bei der hier verwendeten apparativen Ausstattung eine lineare Ortsauflösung von ca. $10\text{-}100\text{ }\mu\text{m}$ möglich (Mueller-Klieser et al., 1988). Biopsien solider Tumoren und Xenotransplantate enthalten neben dem eigentlichen Tumorgewebe auch unterschiedliche Anteile anderer Gewebetypen wie z.B. Muskulatur, Haut oder Bindegewebe, das sich als Stroma in das Innere des Tumorgewebes ziehen kann. Größere Zellgruppen solcher Gewebeareale konnten ohne Probleme unter Zuhilfenahme des HE-gefärbten Parallelschnittes identifiziert und separat ausgewertet werden (siehe Abbildung 3-18 und 3-24). Eine Infiltration von Einzelzellen wie Makrophagen in ein Gewebe wird mit der hier verwendeten Apparatur jedoch nicht erkannt. Mit Hilfe der oben beschriebenen neueren Technologie könnte die Auflösung auf unter $10\text{ }\mu\text{m}$ und damit sogar auf subzelluläres Niveau gebracht werden.

4.2 Referenzmethoden und Wiederfindungsexperimente

4.2.1 Enzymatische photometrische Tests

Referenzmessungen an sauren Extrakten der Standards und Blindproben von Leberhomogenaten wurden unter anderem mit Hilfe der PDH-Reaktion als auch mit einer LDH-abhängigen Reaktion gemessen. Beide photometrischen Tests basieren auf der Absorption von NADH bei 340 nm , wobei beim PDH-abhängigen Test die Extinktionszunahme, beim LDH-abhängigen die Extinktionsabnahme registriert wird. Die Tests wurden sowohl für Standards als auch für Blindproben in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Viele Messungen konnten zeitgleich in 96-Well-Platten vorgenommen werden. Dabei wurden für jede Bestimmung $10\text{ }\mu\text{l}$ Probe benötigt, was im Vergleich zu anderen Referenzmethoden sehr wenig war. Der LDH-Test wies bei den Blindproben geringere Fehlerabweichungen auf als der PDH-Test (siehe Tabelle A5 im Anhang). Lediglich eine der zehn Proben zeigte in beiden Tests einen großen Fehler. Aus der Abbildung 3-15 geht hervor, dass beide Tests in Mehr-

fachbestimmungen sehr gut reproduzierbar waren. Extinktionsänderungen zwischen 0 und 0,1 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat spielten sich im Bereich der letzten von drei Nachkommastellen ab, so dass die kleinste unterscheidbare Gewebskonzentration hier auf 0,2 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat geschätzt wurde. Verglichen mit dem PDH-Test war der LDH-Test kostengünstiger und schneller anzusetzen. Daher würde letztgenannter in Zukunft als photometrische Referenzmethode dem PDH-Test vorgezogen werden.

4.2.2 Kolorimetrischer photometrischer Test

Der kolorimetrische Test basiert auf der Umwandlung von Pyruvat in ein Hydrazon, welches durch Erhöhung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich je nach anfänglicher Pyruvatmenge zu einem Farbumschlag von gelb bis braun führt. Die Messung bei 405 nm konnte auch hier in 96-Well-Platten mit je Dreifachbestimmungen vorgenommen werden. Pro Messung wurden dabei 20 μl des sauren Extrakts benötigt. Auch bei diesem Test waren die Extinktionsänderungen im unteren Bereich des Pyruvatgehalts sehr gering, weshalb hier ebenfalls der kleinste unterscheidbare Gehalt auf 0,2 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat geschätzt wurde. Der kolorimetrische Test war in Mehrfachbestimmungen sehr gut reproduzierbar und zeigte nur sehr geringe Streuungen (siehe Abbildung 3-16). Der Test wies in nur einer von zehn Blindproben einen größeren Fehler auf (siehe Tabelle A5 im Anhang). Insgesamt betrachtet war dieser Test am kostengünstigsten und am wenigsten zeitintensiv.

4.2.3 HPLC

Zur Messung von Pyruvat mittels HPLC diente eine Anionenaustauscher-Säule; die Elution der sauren Extrakte von Blindproben und Standards erfolgte mit 5 mM H_2SO_4 , die Detektion bei 210 nm. Die HPLC-Methode wies bezüglich der Blindproben die geringsten Fehlerabweichungen auf (siehe Tabelle A5 im Anhang). Die Streuung innerhalb von Mehrfachbestimmungen war bei diesem Test ebenfalls sehr gering (siehe Abbildung 3-14). Die HPLC war die sensitivste Methode zur Bestimmung von Pyruvat; die kleinste unterscheidbare Gehaltsstufe von Pyruvat wurde hier auf 0,002 $\mu\text{mol/g}$ geschätzt. Pro Messung wurden 50 μl Probe injiziert, was im Vergleich zu den anderen Referenzmethoden viel war. Da für eine Probe ein Lauf von mindestens 20 Minuten nötig war, erforderte diese Methode einen sehr hohen Zeitaufwand. Darüber hinaus mussten die Chromatogramme manuell ausgewertet werden, da die Pyruvatpeaks oft nur mit Hilfe einer Subaddition eindeutig identifiziert und ausgewertet werden konnten.

4.2.4 Biolumineszenzmethode

Die Messung der Schnitte der Standards und Blindproben von tiefgefrorenen Leberhomogenaten erfolgte gleichermaßen und wie in Abschnitt 2.8.3 beschrieben. Sieben der zehn gemessenen Blindproben ergaben eine Abweichung von $\leq 9\%$ vom eingesetzten Pyruvatgehalt. Die maximale Abweichung lag bei 15% (siehe Tabelle A5 im Anhang). Wie schon in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, ergaben Mehrfachbestimmungen von Leberhomogenaten grundsätzlich höhere Streuungen als Messungen von Standards in Einbettmedium. Dies liegt sehr wahrscheinlich an der sehr viel besseren Homogenität des Einbettmediums im Vergleich zu den Gewebepreparationen. Die Gewebekomponenten wurden jedoch angefertigt, um die Blindproben, die via Biolumineszenz gemessen wurden, direkt mit den Referenzmethoden vergleichen zu können. Es wurden also dieselben Proben mit verschiedenen Methoden analysiert. Einbettmedium eignet sich nicht für eine saure Extraktion. Verglichen mit den Referenzmethoden wird für die Biolumineszenzmethode nur eine sehr geringe Menge Probenmaterial – im Prinzip nur drei Gewebeschnitte für eine aussagekräftige Dreifachbestimmung – benötigt. Darüber hinaus liegt der entscheidende Vorteil gegenüber den anderen Methoden in der regionalen Auswertbarkeit, die es ermöglicht, gezielt definierte Gewebeareale separat auszuwerten. Bei solchen Methoden, bei denen Extrakte analysiert werden, wird immer nur ein Mittelwert aller Gewebeteile bestimmt. Damit ist das Ergebnis einer solchen Analyse sehr stark abhängig von der Zusammensetzung des Gewebes, z.B. wird ein hoher Nekroseanteil zu einem mittleren ATP-Gehalt führen, der deutlich unter dem Gehalt des vitalen Gewebeanteils liegt. Ein weiterer Vorteil der bildgebenden Biolumineszenzmethode ist, dass die Proben keiner chemischen Behandlung unterzogen werden müssen.

Tabelle 4-1: Vergleich der Methoden zur Bestimmung von Pyruvat.

	Photometrische Test			HPLC	Biolumineszenzmethode
	PDH-Test	LDH-Test	kolorimetrischer Test		
Geschätzter, kleinster unterscheidbarer Gehalt	0,2 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat	0,2 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat	0,2 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat	0,002 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat	0,02 $\mu\text{mol/g}$ Pyruvat
Reproduzierbarkeit	++	++	++	+++	++
Probenvolumen	10 μl	10 μl	20 μl	70 μl^*	1-3 Schnitte
Praktikabilität/Aufwand	0	+	++	-	-
Kostenfaktor	0	0	+	0	-

*Das Probenvolumen ergibt sich aus 50 μl Injektions- und 20 μl Überlaufvolumen.

Beurteilung: (-) ungünstig; (0) durchschnittlich; (+) gut; (++) sehr gut.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das neu entwickelte Verfahren der Biolumineszenz-basierten Pyruvatbestimmung der Heterogenität von Gewebeproben, speziell solider Tumoren, gerecht wird. Es erlaubt eine strukturbezogene Messwerterfassung mit hoher optischer Auflösung. Auch die Bestimmung absoluter Gehalte ist möglich. Damit können statistische Vergleiche zwischen unterschiedlichen Tumorproben durchgeführt werden.

Tabelle 4-1 fasst die wichtigsten Aspekte aller hier verwendeten Methoden zur Bestimmung von Pyruvat zusammen.

4.3 Vergleich der Biolumineszenzmethode mit anderen bildgebenden Verfahren

Neben der hier vorgestellten Biolumineszenztechnik können auch über andere bildgebende Verfahren, wie z.B. mit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder der Kernresonanzspektroskopie (NMR, MRS bzw. MRI, d.h. Nuclear Magnetic Resonance, Magnetic Resonance Spectroscopy bzw. Magnetic Resonance Imaging), Rückschlüsse auf den Glukosemetabolismus im Gewebe gezogen werden. Beide Methoden sind im Gegensatz zur hier vorgestellten Biolumineszenztechnik sogenannte nicht-invasive Verfahren. Sie unterscheiden sich außerdem in der Art der Visualisierung des Glukosestoffwechsels. Mittels PET wird lediglich die Aufnahme von Glukose in ein Gewebe erfasst, wohingegen mit Hilfe der NMR – wie auch mit der Biolumineszenztechnik – die regionale Verteilung von Metaboliten bestimmt und quantifiziert werden kann.

Die Glukoseaufnahme mittels PET wird beispielsweise in Geweben wie Gehirn oder Tumoren *in vivo* gemessen. Dies wird mit Hilfe des Glukoseanalogons ^{18}F -Fluorodeoxyglukose (^{18}F -FDG) ermöglicht, welches dem Patienten injiziert und von den Zellen genau wie Glukose aufgenommen wird, obwohl an einer Stelle des Moleküls eine Hydroxylgruppe durch das Radionuklid ^{18}F ersetzt ist. Da ^{18}F -FDG nach der Phosphorylierung durch die Hexokinase nicht weiter verstoffwechselt wird, findet eine Anreicherung in der Zelle statt. Anhand des Zerfalls von ^{18}F kann FDG nachgewiesen werden. Die Verteilung von FDG im Körper erlaubt Rückschlüsse auf den Glukosestoffwechsel. Dementsprechend wird bei erhöhter Glykolyserate FDG im Gewebe angereichert. Außerdem korreliert eine vermehrte intrazelluläre Anreicherung mit einer Überexpression von Glukosetransportern, über welche Glukose bzw. FDG in die Zelle aufgenommen wird. Ebenso konnte gezeigt werden, dass auch eine hypoxische Umgebung eine erhöhte Aufnahme in das Zellinnere bewirkt. Da eine Reihe maligner Tumoren eine erhöhte Glykolyserate oder Überexpression des genannten Transporters aufweist, kann PET in diesem Fall zur Detektion und Visualisierung dieser Tumoren oder zum Staging einschließlich Metastasensuche und nachfolgender Therapieentscheidung genutzt werden (Stephen und Gillies, 2007).

Die NMR ist eine spektroskopische Methode, die auf dem Vorhandensein eines Eigendrehimpulses (des Spins) eines Atomkerns und damit verbunden der magnetischen Wechselwirkung von Atomkernen mit äußeren Magnetfeldern, mit der Wechselwirkung der Kerne untereinander, mit der Wechselwirkung der Elektronenhülle des eigenen Atoms und der Elektronen der gesamten benachbarten Atome beruht. Dabei können unterschiedliche Metabolite aufgrund ihrer chemischen Verschiebung („chemical shift“) identifiziert und quantifiziert werden. Eine genaue Beschreibung des Verfahrens zur Bildgebung von Laktat findet sich in He at al. (1995). Mittels NMR können *in vivo* Prozesse im lebenden Organismus untersucht werden, ohne dabei in den Zellstoffwechsel einzugreifen. Von besonderem Interesse ist hierbei die Aufklärung von Vorgängen im Gehirn, im Herzen, in den Muskeln und in anderen Organen.

Die vorgestellten bildgebenden Verfahren weisen wesentliche Unterschiede im Auflösungsvermögen auf. Während PET und NMR eine Auflösung von wenigen Millimetern (bis hin zu ca. 1 mm in kleinen Tier-PETs) zulassen, erlaubt das Biolumineszenzverfahren eine regionale Ortsauflösung von ca. 10-100 μm (Mueller-Klieser et al., 1988). Ein weiterer Vorteil der Biolumineszenzmethode ist, dass durch entsprechende Kalibrierungen absolute Konzentrationen bestimmt werden können. Die untere Nachweisgrenze für Laktat liegt hier bei ca. 0,4 pmol ausgehend von einem 1 cm^2 großen Gewebeschnitt mit einer Dicke von 20 μm , wohingegen im NMR Laktat in Konzentrationen < 4 mM nur schwierig nachzuweisen und zu quantifizieren ist (Cross et al., 1993). So können mit letzterem Verfahren nur pathophysiologisch erhöhte Laktatspiegel detektiert werden. Oft wird hier statt einer absoluten Quantifizierung lediglich die An- bzw. Abwesenheit dieses Metabolits bestimmt (Lin et al., 2003a).

Die NMR-Technik erlaubt die gleichzeitige Darstellung von z.B. Laktat, Glukose, Glutamat, Kreatin und Lipiden. Die Biolumineszenztechnik macht neben den hier vorgestellten räumlichen Quantifizierungen von Pyruvat, Laktat und ATP auch diese für Glukose, Sukrose, Glykogen und GSH möglich (Borisjuk et al., 2002; Levin et al., 2003; Mueller-Klieser und Walenta, 1993; Romero und Mueller-Klieser, 1998).

Einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Biolumineszenztechnik bieten sowohl NMR als auch PET aufgrund der nicht-invasiven Eigenschaften in der Verwendung als Screening-Verfahren oder zur Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen. Zudem können mittels NMR viele Metabolite gleichzeitig in derselben Probe erfasst werden.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

4.4.1 Literaturdaten zur Pyruvatkonzentration in humanen Geweben

Bei der Bestimmung von Pyruvat in Blutproben wird die Konzentration des Metabolits in arteriellem und femoralvenösem Blut unterschieden. Bei körperlicher Ruhe liegen die Pyruvatkonzentrationen bei gesunden Menschen für arterielles Blut bei ca. 0,1 mM und für femoral-

venöses bei ca. 0,08 mM (Keul et al., 1972). Nach körperlicher Anstrengung können Konzentrationen von ca. 0,4 mM Pyruvat im Blut erreicht werden (Sahlin et al., 1976). Messungen von Pyruvat in Cerebrospinalflüssigkeit gesunder Menschen ergaben für Pyruvat Konzentrationen von 0,067-0,141 mM (Vamosi et al., 1983). Im humanen Skelettmuskel liegt der Pyruvatgehalt in Ruhe bei 0,4 $\mu\text{mol/g}$ Gewebe, während bei körperlicher Anstrengung (Ergometrie) Pyruvat auf 0,71 $\mu\text{mol/g}$ ansteigt. In der Erholungsphase wurden sehr hohe Pyruvatwerte von bis zu 1,51 $\mu\text{mol/g}$ gemessen (Sahlin et al., 1976). In Abbildung 4-1 ist die Bestimmung von Pyruvat im Skelettmuskel (Ratte, in Ruhe) mit Hilfe der neu entwickelten Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzmethode im Vergleich zu Literaturdaten für humane Muskelbiopsien (in Ruhe[#] bzw. während* oder nach** körperlicher Anstrengung) gezeigt. Der in Rattenmuskeln ermittelte Pyruvatgehalt liegt im Bereich von Literaturdaten, die in humanen Skelettmuskeln zu finden sind.

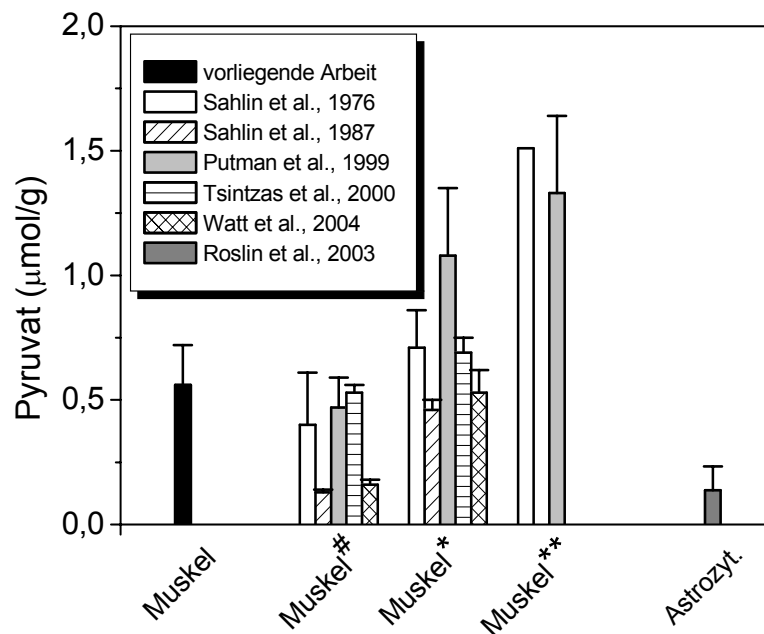


Abbildung 4-1: Pyruvatbestimmung im Rattenmuskel und Vergleich mit Literaturdaten.

Pyruvat wurde mit Hilfe der neu entwickelten Biolumineszenzmethode im Skelettmuskel der Ratte bestimmt (schwarzer Balken; $n = 12$). Literaturangaben aus Biopsien humaner Skelettmuskeln (Muskel[#], $n = 7, 11$ oder 12), während (Muskel*, $n = 7, 11$ oder 12) oder nach (Muskel**, $n = 7, 11$ oder 12) körperlicher Anstrengung. Des Weiteren sind Daten von humanen Astrozytomen ($n = 15$) gezeigt.

Über den Pyruvatgehalt in humanen soliden Tumoren ist bislang nur sehr wenig bekannt. Mikrodialysmessungen an Patienten mit Astrozytomen zeigten Pyruvatkonzentrationen von 0,09-0,21 mM. Dabei treten L/P-Ratios von bis zu 100 auf (Roslin et al., 2003). Verglichen mit den Referenzdaten waren die Pyruvatwerte der xenotransplantierten HNSCC ähnlich wie

in Muskeln während körperlicher Anstrengung bzw. anschließender Regenerationsphase. Die Pyruvatwerte in den untersuchten HNSCC-Humanbiopsien lassen sich mit dem durchschnittlichen Gehalt von Pyruvat in Muskelgewebe bei körperlicher Ruhe vergleichen. Die Ergebnisse hierzu werden im Folgenden diskutiert.

4.4.2 Pyruvat- und Laktatbestimmungen in Xenotransplantaten

In je sechs bis zwölf HNSCC-Xenotransplantaten von insgesamt acht Tumorlinien wurde der Pyruvatgehalt mit Hilfe der hier entwickelten Methode gemessen. Somit konnte das neue Verfahren bereits an einem Kollektiv von insgesamt 70 Implantationstumoren eingesetzt werden. Gemittelt über alle Xenotransplantate lag der Gehalt von Pyruvat im vitalen Tumorgewebe bei $1,24 \pm 0,20 \mu\text{mol/g}$. Dieser Wert liegt um ein Vielfaches (ca. 9fach) über den in der Literatur zu findenden Daten zu humanen Tumoren (siehe oben). Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich bei der Studie von Roslin et al. (2003) um humane Gliome (Astrozytome) handelt und nicht um Plattenepithelkarzinome, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Außerdem wurde in der genannten Studie Pyruvat mit Hilfe der Mikrodialyse gemessen. Diese Methode kann ausschließlich extrazellulär vorkommende Metabolite erfassen. Die Messung mit der Biolumineszenzmethode unterscheidet nicht explizit zwischen extra- und intrazellulär vorkommende Metaboliten. Es ist weiterhin zu beachten, dass es sich bei dem Material der vorliegenden Arbeit um Experimentaltumoren handelt, die auf Nacktmäusen gezüchtet wurden. Der Einfluss des Mausstoffwechsels auf die Transplantate kann eventuell eine Rolle spielen. Der durchschnittliche Anteil von vitalem Tumorgewebe am Gesamtschnitt lag zwischen 24 % und 60 %. Bei der Entnahme der Xenotransplantate wurden allerdings nach Möglichkeit mit Absicht Anteile von z.B. Haut mit entnommen, um eine einfachere topografische Überlagerung zu gewährleisten. Alle acht Linien wiesen im Durchschnitt um 21 % höhere Pyruvatwerte innerhalb des Tumorgewebes im Vergleich zur gesamten Gewebefläche auf, was entweder auf eine gesteigerte Glykolyserate innerhalb des Tumors hindeutet oder auf eine verminderte Pyruvatverwertung. Letzteres könnte z.B. durch eine verminderte PDH-Aktivität (z.B. durch gesteigerte PDK-Aktivität oder Defekte des PDH-Enzyms), durch mitochondriale Defekte oder durch Sauerstoffmangel verursacht werden (siehe unten). Durch das daraus resultierende erhöhte Pyruvatangebot kann mehr Laktat produziert werden. Dies stimmt mit den von V. Quennet ermittelten Laktatwerten überein. Sie lagen im Mittel bei $16,1 \mu\text{mol/g}$ und – mit Ausnahme von einer Tumorlinie (XF354) – deutlich im Bereich der so genannten Hochlaktattumoren (Quennet et al., 2006; Quennet, 2007).

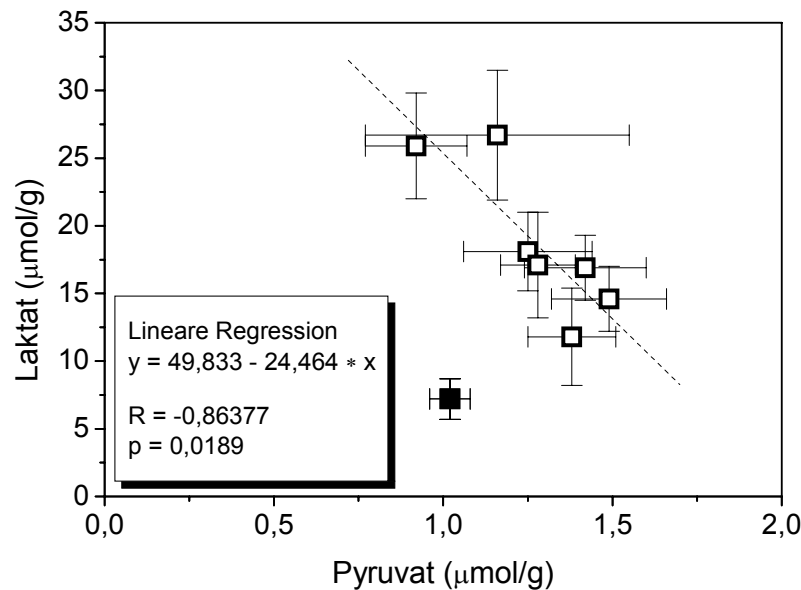


Abbildung 4-2: Laktat als Funktion von Pyruvat in acht Linien von humanen HNSCC-Xenotransplantaten.

Bei sieben von acht Xenotransplantatlinien zeigte sich ein signifikanter inverser Zusammenhang zwischen mittlerem Laktat- und Pyruvatgehalt. Schwarz ausgefüllt dargestellt ist XF354; diese Tumorklinie zählt nach Quennet et al. (2006) als einzige der acht untersuchten Tumorklinien zu den „Niedriglaktattumoren“. Eine lineare Anpassung der übrigen sieben „Hochlaktattumor“-Linien ergab: $y = 49,833 - 24,46 * x$ mit $R = -0,83677$ und $p = 0,0189$.

Abbildung 4-2 zeigt den mittleren Laktatgehalt in Abhängigkeit des mittleren Pyruvatgehalts im vitalen Tumorgewebe der gemessenen Xenotransplantate. Mit Ausnahme des Niedriglaktattumors XF354 (schwarz ausgefüllt) ergab sich eine signifikante inverse Korrelation mit $R = -0,83677$ und $p = 0,0189$ zwischen diesen beiden Parametern. Allerdings ist hierbei der sehr schmale Bereich der Pyruvatverteilung über die verschiedenen Linien zu beachten. Dies erklärt die Tatsache, dass das L/P-Verhältnis bei den hier untersuchten HNSCC-Xenotransplantaten maßgeblich vom Laktatgehalt selbst bestimmt wurde. Daher zeigte sich auch ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen L/P-Verhältnis und Laktat (siehe Abbildung 3-21).

Die insgesamt hohen Laktatwerte der Xenotransplantate weisen auf eine hohe Umsatzrate von Pyruvat hin. In Bezug auf den ebenfalls sehr hohen durchschnittlichen Pyruvatgehalt ($1,24 \mu\text{mol/g}$) deutet dies zum einen auf eine sehr hohe glykolytische Aktivität hin, zum anderen könnte die Verstoffwechslung durch die PDH gestört sein oder nur unzureichend funktionieren. Die L/P-Ratio lag im Mittel zwischen 7,2 und 27,3. Ausgehend vom physiologisch normalen Bereich zwischen 4 und 20, lagen nur die Tumorklinien Cal33 und UTSCC-5 mit 24,6 bzw. 27,3 im Mittel außerhalb dieses Bereichs. Bei beiden Linien lag Pyruvat unter dem Mittelwert aller Xenotransplantate, im Vergleich zu den übrigen wiesen diese beiden Linien die höchsten Laktatwerte auf. Diese Befunde deuten auf eine Kombination aus hoher glyko-

lytischer Aktivität und unzureichender PDH-Funktion hin. Letzteres könnte folgende Ursache haben: Lu et al. (2002) zeigten einen stabilisierenden Effekt von Pyruvat auf HIF-1 α *in vitro*. Letzteres wird unter Hypoxie stabilisiert und bildet durch Dimerisierung mit HIF-1 β das Heterodimer HIF-1 (siehe Abbildung 4-3). Dieser Transkriptionsfaktor stimuliert die Expression aller glykolytischer Enzyme, aber auch von Glukosetransportern wie z.B. GLUT-1 und GLUT-3 (Moreno-Sanchez et al., 2007; Semenza, 2007). Dies führt zu einem erhöhten glykolytischen Flux und damit zu einer verstärkten Produktion von Pyruvat, welches wiederum – insbesondere bedingt durch die Überexpression von LDH – zu einer gesteigerten Laktatanreicherung führt. Des Weiteren transaktiviert HIF-1 das Enzym PDK1 (Kim et al., 2006). Durch die erhöhte Aktivität dieses Enzyms kommt es zur Phosphorylierung der PDH und damit zur Inaktivierung dieses Enzymkomplexes. Folglich vermindert sich der Flux des Citratzyklus und damit auch der oxidativen Phosphorylierung. Da hierbei natürlicherweise ROS entstehen, wird auch deren Bildung reduziert, und die Zellen sind geringerem oxidativen Stress ausgesetzt. Abbildung 4-3 stellt die beschriebenen Zusammenhänge dar.

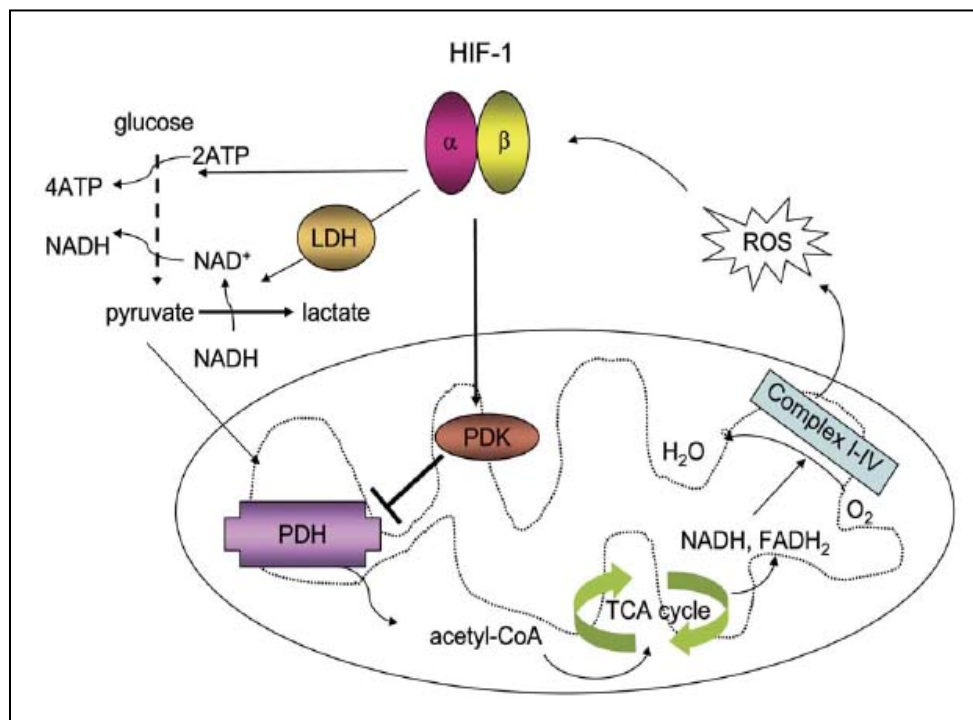


Abbildung 4-3: HIF-induzierte Weichenstellung zwischen Glykolyse und OXPHOS.

HIF-1 stimuliert die Expression glykolytischer Enzyme, was zu einer gesteigerten Glykolyserate und damit zur vermehrten Pyruvatproduktion führt. Durch die HIF-1-induzierte Überexpression von LDH kommt es zu einer erhöhten Laktatproduktion, wobei für die Glykolyse notwendiges NAD^+ regeneriert wird. Die Induktion von PDK1 durch HIF-1 führt zur Inaktivierung der PDH und damit zur Blockierung der Umwandlung von Pyruvat zur Acetyl-CoA. Dadurch vermindert sich die Rate des Citratzyklus, der oxidativen Phosphorylierung und der natürlichen Entstehung von ROS; nach Simon (2006). Abkürzungen: HIF = Hypoxie-induzierbarer Faktor, LDH = Laktatdehydrogenase, PDH = Pyruvatdehydrogenase, PDK = Pyruvatdehydrogenase-Kinase, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, TCA cycle = Citratzyklus.

Die Tumorxenotransplantate wurden durch unsere Kooperationspartner in Dresden bezüglich ihrer Strahlensensibilität (TCD_{50}) charakterisiert (Quennet et al., 2006; Yaromina et al., 2006; Yaromina et al., 2007). Die TCD_{50} (Tumor Control Dose 50 %) beschreibt die Strahlendosis (Gy), die notwendig ist, um 50 % eines Tumorkollektivs lokal zu kontrollieren. Dabei war von großer praktischer Relevanz, dass die Tumoren mit einem klinischen Fraktionierungsschema bestrahlt wurden, d.h. mit durchschnittlich 3 Gy pro Tag über vier Wochen. Die HNSCC-Tumorlinien wiesen TCD_{50} -Werte zwischen 45 Gy und 127 Gy auf (siehe Tabelle 2-1). Strahlensensibilität und ermittelte L/P-Verhältnisse der Linien wurden in Bezug gesetzt und sind in Abbildung 4-4 dargestellt. Wie sich herausstellte, konnte bei sieben der acht Tumorlinien ein sigmoider Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern gefunden werden. Die Linie UTSCC-45 (schwarz ausgefüllt), wurde nicht in die Berechnungen der in Abbildung 4-4 gezeigten Boltzmann-Anpassung einbezogen, da sie eine starke Immunogenität aufwies und sich daher von allen anderen untersuchten Tumorzellen grundsätzlich unterschied. Allgemein war die Strahlensensibilität immunogener Tumorlinien geringer als die nicht-immunogener Linien (Quennet, 2007).

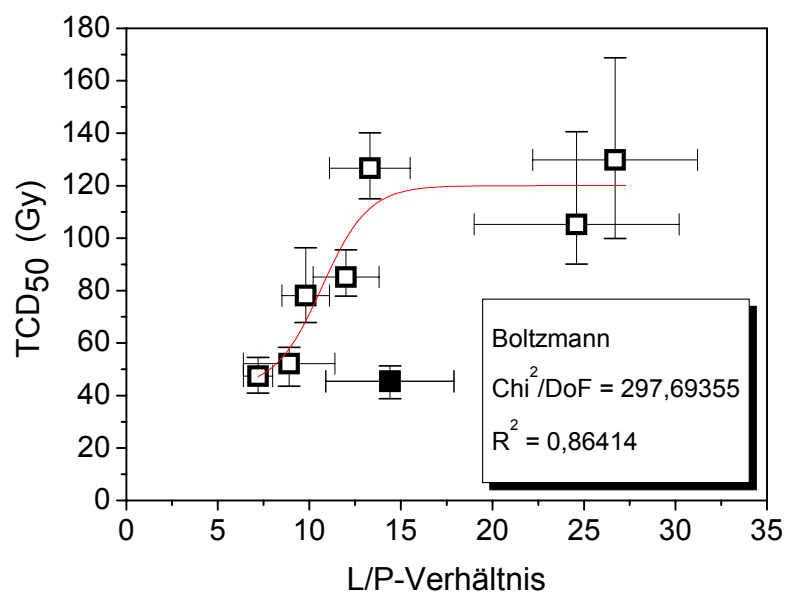


Abbildung 4-4: Strahlensensibilität (TCD_{50}) von xenotransplantierten humanen HNSCC als Funktion des L/P-Verhältnisses.

Mit Ausnahme der schwarz gefüllten, immunogenen Tumorlinie UTSCC-45 besteht ein sigmoider Zusammenhang (Boltzmann-Fit) zwischen der Strahlensensibilität und dem L/P-Verhältnis der Xenotransplantate. $TCD_{50} \pm KI$ aus mindestens $n = 50$; L/P: Mittelwerte $\pm SD$ aus mindestens $n = 6$.

Der Vergleich der TCD_{50} mit Pyruvat allein ergab keine Korrelation (nicht gezeigt). Jedoch zeigte sich eine signifikante lineare Abhängigkeit zwischen TCD_{50} und der Summe aus Laktat und Pyruvat (siehe Abbildung 4-5). Dieser Zusammenhang zwischen Strahlensensibilität

und Laktat und Pyruvat, aber auch zwischen TCD_{50} und dem L/P-Verhältnis, lässt sich durch die antioxidativen Eigenschaften von Pyruvat und Laktat erklären, die hauptsächlich auf deren Eigenschaft als Protonendonatoren beruht (Groussard et al., 2000; Mallet und Sun, 2003; Salahudeen et al., 1991). Wenn diese Metabolite im soliden Tumor stark erhöht sind, können mehr ROS neutralisiert werden, was dem Gewebe eine Resistenz gegenüber ROS-induzierender Bestrahlung verleihen kann. Zudem könnte eine Störung der PDH-Funktion zu einem insgesamt eher niedrigen Spiegel an ROS (schon vor Bestrahlung) im Gewebe führen (siehe Abbildung 4-3).

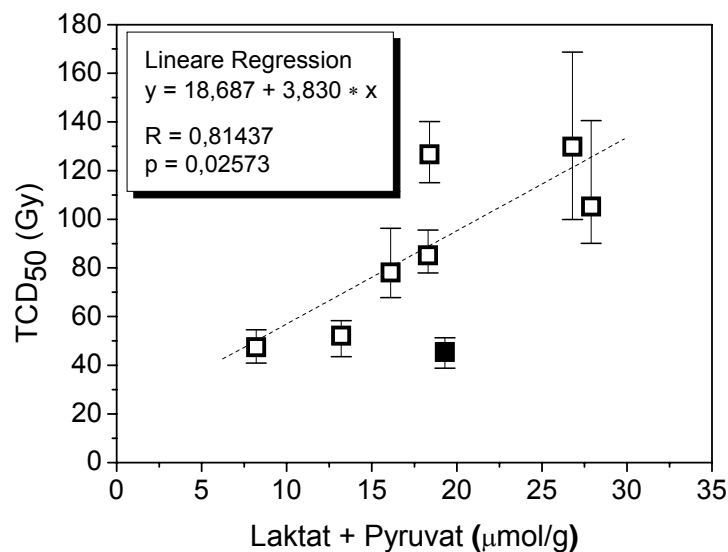


Abbildung 4-5: Strahlensensibilität (TCD_{50}) von xenotransplantierten humanen HNSCC als Funktion von der Summe aus deren Laktat- und Pyruvatgehalt.

Bei sieben von acht Xenotransplantatlinien zeigte sich ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen Strahlensensibilität und dem Gehalt von Laktat und Pyruvat in der Summe. Schwarz ausgefüllt dargestellt ist die immunogene Tumorklinie UTSCC-45, die nicht in die gezeigten Berechnungen einbezogen wurde.

Da die L/P-Ratio maßgeblich von Laktat bestimmt wurde, und dieser Metabolit in vergleichsweise hohen Konzentrationen vorlag, könnte bezüglich der antioxidativen Abwehr der Gehalt von Laktat allein bereits eine wesentliche Ursache für eine höhere Strahlenresistenz im Gewebe sein. Allerdings könnten die insgesamt auch hohen Pyruvatkonzentrationen zusätzlich insofern zur Strahlenresistenz beitragen, als dass sie strahleninduzierte Apoptosen durch antiapoptotischen Effekte reduzieren, und zwar durch verminderte Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien. Die Freisetzung von Cytochrom c führt zur Aktivierung der Caspase 3, was zur Fragmentierung von PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymerase) führt. Diese gilt als starker Indikator für die Apoptose (Mongan et al., 2002).

Ob die Beobachtung, dass der Pyruvatgehalt in allen Xenotransplantaten sehr ähnlich war, während Laktat große Unterschiede aufwies, nur in den hier untersuchten Experimentaltumoren festzustellen ist, oder ob es sich um eine „Entität-spezifische“ Eigenschaft handelt, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

4.4.3 Pyruvat- und Laktatbestimmungen in Humanbiopsien

Das neu etablierte Verfahren zur Pyruvatbestimmung an Gefrierschnitten wurde des Weiteren an sechs Humanbiopsien von Karzinomen der Kopf-Hals-Region angewandt. Der mittlere Pyruvatwert der hier untersuchten HNSCC-Humanbiopsien lag bei 0,41 $\mu\text{mol/g}$. Die Verteilung von Pyruvat innerhalb einer Tumorprobe war teilweise sehr heterogen. Verglichen mit den Xenotransplantaten waren die Pyruvatwerte um den Faktor 3,0 niedriger. Auch die Laktatwerte waren mit einem Mittelwert von 8,9 $\mu\text{mol/g}$ niedriger als die der Xenotransplantate. Nur der Tumor HF fällt mit einem Laktatwert von 21,2 $\mu\text{mol/g}$ in den Bereich der Hochlaktatumoren. Verglichen mit den übrigen Biopsien lag hier der kleinste Wert für Pyruvat vor, was auf eine hohe LDH-Aktivität hindeutet. Eine direkte Abhängigkeit des Laktatgehalts vom Pyruvatgehalt konnte nicht gefunden werden. Da aber auch hier Pyruvat in allen Proben durchschnittlich ähnliche Werte aufwies, wurde das L/P-Verhältnis stark vom Laktat beeinflusst, wodurch sich auch hier eine hoch signifikante lineare Korrelation dieser beiden Parameter ergab (siehe Abbildung 3-23). Die L/P-Quotienten lagen im Mittel zwischen 11,2 und 62,8. Aus den vorliegenden Patientendaten über Tumorgröße, Befall der Lymphknoten und Metastasierungsgrad ließen sich keinerlei Zusammenhänge zu Pyruvat, Laktat oder dem L/P-Verhältnis herstellen. Dies könnte an dem sehr kleinen Kollektiv liegen, das untersucht wurde. Da es keine Informationen über den Behandlungsplan/-erfolg gab, konnten keine Rückschlüsse auf die Strahlensensibilität in Bezug zu den Stoffwechselprodukten gezogen werden.

4.5 Erstellen von L/P-Karten

Eine möglichst genaue topographische Überlagerung von digitalen Bildern der Biolumineszenzmessungen ist nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich. Zum einen müssen die Kryoschnitte so beschaffen sein, dass sie eine möglichst einmalige histologische Struktur oder charakteristische Umrisse aufweisen. Ist dies nicht der Fall, kann man bei einer entsprechend großen Probe durch das Einbringen paralleler Stichkanäle an einer geeigneten Stelle der Biopsie die Überlagerung erleichtern. Zum anderen dürfen die zu überlagernden Bilder nur von Kryoschnitten stammen, die im Idealfall in direkter Schnittfolge erstellt wurden. Für die Zuordnung histologischer Strukturen sollte in jedem Fall ein angrenzender HE-gefärbter Kryoschnitt vorliegen. Sind diese Voraussetzungen erfüllt, ist es möglich, digitale

Bilder von Laktat- und Pyruvatbiolumineszenzen in Deckung zu bringen und für jede XY-Koordinate anhand der korrespondierenden Kalibrierungen der einzelnen Metabolite einen L/P-Quotienten zu berechnen. Durch Konvertierung der Textdaten in ein Graustufenbild und anschließender Zuordnung von Farben zu den L/P-Verhältnissen, kann die räumliche Verteilung dieser Ratio innerhalb eines Kryoschnittes dargestellt werden (siehe Abbildung 3-24).

Da es sich in einigen Fällen der Xenotransplantate um Nachschnitte (also nicht direkt in Serie geschnitten) der entsprechenden Tumorkontinuitäten handelte, waren hier keine Überlagerungen von Laktat und Pyruvat möglich. So wurden Laktat und Pyruvat separat ausgewertet und aus den mittleren Konzentrationen der L/P-Quotient gebildet. Es wurden also nicht zwangsläufig exakt dieselben korrespondierenden Flächenanteile der Kryoschnitte ausgewertet. Bei den restlichen Kontinuitäten war ausgehend vom Laktatschnitt im letzten Segment der Abstand zum ersten Pyruvatschnitt mindestens 50 µm. In wenigen Fällen, in denen es sich um eher homogene Xenotransplantate handelte, war trotzdem eine Überlagerung möglich. Allerdings kann man hier nicht mehr von einer „Pixel-zu-Pixel“-Überlagerung sprechen.

Die Humanbiopsien wurden so angefertigt, dass Laktat- und Pyruvatschnitt direkt aufeinander folgten. Aufgrund der unterschiedlichen Schnittdicken für die Messung dieser beiden Stoffwechselprodukte lagen hier nur ca. 20 µm zwischen den beiden Kryoschnitten (siehe Abbildung 2-1). Alle Biopsien wurden mit Hilfe der topographischen Überlagerung ausgewertet, so dass für Laktat und Pyruvat exakt dieselben Areale analysiert wurden. Die im Ergebnisteil angegebenen L/P-Verhältnisse wurden allerdings aus den über die Fläche gemittelten Werten von Laktat und Pyruvat berechnet, da sich in einigen wenigen Fällen eine hohe Abweichung der L/P-Werte, die anhand der L/P-Karte (also XY-Koordinaten für Laktat geteilt durch die für Pyruvat) ergaben. Die Unterschiede waren in wenigen Beispielen so groß, dass sie sich nicht durch einen Rundungsfehler bei der Mittelung der Flächenwerte erklären ließen. Wahrscheinlich lassen sich solche Diskrepanzen durch Rundungsfehler der Computersoftware oder auch eine ungenügende Präzision beim Überlagern der Schnittbilder erklären.

4.6 Kolokalisation von Laktat und Pyruvat

Die pixelgenaue („Pixel-zu-Pixel“) Überlagerung und damit Kolokalisation von X- und Y-Koordinaten zweier digitaler Bilder von Laktat- und Pyruvatverteilungen in Gewebeschnitten ermöglicht verschiedene Betrachtungen:

- i) Zunächst kann die vom Gehalt unabhängige Betrachtung des „reinen Vorkommens“ der Metabolite in Bildpunkten (XY-Koordinaten) erfolgen. Das (Nicht-) Vorhandensein von Überlappungen – also simultanem Auftreten – der Stoffwechsel-

- produkte wird als räumliches Muster qualitativ bildlich dargestellt. Dabei können mit Hilfe paralleler Strukturfärbungen definierte Gewebeareale betrachtet werden.
- ii) Ausgehend von der „Pixel-zu-Pixel“-Überlagerung der digitalen Laktat- und Pyruvatverteilungen (i) findet für jede XY-Koordinate anhand der entsprechenden Kalibrierungen die Berechnung der Laktat- und Pyruvatgehalte statt. Diese können für Korrelationsanalysen graphisch dargestellt werden. Biologische Hinweise auf den metabolischen Zustand des Gewebes oder auf Flussraten der Metabolite können hier gegeben sein.
 - iii) Ausgehend von den in (ii) berechneten Laktat- und Pyruvatwerten für jede XY-Koordinate kann schließlich der L/P-Quotient berechnet werden. Daraus lässt sich wiederum ein digitales Bild erzeugen, welches diese Verhältnisse räumlich in Form von L/P-Karten darstellt (siehe Abbildung 3-24 *B*). Wie auch in (i) kann hier mit Hilfe paralleler Strukturfärbungen die separate Betrachtung definierter Gewebeareale erfolgen.

Die HNSCC-Humanbiopsien wurden auf die oben beschriebenen Arten bezüglich der Kolo-kalisation von Laktat und Pyruvat untersucht. Die in Punkt (iii) beschriebene Kolo-kalisation von Laktat und Pyruvat in Form von L/P-Karten wurde im Ergebnis- und Diskussionsteil ausführlich beschrieben.

Unabhängig vom entsprechenden Gehalt wurde, wie in (i) beschrieben, das simultane Vor-kommen beider Metabolite in einem Bildpunkt überprüft. Abbildung 4-6 zeigt beispielhaft eine Probe (TR04, Schnittserie II) mit wenigen Stellen der Überlappung von Laktat und Pyruvat in einem Punkt und eine weitere (TR03, Schnittserie III) mit vielen Überlagerungspunkten. In (A) und (C) sind die Biolumineszenzintensitäten von Laktat (rot eingefärbt) und Pyruvat (grün eingefärbt) in Deckung gebracht. Die Pixel, in denen sowohl Laktat als auch Pyruvat (unabhängig von deren Gehalt) vorliegen, erscheinen dabei gelb und sind in (B) und (D) noch einmal separat dargestellt.

Es konnte kein einheitlicher Zusammenhang zwischen beiden Stoffwechselprodukten an korrespondierenden Ortskoordinaten im Tumorgewebe festgestellt werden. Sowohl Proben mit starker Kolo-kalisation – also hohen Flächenanteilen, in denen Laktat und Pyruvat zugleich vorlagen – als auch solche, in denen es fast keine Kolo-kalisation der beiden Metabolite gab, kamen vor. Der Grad der Kolo-kalisation war teilweise auch innerhalb einer Biopsie sehr unterschiedlich.

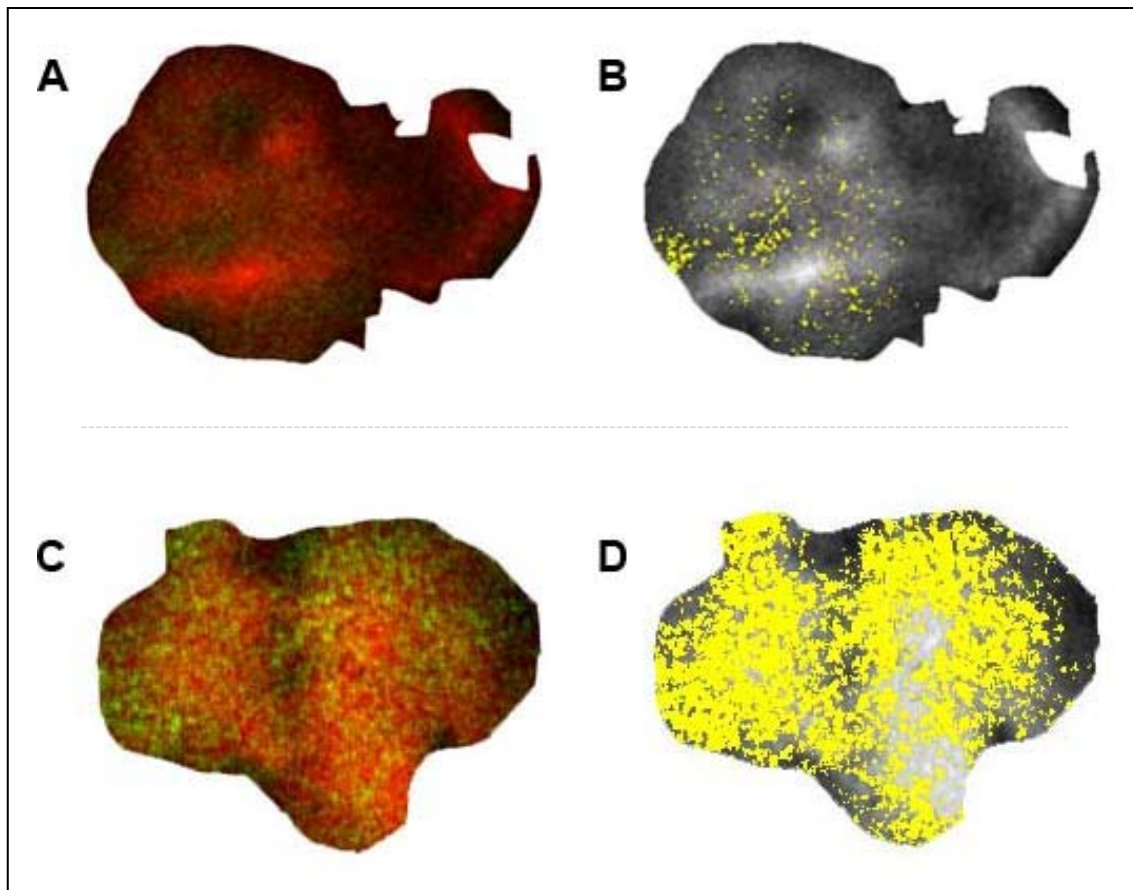


Abbildung 4-6: Bildliche Darstellung der Kolo-kalisation von Laktat und Pyruvat am Beispiel zweier HNSCC-Humanbiopsien.

An je einer Serie der Biopsie TR03 (A, B) bzw. TR04 (C, D) ist die Kolo-kalisation von Laktat und Pyruvat gezeigt. (A) und (C) zeigen die überlagerten Biolumineszenzbilder von Laktat (rot) und Pyruvat (grün). (B) und (D) zeigen in gelb die Pixel, in denen sowohl Laktat als auch Pyruvat lokalisiert sind.

Ausgehend von den „Pixel-zu-Pixel“-orientierten Bildern wurden die Kolo-kalisationen von Laktat und Pyruvat hinsichtlich des jeweiligen Gehalts wie in (ii) beschrieben graphisch dargestellt (siehe Abbildung 4-7).

In beiden Beispielen sind bei den niedrigeren Gehalten der Metabolite Punktwolken zu erkennen. Bei höheren Gehalten jedoch zeichnet sich ein linearer und positiver Zusammenhang zwischen beiden Stoffwechselprodukten ab, wobei dies in der Probe TR04 viel ausgeprägter ist als in TR03. Von insgesamt sechs Biopsien à vier Serien, also 24 Kolo-kalisationen, zeigten 18 Kolo-kalisationen dieses Phänomen, dessen Ausprägung zwischen den in Abbildung 4-7 gezeigten Beispielen lag. Für keine der Proben konnte ein bestimmter Laktat- oder Pyruvatwert definiert werden, ab dem der lineare Zusammenhang entstand. Jedoch ließen sich signifikante Unterschiede in der Steigung dieser Korrelationen erkennen. Dies kann auf mehrere Faktoren zurückgeführt werden. Da in Tumoren nachweislich die Expres-

sion der LDH erhöht ist, wird in Gleichung (G8) am Beispiel dieses Enzyms das Verhältnis von Laktat zu Pyruvat vereinfacht beschrieben.

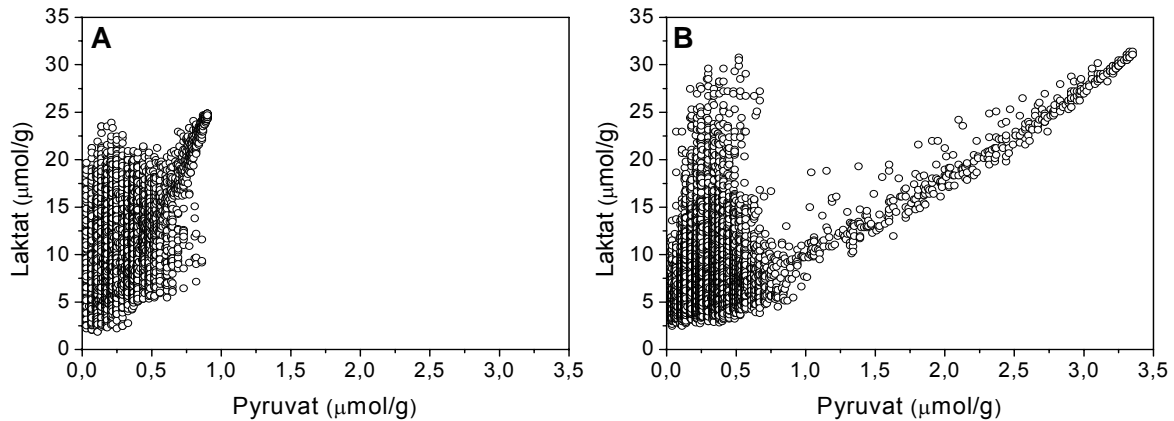


Abbildung 4-7: Graphische Darstellung der Kolo-kalisation von Laktat- und Pyruvatgehalten am Beispiel der in Abbildung 4-6 gezeigten Humanbiopsien.

Gezeigt sind die für jede XY-Koordinate vorliegenden Laktat- und Pyruvatgehalte für die in Abbildung 4-6 gezeigten Serien der Biopsie TR03 (A) bzw. TR04 (B). Es sind ausschließlich solche Bildpunkte gezeigt, in denen sowohl Pyruvat als auch Laktat nachweisbar waren ($> 0 \mu\text{mol/g}$).

Die Konzentrationen von Pyruvat als Substrat [P] und Laktat als Produkt [L] der LDH sind stark abhängig von der Expression und dem im Gewebe vorliegenden Anteil an aktivem Enzym $[E_{akt}]/[E_{total}]$. Des Weiteren spielen die Vaskularisierung und damit der Abtransport der Stoffwechselprodukte und auch deren Metabolisierung durch andere Enzyme eine große Rolle; diese Faktoren werden in Gleichung (G8) unter der Variablen „a“ zusammengefasst. Unter der Annahme, dass V_{max} und K_m -Werte im Tumorgewebe konstant sind, lässt sich für das L/P-Verhältnis folgende, sicherlich stark vereinfachte Gleichung herleiten:

$$(G8) \quad \frac{[L]}{[P]} = \frac{V_{max}}{a * K_m} * \frac{[E_{akt}]}{[E_{total}]}$$

Das L/P-Verhältnis hängt also entscheidend von Parametern wie Anteil von aktivem Enzym, V_{max} und K_m -Werten der LDH ab. Nicht zu vergessen ist der Faktor „a“, der neben dem Abtransport des Produkts Laktat die Aktivität anderer Pyruvat-abhängiger Enzyme, wie z.B. die der PDH, symbolisiert.

Bezogen auf die in Abbildung 4-7 gezeigten Kolo-kalisationen der Pyruvat- und Laktatgehalte könnte ein steiler linearer Zusammenhang zwischen Laktat und Pyruvat in den höheren Gehaltsbereichen für eine erhöhte LDH-Aktivität, ein flacher für eine stärkere PDH-Aktivität sprechen. Es zeigt sich, dass in diesen Bereichen der Laktatgehalt in direkter Abhängigkeit

des Pyruvatgehalts steht und hier hauptsächlich durch das Vorkommen und die Aktivität der LDH bestimmt wird. In Bereichen niedrigerer Metabolitvorkommen, in denen Punktwolken auftreten, scheint es, dass hier die oben aufgeführten Faktoren, die unter der Variablen „a“ zusammengefasst wurden, aus den vorliegenden Messdaten nicht näher charakterisiert werden können. Auch muss betont werden, dass die Reaktionsgleichungen, auf der Gleichung (G8) beruht, für intrazelluläre Laktatkonzentrationen gilt. Die vorliegenden Messdaten sind jedoch über intra- und extrazelluläre Gehalte gemittelte Werte.

In den untersuchten Proben gab es keinen Zusammenhang zwischen hoher lokaler Kolo-kalisation („reinem Vorkommen“ beider Metabolite) und Ausprägung des positiven linearen Zusammenhangs von Laktat und Pyruvat bei höheren Werten.

4.7 Ausblick

In einem derzeit bearbeiteten DFG-finanzierten Kooperationsprojekt unserer Arbeitsgruppe mit den Universitäten Dresden, München und Würzburg werden an sechs der hier untersuchten Xenotransplantatlinien (FaDu, SAS, UTSCC-5, -14, -15 und XF354) weitere Metabolitmessungen (ATP, Glukose, Laktat und Pyruvat) zusammen mit der Bestimmung der radiobiologisch hypoxischen Fraktion mittels Pimonidazol (pHF) und der strahlenbiologischen Charakterisierung anhand der TCD₅₀ vorgenommen. Dabei werden vor, während und gegebenenfalls nach Bestrahlung (klinisch relevantes, fraktioniertes Schema) die Tumoren entnommen und analysiert. Es werden von jeder Linie je zwölf Tumoren implantiert und von diesen zu fünf verschiedenen Zeitpunkten Schnitte aus je vier Segmenten hergestellt. Anhand dieses sehr großen Probenkollektivs können verlässliche Ergebnisse über die Zusammenhänge von Glykolyserate, Redoxstatus, Hypoxie und Strahlensensibilität erschlossen werden.

In einer weiteren größeren Studie sollten außerdem neben ATP- und Glukosemessungen sowohl Pyruvat- und Laktatbestimmungen an Humanbiopsien erfolgen und die L/P-Verhältnisse untersucht werden. Es soll geklärt werden, ob auch hier das L/P-Verhältnis vom Laktatgehalt bestimmt wird, ob die Laktatbestimmung allein für eine prädiktive Aussage über die Strahlenantwort ausreichend ist, oder ob in anderen Entitäten sogar Pyruvat in Zusammenhang mit der Strahlensensibilität steht. Dabei wäre es wichtig, ein Probenkollektiv von Erstdiagnose-Patienten derselben Entitäten zu wählen und diese über einen möglichst langen Zeitraum zu verfolgen. So könnten klinisch relevante Daten zu den Krankheitsverläufen und Therapieansätzen mit den Metabolitdaten verglichen werden. Dabei muss sicherlich noch die L/P-Kartierung in der Routineanwendung mit höherem Probendurchsatz praktikabler gemacht werden. Hierzu könnte eine Software nützlich sein, die anhand markanter Stellen der

Gewebeschnitte eine eigenständige, digitale Überlagerung ermöglicht. Darüber hinaus sollte das Redoximaging um die Bestimmung von Glutathion (GSH) erweitert werden. Eine Machbarkeitsstudie hat bereits gezeigt, dass quantitatives Imaging von GSH mit der hier angewandten Biolumineszenztechnik möglich ist (Romero und Mueller-Klieser, 1998). Die Kombination aus Ermittlung des L/P-Verhältnisses und des Glutathionstatus würde präzisere Aussagen über den Redoxstatus eines Tumors zulassen. Somit könnte der mögliche Zusammenhang zwischen diesem und der Strahlensensibilität von Tumoren sehr genau und individuell ermittelt werden, was Aufschluss über spezifische und wirksame Therapieansätze geben könnte. Parallel dazu sollten Analysen an entsprechenden Normalgewebsbiopsien vorgenommen werden, um die etwaigen Unterschiede von malignem und normalem Gewebe erkennen zu können. In beiden Studien könnte die Kolo-kalisation von Laktat und Pyruvat im Gewebe untersucht werden. Da, wie oben beschrieben, sehr verschiedene Faktoren Einfluss auf das L/P-Verhältnis nehmen können, sollten am selben Objekt neben den Metabolitmessungen und Strukturfärbungen Analysen zu Expression und Aktivität wichtiger Enzyme, sowie Markierungen des Blutgefäßsystems und der Perfusion durchgeführt werden.

Bis vor einigen Jahren war ein kommerzieller photometrischer Testansatz zur Bestimmung von Pyruvat aus biologischen Flüssigkeiten von Boehringer Mannheim erhältlich. Dieser wird jedoch nicht mehr hergestellt. Man findet erst seit neuestem (2007) zwei käufliche Ansätze zur Bestimmung von Pyruvat, wobei sich der eine (Megazyme, Irland) nur für Proben wie Fruchtsäfte, Weine, Lebensmittel oder biologische Flüssigkeiten, wie z.B. Blut oder Cerebrospinalflüssigkeit, eignet. Der andere, in den USA hergestellte, kommerzielle „Assay Kit“ eignet sich auch zur Bestimmung von Pyruvat in Zellen und Gewebeproben. Dieser kann kolorimetrisch oder fluorimetrisch angewandt werden, wobei letztere Methode sensitiver ist; der Hersteller (BioVision) gibt eine Nachweisgrenze von 1 μM an. Als strategische Ziele erhoffen wir uns einerseits eine weitere Verbreitung von käuflichen Ansätzen zur Pyruvatbestimmung, sowie der Biolumineszenz-gestützten Quantifizierung von Pyruvat. Damit verbunden ist die quantitative, bildliche Darstellung des Redoxstatus (L/P-Kartierung) in Geweben. Dies wäre im Bereich der experimentellen Krebsforschung besonders wünschenswert, da eine Etablierung der Bestimmung des Redoxstatus als prognostische Methode in der klinischen Onkologie zur Ergänzung und Verbesserung der bestehenden klinischen Klassifikation dienen könnte. Darüber hinaus wäre das Verfahren zur L/P-Bestimmung in der Diagnostik muskulärer Krankheitsbilder bedeutungsvoll, da die strukturassoziierte Auswertemöglichkeit an Gewebebiopsien zu präziseren Ergebnissen führt als die Bestimmung in Gewebeextrakten.

5 Zusammenfassung

Eine neue auf einer Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzreaktion basierende Methode zur quantitativen Bestimmung und räumlichen Darstellung von Pyruvat in Gefrierschnitten von Gewebeproben wurde entwickelt. Dabei wurden biochemische Reaktionen so verknüpft, dass sichtbares Licht proportional zum eingesetzten Pyruvatgehalt entstand. Eine hoch signifikante positive Korrelation beider Parameter ermöglichte eine Kalibrierung mit definierten Pyruvatgehalten und damit die Quantifizierung in unbekanntem Proben. Die Nachweisgrenze lag bei 0,04 pmol Pyruvat mit einer Auflösung von 0,02 µmol/g. Das Biolumineszenzverfahren wurde mit Hilfe anderer Methoden validiert, wobei eine Wiederfindung mit einer Konzentrationsabhängigen Abweichung von $\leq 15\%$ erzielt wurde. Ein wesentlicher Vorteil der neuen Methode gegenüber bisherigen Verfahren zum Pyruvatnachweis liegt in der Messwerterfassung definierter histologischer Gewebesareale. Dies wird durch computergesteuerte Überlagerung von Metabolitverteilungen mit Schnittbildern aus Strukturfärbungen und interaktiver, „optischer Mikrodisektion“ der Gewebeschnitte möglich. Ein weiterer Nutzen der Methode ist deren optionale Kombination mit der Biolumineszenztechnik für andere Stoffwechselprodukte. So ermöglicht eine exakte Superposition zweier Metabolitbilder von unmittelbar aufeinander folgenden Gewebeschnitten eine korrelative Kolokalisationsanalyse beider Metabolite. Das Ergebnis lässt sich zum einen in Form von „Pixel-zu-Pixel“-Korrelationen dokumentieren, zum anderen kann für jeden Bildpunkt ein Laktat/Pyruvat-Verhältnis als Maß für den Redoxzustand des Gewebes berechnet und dargestellt werden. Hieraus ergeben sich z.B. räumliche L/P-Verteilungen (L/P-Karten). Ein solches „Redoximaging“ durch Kartierung des L/P-Quotienten ist bislang mit keinem anderen Verfahren möglich. Während die Entwicklung des Pyruvatnachweises eine Kernaufgabe der vorliegenden Arbeit darstellte, bestand ein weiterer wesentlicher Teil in der praktischen Anwendung der neuen Methode im Bereich der experimentellen Tumorforschung. So ergaben Messungen an acht verschiedenen Linien von humanen HNSCC-Xenotransplantaten ($n = 70$ Tumoren) einen mittleren Pyruvatgehalt von $1,24 \pm 0,20$ µmol/g. In sechs Humanbiopsien derselben Tumorentität wurde ein durchschnittlicher Pyruvatgehalt von $0,41 \pm 0,09$ µmol/g gemessen. Bei den Xenotransplantaten konnte eine signifikante positive Korrelation zwischen der Summe aus Laktat und Pyruvat bzw. dem L/P-Verhältnis und der Strahlensensibilität gefunden werden, wobei das L/P-Verhältnis ebenso wie die Summe aus Laktat und Pyruvat maßgeblich von Laktat bestimmt wurden. Der Zusammenhang der Metabolite mit der Strahlensensibilität lässt sich durch deren antioxidative Eigenschaften erklären. Da der Redoxzustand der Zelle kritisch bezüglich der Effizienz von ROS-induzierenden Therapieansätzen, wie z.B. Bestrahlung oder bestimmter Chemotherapeutika sein kann, könnte die Bestimmung des L/P-Verhältnisses als prognostischer Faktor prädiktive Aussagen über die Sensibilität gegenüber solchen Behandlungen erlauben.

6 Anhang

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabellen A1 bis A4: Auflistung der Zusammensetzung der Reaktionsansätze der Pyruvat-abhängigen Biolumineszenzreaktionen.

Tabelle A1 zu Abbildung 3-7.

	Konzentration im Test (mM bzw. mU/ml)	Konzentration und Ansatz der Stammlösungen*
MOPS-Cl (pH 7,4)	50	0,5 M
MgCl ₂	5	1 M
CaCl ₂	1	0,25 M
TPP	1	20 mM
CoA	0,25	10 mM
NAD ⁺	4	0,2 M
L-Cystein (pH 7,4)	3	0,1 M
DCA	5	0,5 M
PDH	120	1,2 U/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)
FMN	0,5	10,5 mM
Decanal	10	1 M in 96 % Ethanol
NFO	variabel	20 U/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)
Luziferase	15	60 mU/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)

Der Reaktionsansatz setzte sich aus je einem Teil doppelt konzentrierter PDH- und Lichtreaktion zusammen.

*Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reagenzien in Aqua dest. gelöst.

Tabelle A2 zu Abbildung 3-9.

	Konzentration im Test (mM bzw. mU/ml)	Konzentration und Ansatz der Stammlösungen*
MOPS-Cl (pH 7,4)	50	0,5 M
MgCl ₂	5	1 M
CaCl ₂	1	0,25 M
TPP	2	20 mM
CoA	0,25	10 mM
NAD ⁺	4	0,2 M
L-Cystein (pH 7,4)	3	0,1 M
DCA	5	0,5 M
PDH	120	1,2 U/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)
FMN	0,7	10,5 mM
Decanal	10	1 M in 96 % Ethanol
NFO	3000	20 U/ml in NFO-Puffer
Luziferase	15	60 mU/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)

*Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reagenzien in Aqua dest. gelöst.

Tabelle A3 zu Abbildung 3-10.

	Konzentration im Test (mM bzw. mU/ml)	Konzentration und Ansatz der Stammlösungen*
MOPS-Cl (pH 7,4)	50	0,5 M
MgCl ₂	5	1 M
CaCl ₂	1	0,25 M
TPP	2	20 mM
CoA	0,25	10 mM
NAD ⁺	6	0,2 M
L-Cystein (pH 7,4)	3	0,1 M
PDH	140	1,2 U/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)
FMN	0,7	10,5 mM
Decanal	10	1 M in 96 % Ethanol
NFO	3000	20 U/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)
Luziferase	15	60 mU/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)

*Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reagenzien in Aqua dest. gelöst.

Tabelle A4 zu Abbildung 3-11.

	Konzentration im Test (mM bzw. mU/ml)	Konzentration und Ansatz der Stammlösungen*
MOPS-Cl (pH 7,4)	50	0,5 M
MgCl ₂	5	1 M
CaCl ₂	1	0,25 M
TPP	2	20 mM
CoA	1	10 mM
NAD ⁺	10	0,2 M
L-Cystein (pH 7,4)	3	0,1 M
PDH	250	1,2 U/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)
FMN	0,8	10,5 mM
Decanal	11	1 M in 96 % Ethanol
NFO	7750	20 U/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)
Luziferase	16	60 mU/ml in 50 mM MOPS-Cl (pH 7,4)

*Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reagenzien in Aqua dest. gelöst.

Tabelle A5 zu Abbildung 3-17: Pyruvatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) und Abweichung (%) in den Wiederfindungsexperimenten.

Nr.	Blindprobe	Biolumineszenz		HPLC		PDH-Test		LDH-Test		kolorimetrischer Test	
	$\mu\text{mol/g}$ (tatsächlich)	$\mu\text{mol/g}$	% Abw.	$\mu\text{mol/g}$	% Abw.	$\mu\text{mol/g}$	% Abw.	$\mu\text{mol/g}$	% Abw.	$\mu\text{mol/g}$	% Abw.
1	0,18	0,17	-6	0,16	-11	0,30	67	0,25	39	0,11	-39
2	0,92	0,78	-15	0,83	-10	0,94	2	0,87	-5	0,93	1
3	1,76	1,78	1	1,76	0	1,77	1	1,73	-2	1,93	10
4	1,02	1,03	1	0,98	-4	1,03	1	0,94	-8	1,06	4
5	1,61	1,52	-6	1,60	-1	1,59	-1	1,59	-1	1,61	0
6	0,23	0,26	13	0,21	-9	0,19	-17	0,22	-4	0,20	-13
7	1,47	1,69	15	1,51	3	1,28	-13	1,45	-1	1,53	4
8	0,51	0,48	-6	0,50	-2	0,44	-14	0,47	-8	0,51	0
9	1,83	2,00	9	1,89	3	1,68	-8	1,82	-1	1,88	3
10	0,99	1,02	3	0,99	0	0,96	-3	1,00	1	1,00	1

Abw. = Abweichung (%) vom tatsächlich vorliegenden Pyruvatgehalt.

Tabelle A6: Flächenanteil (%) des vitalen Tumorgewebes am Gesamtschnitt der Xenotransplantate.

	% vitales Tumorgewebe		% vitales Tumorgewebe		% vitales Tumorgewebe		% vitales Tumorgewebe
SAS #74	45,9	Cal33 #541	27,3	FaDu #364	19,6	UT-15 #95	28,6
SAS #85	42,3	Cal33 #542	25,9	FaDu #372	56,6	UT-15 #96	19,2
SAS #86	26,3	Cal33 #544	36,3	FaDu #837	36,1	UT-15 #98	37,4
SAS #87	17,2	Cal33 #723	24,6	FaDu #844	80,3	UT-15 #109	26,2
SAS #249	58,1	Cal33 #724	24,8	FaDu #845	74,6	UT-15 #229	15,6
SAS #830	26,6	Cal33 #725	41,4	FaDu #846	71,6	UT-15 #230	17,2
SAS #849	59,9	Cal33 #726	31,9	FaDu #871	51,7	UT-15 #232	25,4
SAS #850	46,7	Cal33 #805	43,4	FaDu #872	42,0	UT-15 #259	28,0
SAS #857	30,7	Cal33 #807	11,8	FaDu #873	30,7	UT-15 #262	17,0
SAS #902	62,9	Cal33 #808	15,6	FaDu #874	60,7	UT-15 #263	23,4
SAS #909	35,1	Cal33 #851	43,1	FaDu #905	74,6	UT-15 #264	29,0
SAS #910	62,7	-	-	-	-	-	-
UT-14 #131	78,7	UT-5 #60	65,3	UT-45 #6	57,6	XF354 #259	27,1
UT-14 #132	95,0	UT-5 #98	49,4	UT-45 #13	30,5	XF354 #259-2	25,8
UT-14 #133	87,5	UT-5 #406	32,3	UT-45 #37	40,0	XF354 #476	40,9
UT-14 #134	75,7	UT-5 #698	42,7	UT-45 #295	30,2	XF354 #476-2	40,0
UT-14 #558	44,7	UT-5 #699	36,0	UT-45 #448	36,0	XF354 #546	33,4
UT-14 #559	31,2	UT-5 #701	26,4	UT-45 #939	38,7	XF354 #546-2	36,9
UT-14 #560	26,7	-	-	-	-	-	-
UT-14 #604	64,4	-	-	-	-	-	-
UT-14 #605	61,3	-	-	-	-	-	-
UT-14 #606	38,2	-	-	-	-	-	-

Tabelle A7: Pyruvatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) der Tumorklinien Cal33, FaDu, SAS und XF354.
 MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Med = Median, Min = Minimalwert, Max = Maximalwert.
 Es wurde zwischen der Pyruvatkonzentration ($\mu\text{mol/g}$) der gesamten Schnittfläche und des vitalen Tumorgewebes unterschieden.

Tumor	gesamte Schnittfläche					vitales Tumorgewebe				
	MW	SD	Med	Min	Max	MW	SD	Med	Min	Max
Cal33										
#541	0,67	0,37	0,61	0,07	3,97	0,90	0,38	0,86	0,07	3,97
#542	0,81	0,44	0,77	0,07	3,97	0,90	0,39	0,86	0,07	3,97
#544	0,71	0,47	0,62	0,07	3,97	0,82	0,49	0,73	0,07	3,97
#723	0,93	0,52	0,89	0,07	3,97	1,23	0,49	1,16	0,07	3,97
#724	0,83	0,39	0,79	0,07	3,97	0,94	0,40	0,89	0,07	3,97
#725	1,64	0,85	1,57	0,04	3,83	2,03	0,70	1,94	0,13	3,83
#726	0,77	0,47	0,73	0,07	3,97	0,92	0,40	0,87	0,07	3,97
#805	0,92	0,52	0,87	0,07	3,97	1,21	0,49	1,16	0,07	3,97
#807	0,78	0,45	0,72	0,07	3,97	0,83	0,35	0,79	0,07	3,16
#808	1,36	0,73	1,28	0,07	3,97	1,64	0,60	1,56	0,15	3,97
#851	1,24	0,65	1,17	0,07	3,97	1,39	0,57	1,29	0,07	3,97
FaDu										
#364	1,08	0,43	1,09	0,02	1,99	1,41	0,34	1,42	0,29	1,99
#372	1,36	0,39	1,42	0,02	1,99	1,38	0,39	1,45	0,02	1,99
#837	1,17	0,51	1,25	0,02	1,99	1,39	0,41	1,45	0,10	1,99
#844	1,54	0,37	1,63	0,06	1,99	1,63	0,28	1,69	0,06	1,99
#845	1,04	0,37	1,02	0,02	1,99	1,13	0,35	1,11	0,04	1,99
#846	1,01	0,34	1,02	0,02	1,99	1,09	0,30	1,09	0,02	1,99
#871	1,33	0,48	1,44	0,02	1,99	1,60	0,30	1,66	0,04	1,99
#872	1,15	0,44	1,16	0,02	1,99	1,34	0,33	1,34	0,04	1,99
#873	1,26	0,51	1,38	0,02	1,99	1,53	0,33	1,59	0,36	1,99
#874	1,32	0,48	1,44	0,02	1,99	1,59	0,27	1,63	0,08	1,99
#905	1,42	0,43	1,51	0,02	1,99	1,57	0,32	1,63	0,02	1,99
SAS										
#74	0,86	0,49	0,85	0,05	1,99	1,18	0,37	1,16	0,05	1,99
#85	0,89	0,50	0,87	0,05	1,99	1,22	0,37	1,21	0,05	1,99
#86	0,98	0,52	0,90	0,09	1,97	1,10	0,51	1,06	0,09	1,97
#87	1,04	0,47	1,05	0,05	1,99	1,40	0,36	1,43	0,17	1,99
#249	1,07	0,54	1,12	0,05	1,99	1,35	0,38	1,37	0,11	1,99
#830	0,9	0,5	0,84	0,09	1,97	1,21	0,51	1,22	0,09	1,97
#849	1,30	0,47	1,26	0,09	1,97	1,40	0,43	1,43	0,09	1,97
#850	1,10	0,54	1,07	0,09	1,97	1,43	0,44	1,45	0,09	1,97
#857	0,91	0,53	0,85	0,09	1,97	1,25	0,51	1,25	0,09	1,97
#902	1,18	0,46	1,21	0,05	1,99	1,26	0,40	1,28	0,05	1,99
#909	1,11	0,57	1,09	0,09	1,97	1,40	0,45	1,43	0,09	1,97
#910	0,44	0,94	0,36	1,99	1,07	1,15	0,37	1,13	0,05	1,99
XF354*										
#259	0,70	0,19	0,72	0,07	0,99	0,82	0,14	0,85	0,12	0,99
#259	0,72	0,19	0,74	0,03	0,99	0,77	0,16	0,80	0,20	0,99
#476	0,53	0,23	0,49	0,03	0,99	0,76	0,19	0,81	0,18	0,99
#476	0,44	0,24	0,38	0,03	0,99	0,76	0,17	0,80	0,15	0,99
#546	0,66	0,26	0,72	0,03	0,99	0,86	0,11	0,88	0,03	0,99
#546	0,77	0,17	0,81	0,03	0,99	0,86	0,11	0,88	0,03	0,99

*Schnittdicke 16 μm . Anhand des Unterschiedes der linearen Steigungen von Kalibrierungen mit 16 μm und 20 μm dicken Standardschnitten ergab sich der Faktor 1,27, mit dem die Konzentrationen auf eine theoretische Dicke von 20 μm hochgerechnet wurden.

Tabelle A8: Pyruvatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) der Tumorlinien UTSCC-5, -14, -15 und -45. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Med = Median, Min = Minimalwert, Max = Maximalwert. Es wurde zwischen dem Pyruvatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) der gesamten Schnittfläche und des vitalen Tumorgewebes unterschieden.

Tumor	gesamte Schnittfläche					vitales Tumorgewebe				
	MW	SD	Med	Min	Max	MW	SD	Med	Min	Max
UTSCC-5										
#60*	0,61	0,27	0,64	0,05	0,99	0,85	0,12	0,88	0,27	0,99
#98*	0,65	0,27	0,73	0,03	0,99	0,83	0,15	0,88	0,22	0,99
#406*	0,68	0,22	0,72	0,03	0,99	0,79	0,15	0,82	0,20	0,99
#698	0,69	0,19	0,70	0,03	0,99	0,78	0,17	0,83	0,30	0,99
#699	0,66	0,21	0,68	0,03	0,99	0,89	0,10	0,91	0,03	0,99
#701	0,60	0,25	0,61	0,03	0,99	0,72	0,18	0,73	0,10	0,99
UTSCC-14										
#131	1,37	0,41	1,43	0,05	1,99	1,46	0,36	1,48	0,17	1,99
#132	1,17	0,46	1,19	0,05	1,99	1,18	0,46	1,20	0,05	1,99
#133	1,46	0,43	1,54	0,05	1,99	1,54	0,37	1,62	0,05	1,99
#134	1,35	0,42	1,38	0,05	1,99	1,42	0,38	1,45	0,11	1,99
#558	1,20	0,49	1,21	0,05	1,99	1,51	0,36	1,56	0,22	1,99
#559	0,99	0,52	0,93	0,05	1,99	1,39	0,41	1,43	0,17	1,99
#560	0,92	0,53	0,87	0,05	1,99	1,25	0,43	1,24	0,11	1,99
#604	1,15	0,44	1,15	0,05	1,99	1,24	0,40	1,23	0,05	1,99
#605	1,20	0,43	1,22	0,05	1,99	1,32	0,36	1,31	0,05	1,99
#606	1,52	0,34	1,55	0,05	1,99	1,52	0,34	1,55	0,05	1,99
UTSCC-15										
#95	1,28	0,48	1,37	0,02	1,99	1,51	0,35	1,58	0,32	1,99
#96	1,55	0,34	1,63	0,04	1,99	1,78	0,17	1,82	0,53	1,99
#98	1,03	0,49	0,94	0,04	1,99	1,46	0,37	1,52	0,06	1,99
#109	0,88	0,45	0,81	0,02	1,99	1,22	0,37	1,22	0,15	1,99
#229	1,14	0,51	1,10	0,02	1,99	1,44	0,35	1,46	0,19	1,99
#230	1,14	0,51	1,18	0,02	1,99	1,79	0,20	1,84	0,21	1,99
#232	1,07	0,50	1,11	0,02	1,99	1,39	0,31	1,40	0,25	1,99
#259	1,35	0,37	1,37	0,04	1,99	1,47	0,34	1,51	0,19	1,99
#262	1,09	0,47	1,10	0,02	1,99	1,47	0,32	1,50	0,15	1,99
#263	1,06	0,37	1,01	0,02	1,99	1,31	0,36	1,34	0,02	1,99
#264	1,25	0,48	1,33	0,02	1,99	1,54	0,33	1,60	0,04	1,99
UTSCC-45										
#6	0,92	0,41	0,91	0,05	1,99	0,92	0,42	0,91	0,05	1,99
#13	1,15	0,51	1,09	0,09	1,97	1,32	0,46	1,40	0,09	1,97
#37	1,29	0,44	1,31	0,05	1,99	1,51	0,34	1,54	0,05	1,99
#295	1,15	0,41	1,12	0,05	1,99	1,28	0,45	1,30	0,05	1,99
#448	1,02	0,66	0,90	0,07	3,97	1,28	0,60	1,17	0,07	3,97
#939	1,07	0,45	1,06	0,05	1,99	1,20	0,36	1,19	0,05	1,99

*Schnittdicke 16 μm . Anhand des Unterschiedes der linearen Steigungen von Kalibrierungen mit 16 μm und 20 μm dicken Standardschnitten ergab sich der Faktor 1,27, mit dem die Konzentrationen auf eine theoretische Dicke von 20 μm hochgerechnet wurden.

Tabelle A9: ATP- und Laktatgehalt ($\mu\text{mol/g}$) der Tumorklinie Cal33. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Med = Median, Min = Minimalwert, Max = Maximalwert. Alle Werte beziehen sich auf vitales Tumorgewebe.

Tumor Nr./Segment	ATP					Laktat				
	MW	SD	Med	Min	Max	MW	SD	Med	Min	Max
#541-7	1,2	0,4	1,1	2,6	1,0	24,0	8,5	24,5	4,3	50,9
#541-8	1,2	0,4	1,1	2,6	1,0	23,2	7,0	23,5	3,7	50,9
#541-9	1,3	0,4	1,3	2,7	1,4	21,6	7,2	21,3	4,5	50,9
#542-7	1,5	0,3	1,5	2,8	1,5	25,8	9,4	23,5	9,6	50,9
#542-8	1,3	0,3	1,3	2,6	1,3	28,9	8,3	28,1	0,1	50,9
#542-9	1,3	0,3	1,3	2,8	1,2	27,8	9,2	26,5	10,0	50,9
#544-7	1,3	0,4	1,3	3,1	1,4	23,7	6,3	23,7	0,0	50,9
#544-8	1,4	0,4	1,4	3,5	1,4	21,3	5,8	20,9	0,0	49,9
#544-9	1,3	0,4	1,3	2,8	1,3	17,9	5,0	17,3	1,1	50,9
#723-7	1,3	0,4	1,3	3,2	1,2	31,1	7,2	31,2	1,4	50,9
#723-8	1,2	0,4	1,2	3,2	1,2	-	-	-	-	-
#723-9	1,1	0,3	1,1	2,3	1,2	29,3	5,8	28,9	7,0	50,9
#724-7	1,5	0,4	1,5	4,1	1,4	28,5	8,1	28,1	4,3	50,9
#724-8	1,5	0,5	1,5	3,7	1,4	33,1	8,4	32,6	4,6	50,9
#724-9	1,4	0,4	1,4	3,2	1,6	35,4	8,0	35,0	0,0	50,9
#725-1	1,6	0,4	1,6	3,6	1,5	27,0	8,4	24,7	1,9	50,9
#725-2	1,7	0,4	1,6	3,7	1,6	29,2	8,4	28,3	2,0	50,9
#725-3	1,6	0,3	1,6	3,8	1,6	31,7	7,4	30,8	1,5	50,9
#725-4	1,9	0,5	1,8	4,3	1,7	30,1	8,6	29,2	4,5	50,9
#726-7	1,5	0,4	1,5	3,9	1,4	31,5	7,7	30,8	0,0	50,9
#726-8	1,2	0,3	1,2	2,6	1,1	20,1	6,9	19,7	5,1	50,9
#726-9	1,2	0,4	1,2	3,0	1,3	16,4	4,8	15,2	4,1	48,6
#805-7	1,6	0,4	1,6	3,1	1,4	28,7	8,5	28,7	0,2	50,9
#805-8	1,4	0,4	1,4	3,5	1,4	26,1	6,9	25,5	0,1	50,9
#805-9	1,5	0,3	1,5	2,9	1,5	28,9	7,5	28,9	0,0	50,9
#807-7	1,2	0,4	1,3	2,5	1,5	24,8	8,7	23,5	2,6	50,9
#807-8	1,2	0,5	1,2	2,7	1,4	25,7	7,6	25,4	4,6	50,9
#807-9	1,3	0,5	1,2	3,2	0,9	26,1	8,0	25,8	4,1	50,9
#808-7	1,5	0,4	1,5	3,6	1,6	29,3	7,1	29,0	7,5	50,9
#808-8	1,3	0,5	1,3	4,4	1,1	32,8	7,1	32,4	2,0	50,9
#808-9	1,7	0,6	1,6	4,3	1,4	36,4	6,6	36,1	0,0	50,9
#851-7	1,7	0,4	1,8	3,5	1,8	28,2	5,9	27,8	5,7	50,9
#851-8	1,6	0,4	1,6	4,5	1,6	25,9	5,6	25,6	0,3	50,9
#851-9	1,5	0,4	1,5	3,2	1,5	36,0	7,8	36,1	0,0	50,9

Tabelle A11: Flächenanteil (%) von vitalem Tumor- und Normalgewebe am Gesamtschnitt der HNSCC-Humanbiopsien.

	Flächenanteil vitales Tumorgewebe (% bezogen auf gesamt)			
	Serie I	Serie II	Serie III	Serie IV
HF	17	37	21	21
TR03	56	64	71	72
TR04	53	76	59	50
TR06	52	46	45	100
TR10	67	87	94	90
TR11	86	99	79	53

	Flächenanteil Normalgewebe (% bezogen auf gesamt)			
	Serie I	Serie II	Serie III	Serie IV
HF	17	32	27	21
TR03	7	-	3	-
TR04	11	17	17	17
TR06	-	-	-	-
TR10	-	-	-	-
TR11	-	-	14	17

6.2 Puffer und Lösungen

10x PBS (0,1 M PBS)

Phosphate Buffered Saline

38 mM	NaH ₂ PO ₄
162 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 M	NaCl

Titration auf pH 7,4.

1x PBS (pH 7,4) wurde aus 10x PBS hergestellt.

0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) für die Enzymlösung für den Laktatnachweis

40 mM	KH ₂ PO ₄
60 mM	Na ₂ HPO ₄
50 mM	Natriumglutamat

Puffer für die NFO

40 %	Glycerin
1 mM	EDTA (pH 8,0)
0,1 mM	DTT
50 mM	KH ₂ PO ₄ (pH 7,0)

6.3 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Roth, Karlsruhe
ADP	Roche, Mannheim
Arsenat (Na_2HAsO_4)	Merck, Darmstadt
ATP	Roche, Mannheim
Carnitin-Acetyltransferase	Sigma, München
Coenzym A	Sigma, München
Decanal	Merck, Darmstadt
DTT	Sigma, München
Einbettmedium (TissueTek)	Slee, Mainz
Eosin	Roth, Karlsruhe
HCl	Sigma, München
HEPES	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MgCl_2	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma, München
NAD^+	Roth, Karlsruhe
NADH	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
Laktat (Natrium-L-Laktat)	Fluka, München
Leuchtkäfer (<i>Photinus pyralis</i>)	Sigma, München
Mayer's saures Hämalaun	Roth, Karlsruhe
Perchlorsäure (20 %)	Fluka, München
Pyruvat (Natrium-Pyruvat)	Sigma, München
Roti-Histokitt	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
Thiaminpyrophosphat	Sigma, München
Triethanolamin	Fluka, München
Tris	Sigma, München
Tween20	Sigma, München
Enzyme	
Laktatdehydrogenase	Roche, München
Luziferase (<i>Vibrio fischeri</i>)	Roche, München
NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase	Roche, München
Pyruvatdehydrogenase	Sigma, München
Glutamat-Pyruvat-Transaminase	Roche, München
Antikörper und Puffer	
Kaninchen anti-human Multi-Cytokeratin	Vision BioSystems NovoCastra, Newcastle, UK
EnVision Ziege anti-Maus	Dako, Hamburg
Antikörperverdünnungspuffer	Dako, Hamburg

Ziege-Normalserum	Dako, Hamburg
DAB ⁺ Liquid (Chromogen und Puffer)	Dako, Hamburg

6.4 Sonstige Materialien, Geräte und Software

Deckgläser	60 x 24 mm	Menzel, Braunschweig
Objektträger	SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig

Fettstift	Dako, Hamburg
Filtereinheiten 0,45 µm	Hartenstein, Würzburg

Nicht explizit aufgeführte Einweg-Plastikmaterialien wie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden von den Firmen Greiner Bio-One (Frickenhäuser), Roth (Karlsruhe) und VWR (Darmstadt), Glasgefäße von der Firma Schott AG, Mainz bezogen.

Geräte

Biolumineszenztechnik	
Photonenzähler C2400	Hamamatsu, Herrsching
und CCD-Kamera	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Axiophot	
Homogenisator	Braun, Melsungen
HPLC-Anlage	BioRad, München
Autosampler AS-100	
Detektor 1801 UV	
Pumpe	
Interface	
Säule organic acid Resin	Göhler-Analysentechnik, Chemnitz
Kryostat	Slee, Mainz
Microplate Reader Model UV-3550	BioRad, München
Photometer LambdaBio	Perkin Elmer, Waltham, USA
Ultraschallstab	IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.
Zauberstab M 122 M	Esge, Stuttgart
Zentrifugen	
Zentrifuge 3200	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1,0 R, Rotor 2252	Heraeus, Hanau
Biofuge 15, Rotor 3042	Heraeus, Hanau

Software

ImageJ	National Institute of Health
MicroplateManager 4.0	BioRad, München
Office	Microsoft Corporation, München
OriginLab	OriginLab Corporation, Northampton
Photoshop CS	Adobe Systems, München
ValueChrom	Biorad, München
Wasabi	Hamamatsu, Herrsching

6.5 Abkürzungsverzeichnis

Acetyl-CoA	Acetyl-CoenzymA
AMP	Adenosinmonophosphat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CAT	Carnitin-Acetyltransferase
CoA	CoenzymA
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DCA	Dichloroacetat
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DTT	Dithiothreitol
FMN, FMNH ₂	Flavinmononukleotid (oxidiert, reduziert)
GLUT	Glukosetransporter
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH, GSSG	Glutathion (reduziert, oxidiert)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HIF	Hypoxie induzierbarer Faktor
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
KI	Konfidenzintervall
LDH	Laktatdehydrogenase
L/P	Laktat/Pyruvat
MCP	Multichannel-Plate
MCT	Monocarboxylattransporter
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid)
NAD ⁺ , NADH+H ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidiert, reduziert)
NFO	NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
PBS	phosphate buffered saline
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenasekinase
PFK	Phosphofruktokinase
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PP _i	anorganisches Phosphat
PPP	Pentosephosphatweg
ROI	region of interest
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
SD	Standardabweichung
TCD ₅₀	Tumor Control Dose
TPP	Thiaminpyrophosphat (Coccarboxylase)

7 Referenzen

- Anthon, GE und Barrett, DM (2003). Modified method for the determination of pyruvic acid with dinitrophenylhydrazine. In the assessment of onion pungency. *J Sci Food Agric* 83; 12:1210-1213.
- Borisjuk, L, Walenta, S, Rolletschek, H, Mueller-Klieser, W, Wobus, U und Weber, H (2002). Spatial analysis of plant metabolism: Sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. *Plant J* 29; 4:521-530.
- Brizel, DM, Schroeder, T, Scher, RL, Walenta, S, Clough, RW, Dewhirst, MW und Mueller-Klieser, W (2001). Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51; 2:349-353.
- Clay, AS, Behnia, M und Brown, KK (2001). Mitochondrial disease: a pulmonary and critical-care medicine perspective. *Chest* 120; 2:634-648.
- Cornelio, F und Di, DS (1985). Myopathies due to enzyme deficiencies. *J Neurol* 232; 6:329-340.
- Cross, JH, Gadian, DG, Connelly, A und Leonard, JV (1993). Proton magnetic resonance spectroscopy studies in lactic acidosis and mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis* 16; 4:800-811.
- Darras, BT und Friedman, NR (2000). Metabolic myopathies: A clinical approach; Part I. *Pediatr Neurol* 22; 2:87-97.
- Desagher, S, Glowinski, J und Premont, J (1997). Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J Neurosci* 17; 23:9060-9067.
- Deschauer, M (2003). Mitochondriale Enzephalomyopathien. *Psycho - Zeitschrift für Praxis und Klinik* 3:108-112.
- Dimmer, KS, Friedrich, B, Lang, F, Deitmer, JW und Broer, S (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 350 Pt 1;219-227.
- Friedemann, TE und Haugen, GE (1943). Pyruvic Acid. II. The determination of keto acids in blood and urine. *J Biol Chem* 147; 2:415-442.
- Gatenby, RA und Gillies, RJ (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4; 11:891-899.
- Gorlach, A und Acker, H (1994). The relationship of radiation sensitivity and microenvironment of human tumor cells in multicellular spheroid tissue culture. *Adv Exp Med Biol* 345;343-350.
- Groussard, C, Morel, I, Chevanne, M, Monnier, M, Cillard, J und Delamarche, A (2000). Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol* 89; 1:169-175.
- Halestrap, AP und Price, NT (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343 Pt 2;281-299.

- Hamada, M, Hiraoka, T, Koike, K, Ogasahara, K und Kanzaki, T (1976). Properties and subunit structure of pig heart pyruvate dehydrogenase. *J Biochem (Tokyo)* 79; 6:1273-1285.
- Hastings, JW, Spudich, J und Malnic, G (1963b). The influence of aldehyde chain length upon the relative quantum yield of the bioluminescent reaction of achromobacter fischeri. *J Biol Chem* 238;3100-3105.
- Hastings, JW, Spudich, J und Malnic, G (1963a). The influence of aldehyde chain length upon the relative quantum yield of the bioluminescent reaction of achromobacter fischeri. *J Biol Chem* 238;3100-3105.
- He, Q, Shungu, DC, van Zijl, PC, Bhujwalla, ZM und Glickson, JD (1995). Single-scan in vivo lactate editing with complete lipid and water suppression by selective multiple-quantum-coherence transfer (Sel-MQC) with application to tumors. *J Magn Reson B* 106; 3:203-211.
- Hockel, M und Vaupel, P (2001). Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93; 4:266-276.
- Inlow, JK und Baldwin, TO (2002). Mutational analysis of the subunit interface of Vibrio harveyi bacterial luciferase. *Biochemistry (Mosc)* 41; 12:3906-3915.
- Inouye, S (1994). Nad(P)H-Flavin Oxidoreductase from the Bioluminescent Bacterium, Vibrio-Fischeri Atcc-7744, Is A Flavoprotein. *FEBS Lett* 347; 2-3:163-168.
- Keul, J, Doll, E und Keppler, D (1968). [Metabolism of skeletal muscle. I. Glucose, lactate, pyruvate and free fatty acids in arterial and venous blood of working muscles. Examinations of well trained athletes]. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* 301; 3:198-213.
- Keul, Doll und Keppler (1972). *Medicine and Sport Science. Energy Metabolism of Human Muscle*. S. Karger AG, Bd 7.
- Kim, JW, Tchernyshyov, I, Semenza, GL und Dang, CV (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3; 3:177-185.
- Klyuyeva, A, Tuganova, A und Popov, KM (2007). Amino acid residues responsible for the recognition of dichloroacetate by pyruvate dehydrogenase kinase 2. *FEBS Lett* 581; 16:2988-2992.
- Korenke, GC (2002). Laboratoriumsdiagnostik neurometabolischer Erkrankungen im Kindesalter. Laboratory Diagnostics of Neurological Inborn Errors of Metabolism in Childhood. *Laboratoriums Medizin* 26; 5-6:324-334.
- Levin, M, Leppanen, O, Evaldsson, M, Wiklund, O, Bondjers, G und Bjornheden, T (2003). Mapping of ATP, glucose, glycogen, and lactate concentrations within the arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23; 10:1801-1807.
- Lin, DD, Crawford, TO und Barker, PB (2003a). Proton MR spectroscopy in the diagnostic evaluation of suspected mitochondrial disease. *AJNR Am J Neuroradiol* 24; 1:33-41.
- Lin, RY, Vera, JC, Chaganti, RS und Golde, DW (1998). Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J Biol Chem* 273; 44:28959-28965.
- Lin, X, Zhang, F, Bradbury, CM, Kaushal, A, Li, L, Spitz, DR, Aft, RL und Gius, D (2003b). 2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism. *Cancer Res* 63; 12:3413-3417.

- Low, JC und Tu, SC (2002). Functional roles of conserved residues in the unstructured loop of *Vibrio harveyi* bacterial luciferase. *Biochemistry (Mosc)* 41; 6:1724-1731.
- Lu, H, Forbes, RA und Verma, A (2002). Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem* 277; 26:23111-23115.
- Luft, FC (2001). Lactic acidosis update for critical care clinicians. *J Am Soc Nephrol* 12; 2:S15-S19.
- Mallet, RT und Sun, J (1999). Mitochondrial metabolism of pyruvate is required for its enhancement of cardiac function and energetics. *Cardiovasc Res* 42; 1:149-161.
- Mallet, RT und Sun, J (2003). Antioxidant properties of myocardial fuels. *Mol Cell Biochem* 253; 1-2:103-111.
- McElroy, WD und DeLuca, MA (1983). Firefly and bacterial luminescence: basic science and applications. *J Appl Biochem* 5; 3:197-209.
- Mitka, M (2005). Diabetic retinopathy mechanism probed. *JAMA* 293; 2:148-149.
- Mongan, PD, Capacchione, J, West, S, Karaian, J, Dubois, D, Keneally, R und Sharma, P (2002). Pyruvate improves redox status and decreases indicators of hepatic apoptosis during hemorrhagic shock in swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283; 4:H1634-H1644.
- Moreno-Sanchez, R, Rodriguez-Enriquez, S, Marin-Hernandez, A und Saavedra, E (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274; 6:1393-1418.
- Mueller-Klieser, W und Walenta, S (1993). Geographical mapping of metabolites in biological tissue with quantitative bioluminescence and single photon imaging. *Histochem J* 25; 6:407-420.
- Mueller-Klieser, W, Walenta, S, Paschen, W, Kallinowski, F und Vaupel, P (1988). Metabolic imaging in microregions of tumors and normal tissues with bioluminescence and photon counting. *J Natl Cancer Inst* 80; 11:842-848.
- Nefsky, B und DeLuca, M (1982). Studies on the NADH and NADPH: riboflavin 5'-phosphate (FMN) oxidoreductases from *Beneckea harveyi*: characterization of the FMN binding sites. *Arch Biochem Biophys* 216; 1:10-16.
- O'Donnell-Tormey, J, Nathan, CF, Lanks, K, DeBoer, CJ und de la, HJ (1987). Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *J Exp Med* 165; 2:500-514.
- Ong, HY, O'Dochartaigh, CS, Lovell, S, Patterson, VH, Wasserman, K, Nicholls, DP und Riley, MS (2004). Gas exchange responses to constant work-rate exercise in patients with glycolysis type V and VII. *Am J Respir Crit Care Med* 169; 11:1238-1244.
- Przyrembel, H (1987). Therapy of mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis* 10 Suppl 1;129-146.
- Putman, CT, Matsos, MP, Hultman, E, Jones, NL und Heigenhauser, GJ (1999). Pyruvate dehydrogenase activation in inactive muscle during and after maximal exercise in men. *Am J Physiol* 276; 3 Pt 1:E483-E488.
- Quennet, V (2007). Bedeutung des Glukosestoffwechsels für die Strahlenempfindlichkeit solider Tumoren. Diss. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

- Quennet, V, Yaromina, A, Zips, D, Rosner, A, Walenta, S, Baumann, M und Mueller-Klieser, W (2006). Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother Oncol* 81; 2:130-135.
- Riede und Schaefer (1999). Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme-Verlag, 5. Auflage.
- Roda, A, Pasini, P, Mirasoli, M, Michelini, E und Guardigli, M (2004). Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends Biotechnol* 22; 6:295-303.
- Romero, FJ und Mueller-Klieser, W (1998). Semiquantitative bioluminescent assay of glutathione. *J Biolumin Chemilumin* 13; 5:263-266.
- Roslin, M, Henriksson, R, Bergstrom, P, Ungerstedt, U und Bergenheim, AT (2003). Baseline levels of glucose metabolites, glutamate and glycerol in malignant glioma assessed by stereotactic microdialysis. *J Neurooncol* 61; 2:151-160.
- Sadikot, RT und Blackwell, TS (2005). Bioluminescence imaging. *Proc Am Thorac Soc* 2; 6:537-2.
- Sahlin, K, Harris, RC, Nylind, B und Hultman, E (1976). Lactate content and pH in muscle obtained after dynamic exercise. *Pflugers Arch* 367; 2:143-149.
- Sahlin, K, Katz, A und Henriksson, J (1987). Redox state and lactate accumulation in human skeletal muscle during dynamic exercise. *Biochem J* 245; 2:551-556.
- Salahudeen, AK, Clark, EC und Nath, KA (1991). Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 88; 6:1886-1893.
- Schafer, FQ und Buettner, GR (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30; 11:1191-1212.
- Schwickert, G (1995). Bestimmung von ATP, Glukose und Laktat in Gewebeschnitten von humanen Zervix-Karzinomen durch Biolumineszenzreaktionen. *Diss. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz*.
- Semenza, GL (2007). HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *J Bioenerg Biomembr*
- Simon, DK und Johns, DR (1999). Mitochondrial disorders: clinical and genetic features. *Annu Rev Med* 50;111-127.
- Simon, MC (2006). Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3; 3:150-151.
- Stephen, R und Gillies, R (2007). Promise and progress for functional and molecular imaging of response to targeted therapies. *Pharm Res* 24; 6:1172-1185.
- Strehler, BL und Cormier, MJ (1953). Factors affecting the luminescence of cell-free extracts of the luminous bacterium, *Achromobacter fischeri*. *Arch Biochem Biophys* 47; 1:16-33.
- Tsintzas, K, Williams, C, Constantin-Teodosiu, D, Hultman, E, Boobis, L und Greenhaff, P (2000). Carbohydrate ingestion prior to exercise augments the exercise-induced activation of the pyruvate dehydrogenase complex in human skeletal muscle. *Exp Physiol* 85; 5:581-586.

- Vamosi, B, Dioszeghy, P und Molnar, L (1983). Lactate and pyruvate content of the human cisternal cerebrospinal fluid. Normal values, age and sex dependency, correlations with glucose concentrations. *Arch Psychiatr Nervenkr* 232; 6:521-532.
- Walenta, S, Dotsch, J und Mueller-Klieser, W (1990). ATP concentrations in multicellular tumor spheroids assessed by single photon imaging and quantitative bioluminescence. *Eur J Cell Biol* 52; 2:389-393.
- Walenta, S, Schroeder, T und Mueller-Klieser, W (2004). Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem* 11; 16:2195-2204.
- Walenta, S, Wetterling, M, Lehrke, M, Schwickert, G, Sundfor, K, Rofstad, EK und Mueller-Klieser, W (2000). High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60; 4:916-921.
- Walenta, S, Chau, T-V, Schroeder, T, Lehr, HA, Kunz-Schughart, LA, Fuerst, A und Mueller-Klieser, W (2003). Metabolic classification of human rectal adenocarcinomas: a novel guideline for clinical oncologists? *J Cancer Res Clin Oncol* 129; 6:321-326.
- Watt, MJ, Heigenhauser, GJ, LeBlanc, PJ, Inglis, JG, Spriet, LL und Peters, SJ (2004). Rapid upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase activity in human skeletal muscle during prolonged exercise. *J Appl Physiol* 97; 4:1261-1267.
- Welsh, DK und Kay, SA (2005). Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr Opin Biotechnol* 16; 1:73-78.
- Wilichowski, E, Korenke, GC, Christen, J, Wagner, M, Rating, D und Hanefeld, F (1997). Medikamentöse und diätetische Therapie der mitochondrialen Zytopathien des Kindesalters. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 145; 1:5-19.
- Winkler, UK und Sicher, J (1996). Bioluminescence of animals, plants and bacteria. *Naturwissenschaften* 83; 7:312-320.
- Yaromina, A, Krause, M, Thames, H, Rosner, A, Krause, M, Hessel, F, Grenman, R, Zips, D und Baumann, M (2007). Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 83; 3:304-310.
- Yaromina, A, Zips, D, Thames, HD, Eicheler, W, Krause, M, Rosner, A, Haase, M, Petersen, C, Raleigh, JA, Quennet, V, Walenta, S, Mueller-Klieser, W und Baumann, M (2006). Pi-monidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: the need for a multivariate approach in biomarker studies. *Radiother Oncol* 81; 2:122-129.
- Zu, XL und Guppy, M (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 313; 3:459-465.

