

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

Der Einfluss von AZD3965 auf die Expression von MCT1, MCT4 und CD147
sowie den Metabolitstatus von Experimentaltumoren
zweier Ovarialkarzinomzelllinien

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

Vorgelegt von

Sophie Kliem
aus Würzburg

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 07. Dezember 2021

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
1. Einleitung	1
2. Literaturdiskussion.....	3
2.1. Das Ovarialkarzinom	3
2.2. Unterschiede im Metabolismus benigner und maligner Zellen	5
2.2.1. Glucosemetabolismus benigner Zellen.....	5
2.2.2. Glucosemetabolismus maligner Tumoren.....	6
2.3. Monocarboxylattransporter.....	11
2.3.1. MCT1	13
2.3.2. MCT4	13
2.3.3. Ankerproteine und Modulation von MCT1 und MCT4.....	14
2.4. Inhibition der Monocarboxylattransporter.....	15
2.5. Aufgabenstellung dieser Arbeit	20
3. Material und Methoden.....	23
3.1. Probenmaterial	23
3.1.1. Tumorzelllinien.....	23
3.1.2. Xenotransplantate	23
3.1.3. Zellkulturproben	24
3.2. Erstellung von Wachstumskurven	25
3.3. Anfertigung von Gefrierschnitten.....	25
3.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	27
3.5. Grafische Nekroseanalyse.....	28
3.6. Immunhistochemische Färbungen	29
3.6.1. Fluoreszenz-Immunhistochemie	29
3.6.2. DAB-Immunhistochemie	32

3.7. Western Blot	34
3.8. Bildgebende Biolumineszenz	34
3.8.1. Prinzip der bildgebenden Biolumineszenz	34
3.8.2. Aufbau des Messsystems	35
3.8.3. Durchführung der Messung	36
3.8.4. Auswertung	40
3.9. Statistische Auswertung.....	41
4. Ergebnisse	43
4.1. Charakterisierung von Tumorwachstum und Nekrosenbildung	43
4.1.1. Analyse des Tumorwachstums	43
4.1.2. Grafische Nekroseanalyse	44
4.2. Charakterisierung des Expressionsmusters von MCT1, MCT4 und CD147	45
4.2.1. Immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten.....	46
4.2.2. Immunhistochemische Färbung kultivierter Zellen	53
4.2.3. Western Blot.....	55
4.3. Charakterisierung des Metabolitstatus mittels Biolumineszenz.....	56
5. Diskussion.....	61
5.1. Charakterisierung von Tumorwachstum und Nekrosenbildung	61
5.2. Charakterisierung des Expressionsmusters von MCT1, MCT4 und CD147	64
5.2.1. Unterschiede der Expressionsmuster von OC316 und IGROV-1	64
5.2.2. Auswirkung von AZD3965 auf die Expression der Zielproteine.....	66
5.2.3. Diskussion der Western Blot-Methodik	68
5.3. Charakterisierung des Metabolitstatus mittels Biolumineszenz.....	70
5.3.1. Unterschiede der Metabolitstatus von OC316 und IGROV-1	70
5.3.2. Auswirkung von AZD3965 auf den Metabolitstatus behandelter Tumoren	73
5.4. Ausblick.....	75
6. Zusammenfassung.....	77
7. Literaturverzeichnis.....	79

8. Anhang.....	89
8.1. Protokolle im Rahmen des Western Blot-Verfahrens	89
8.1.1. Proteinextraktion aus Gewebe.....	89
8.1.2. Proteinbestimmung mittels BCA.....	89
8.1.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	90
8.1.4. Semi-Dry-Blot	90
8.1.5. Blockierung und Antikörperinkubation.....	90
8.1.6. Immundetektion	91
8.1.7. Strippen der Western Blot-Membranen.....	91
8.2. Chemikalien.....	92
8.3. Geräte und Materialien	94
8.4. Puffer und Lösungen	96
8.5. Kits und Marker	98
8.5.1. Zusammensetzung der Biolumineszenz-Enzymkits	98
8.5.2. Kommerzielle Kits und Marker	100
8.6. Software und Plugins	100
9. Danksagung	103
10.Tabellarischer Lebenslauf.....	105

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Anh.	Anhang
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BRCA	Breast Cancer Tumorsuppressorgen
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CA	Carboanhydrase
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Deoxyribunukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EM-CCD	Electron multiplying - charge-coupled device
EMMPRIN	Extracellular matrix metalloproteinase inducer
ES	Eserserum
et al.	und andere
F	Farbwert
F-IHC	Fluoreszenz-Immunhistochemie
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FMN(H ₂)	Flavinmononukleotid (reduziert)
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glucosetransporter
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde

H ⁺	Wasserstoffproton
H ₂ CO ₃	Dihydrogencarbonat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEPA	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1α
HRP	Horseradish peroxidase
IHC	Immunhistochemie
ImBI	Induced metabolic Bioluminescence Imaging
k.A.	keine Angabe
K _i	Inhibitorkonstante
K _m	Michaelis-Menten Konstante
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LDH	Laktatdehydrogenase
MCT	Monocarboxylattransporter
Mg ²⁺	Magnesiumion
min	Minute(n)
MiPu	Milchpulver
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MW	Mittelwert
myc	myc Protoonkogen
n	Anzahl
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺ /NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NFO	NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase
O ₂	Sauerstoff
p	Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PFK-1	Phosphofruktokinase-1
R ²	Korrelationskoeffizient
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay

RKI	Robert Koch-Institut
ROS	Reactive oxygen species
S	Schwarzwert
s.	siehe
SCID	Severe combined immunodeficiency
SCLC	Small cell lung cancer
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC16	Solute Carrier Family 16
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Glucosemetabolismus benigner Zellen	5
Abbildung 2:	Chemische Struktur von AZD3965	16
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des vermuteten Wirkmechanismus von AR-C155858	19
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des Schnittprotokolls.....	26
Abbildung 5:	Exemplarische Darstellung der Nekroseanalyse zweier Tumormproben	28
Abbildung 6:	Auswertungsschema der computerbasierten Quantifizierung des IHC-Fluoreszenzsignals	31
Abbildung 7:	Intensitätsskala zur Auswertung DAB-gefärbter Kryoschnitte..	33
Abbildung 8:	Aufbau des Messsystems der induzierten Biolumineszenz	35
Abbildung 9:	Bildreihenfolge innerhalb einer Biolumineszenzmessung	38
Abbildung 10:	Biochemisches Reaktionsschema für die biolumineszenzbasierte Detektion von ATP	38
Abbildung 11:	Biochemisches Reaktionsschema für die biolumineszenzbasierte Detektion von Glucose	39
Abbildung 12:	Biochemisches Reaktionsschema für die biolumineszenzbasierte Detektion von Laktat	40
Abbildung 13:	Exemplarische Darstellung eines Boxplot-Diagramms	41
Abbildung 14:	Wachstumskurven der OC316- und IGROV-1-Xenotransplantate der Kontrollgruppen	43
Abbildung 15:	Repräsentative IHC-Färbungen der Proteine MCT1, MCT4 und CD147 an OC316 und IGROV-1-Kryoschnitten	47
Abbildung 16:	Expression der Proteine MCT1, MCT4 und CD147 in immunhistochemisch gefärbten Schnitten unbehandelter OC316- und IGROV-1-Tumoren	48

Abbildung 17:	Expression von MCT1 in immunhistochemisch gefärbten Schnitten unbehandelter und AZD3965-behandelter OC316- und IGROV-1-Tumoren	50
Abbildung 18:	Expression von MCT4 in immunhistochemisch gefärbten Schnitten unbehandelter und AZD3965-behandelter OC316- und IGROV-1-Tumoren	51
Abbildung 19:	Expression von CD147 in immunhistochemisch gefärbten Schnitten unbehandelter und AZD3965-behandelter OC316- und IGROV-1-Tumoren	52
Abbildung 20:	Expression von MCT1, MCT4 und CD147 immunhistochemisch gefärbter unbehandelter OC316- und IGROV-1-Zellen..	53
Abbildung 21:	Expression von MCT1 (A), MCT4 (B) und CD147 (C) in immunhistochemisch gefärbten unbehandelten und AZD3965-behandelten OC316- und IGROV-1-Zellen	54
Abbildung 22:	Nachweis der Proteinexpression von MCT1, MCT4 und CD147 in murinen Geweben und Matrigel	56
Abbildung 23:	Repräsentative Darstellung von HE-Färbungen und falschfarbenkodierte Biolumineszenzbildern ausgewählter OC316- und IGROV-1-Experimentaltumoren	57
Abbildung 24:	Gegenüberstellung der Biolumineszenz-Messungen von Schnittserien unbehandelter OC316- und IGROV-1-Xenografts	58
Abbildung 25:	Laktatgehalt in Kryoschnitten unbehandelter OC316- und IGROV-1-Tumoren in Bezug auf ihren Nekroseanteil	59
Abbildung 26:	Biolumineszenz-Messungen von Schnittserien unbehandelter und AZD3965-behandelter OC316- und IGROV-1-Xenografts	60

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Histomorphologische Einteilung epithelialer Ovarialtumoren ...	3
Tabelle 2:	Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms	4
Tabelle 3:	Zusammenfassung der pathophysiologischen Charakteristika von MCT1 und MCT4 in unterschiedlichen Tumorentitäten	12
Tabelle 4:	Zusammenfassung der biochemischen und physiologischen Charakteristika von MCT1 und MCT4	13
Tabelle 5:	Übersicht des Probenkollektivs aus OC316- und IGROV-1-Tumoren	24
Tabelle 6:	Primär- und Sekundärantikörper der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen	30
Tabelle 7:	Verwendete Polarisationsfilter am Keyence 8000-BZK	31
Tabelle 8:	Primär- und Sekundärantikörper der DAB-Immunhistochemie	32
Tabelle 9:	Metabolitspezifische Inkubations- und Messzeiten	37
Tabelle 10:	Prozentualer Anteil intratumoraler Nekroseareale an der Gesamtfläche von OC-316- und IGROV-1-Tumoren	45
Anh. Tabelle 1:	Primär- und Sekundärantikörper des Western Blot-Verfahrens	91

1. Einleitung

Mit insgesamt 231.318 Todesfällen im Jahr 2019 bilden bösartige Neubildungen nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems weiterhin die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2019). Zwar haben bisherige Ergebnisse der Krebsforschung zu vielversprechenden Therapieansätzen in der Krebsbekämpfung geführt, jedoch beschränken sich diese oft nur auf einen kleinen Anteil der großen Gruppe maligner Neoplasien.

Grund hierfür ist die Heterogenität einer jeden Krebserkrankung als Resultat einer komplexen Tumorgenese. Denn im Rahmen der bösartigen Entartung einer Zelle kann diese vielfältige Eigenschaften als Basis ihrer Malignität erlangen.

Auf der einen Seite zählen hierzu Faktoren, die eine aggressive Ausbreitung des Tumors in Form einer schnellen Volumenzunahme, Gewebeinvasion und Metastasierung ermöglichen. Unterstützend wirken hierbei beispielsweise die Aufrechterhaltung proliferativer Signale, die Adjustierung des Tumormetabolismus sowie die tumorinduzierte Gefäßneubildung. Auf der anderen Seite führen diverse Tumormerkmale zur Störung wachstumsinhibierender Signalwege und der extrinsischen und intrinsischen Kaskaden des programmierten Zelltods sowie zur Umgehung der Detektion und Eradikation von Tumorzellen durch das Immunsystem (Hanahan und Weinberg, 2011).

Das Zusammenspiel von aggressiver Wachstumsinduktion und Vermeidung von Tumordestruktion bietet Krebszellen somit ein nahezu unlimitiertes replikatives Potential.

Zwar ergibt sich aus der Vielzahl tumorcharakterisierender Merkmale eine große Diversität bösartiger Neubildungen, doch ermöglicht die Kenntnis und Identifizierung der einzelnen Tumorbiologie eine neue Form der spezifischen Krebsbehandlung.

In Form einer Präzisionstherapie lassen sich die oben beschriebenen Tumormerkmale zunächst auf molekularer Ebene charakterisieren und anschließend mit speziellen Medikamenten gezielt ansteuern und behandeln.

Eine solche Präzisionstherapie ist mit der Entwicklung des Inhibitors Imatinib zur Behandlung der chronisch myeloische Leukämie bereits gelungen und übertrifft mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von über 80% alle bisherigen Therapieschemata dieser Erkrankung. Angriffspunkt dieses Hemmstoffs ist eine durch Mutation entstandene unregulierte Tyrosinkinase und deren dauerhafte Transduktion proliferativer

1. Einleitung

Signale, sodass durch Imatinib die massive Krebszellvermehrung aufgehalten werden kann (Hochhaus et al., 2017).

Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung des Inhibitors AZD3965, welcher auf einen weiteren spezifischen Angriffspunkt innerhalb der Entstehung maligner Neoplasien wirkt.

Aufgrund der spezifischen Hemmung eines Laktattransporters richtet sich AZD3965 indirekt gegen den charakteristischen Metabolismus maligner Tumorzellen, welcher durch eine hohe Laktatproduktionsrate gekennzeichnet ist (Sattler et al., 2007b).

Das Probenmaterial für diese Untersuchung stellen Experimentaltumoren zweier Ovarialkarzinomzelllinien dar. An diesen wurde die direkte Hemmstoffwirkung auf die Expression der stoffwechselrelevanten Transporter durch immunhistochemische Verfahren charakterisiert und die indirekte Beeinflussung des intratumoralen Metabolitstatus untersucht. Letzteres erfolgte mittels bildgebender Biolumineszenz, welche eine arealspezifische Abbildung der Metabolitverteilung im Tumorgewebe ermöglicht (Walenta et al., 2002).

2. Literaturdiskussion

2.1. Das Ovarialkarzinom

Bei Ovarialkarzinomen handelt es sich um bösartige Neubildungen der Eierstöcke, welche ihren Ursprung in entarteten epithelialen Zellen besitzen. Die histomorphologische Unterteilung dieser epithelialen Tumoren ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Histomorphologische Einteilung epithelialer Ovarialtumoren
nach Schwarz et al., 2013

	Epitheliale Ovarialtumoren	
Häufigkeit unter allen Ovarialtumoren	65-70 %	
Davon maligne	90 %	
Typen	<ul style="list-style-type: none"> • serös • muzinös • endometrioid 	<ul style="list-style-type: none"> • hellzellig • kleinzellig • u.a.

Das Risiko für die Entwicklung eines solchen bösartigen Ovarialtumors steigt mit zunehmendem Alter, wobei Adipositas, eine BRCA1/2 Genmutation sowie hormonelle Faktoren wie Kinderlosigkeit und Unfruchtbarkeit ebenfalls Risikofaktoren bilden (Robert Koch Institut, 2019).

In der westlichen Welt bilden Ovarialkarzinome die zweithäufigste gynäkologische maligne Erkrankung mit der höchsten Letalität (Cortez et al., 2018). Die schlechte relative 5-Jahres Überlebensrate dieser Tumorentität von 43% steht in Zusammenhang mit einer späten Diagnosestellung (Robert Koch Institut, 2019). In Ermangelung eines geeigneten Screeningverfahrens und aufgrund einer symptomarmen Anfangsphase findet diese in 70% der Erkrankungsfälle erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium statt, sodass die Patientin in der Regel nicht mehr kurativ behandelbar ist (Cortez et al., 2018; Kanzow et al., 2018).

Zur Einteilung der Tumorausbreitung wurde die FIGO-Klassifizierung (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) etabliert, welche sich in Tabelle 2 findet.

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms

nach Schwarz et al., 2013

TNM	FIGO	Befundbeschreibung
T1	I	Tumor auf Ovarien begrenzt
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovar(ien) und breitet sich im Becken aus
T3 und/oder N1	III	Zusätzlich Nachweis von mikro- oder makroskopischen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (ausgenommen Peritonealmetastasen)

Das Standardverfahren zur Behandlung eines Ovarialkarzinoms setzt sich nach aktueller Leitlinie aus einer maximalen operativen Resektion des Tumors und einer stadienadaptierten adjuvanten platinbasierten Chemotherapie zusammen (AWMF online, 2020). Trotz der hohen Strahlensensitivität des Ovarialkarzinoms gehört eine Radiotherapie nicht zur first-line Therapie dieser Tumorentität, da die Nähe zu weiteren strahlenempfindlichen Organen in der Abdominalregion ein zu hohes Risiko für eine Strahlenschädigung physiologischer Gewebe birgt (Dohr et al., 2008).

In den letzten Jahren hat sich die oben beschriebene Therapie nicht nur auf dem operativen Gebiet weiterentwickelt, sondern vor allem auf dem Feld der zielgerichteten medikamentösen Therapie (Kanzow et al., 2018; Sehouli und Höffken, 2019). Die Prognose des Ovarialkarzinoms ist - verglichen mit anderen Tumorentitäten - dennoch weiterhin schlecht, da selbst bei optimaler Primärtherapie die Mehrzahl der Patientinnen im Verlauf ein Rezidiv erleidet (Buderath und Kimmi, 2021). Dies erfordert weitere molekularbiologische und genetische Forschung und die Entwicklung adaptierter Medikation, die zielgerichtet molekularbiologische, genetische und metabolische Eigenschaften des Tumors beeinflusst.

Um auf diese Eigenschaften mit klinischem Vorteil wirken zu können, ist ein genaues Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen und Kontexte nötig.

Da sich diese Arbeit mit der Wirkung eines Hemmstoffs auf den Stoffwechsel sowie auf die Expression stoffwechselrelevanter Proteine ovarieller Tumorzellen beschäftigt, wird im Folgenden zuerst ein Überblick über die metabolischen Besonderheiten

von Tumorzellen jeglicher Entität gegeben, um anschließend genauer auf den Wirkmechanismus des Hemmstoffs eingehen zu können.

2.2. Unterschiede im Metabolismus benigner und maligner Zellen

2.2.1. Glucosemetabolismus benigner Zellen

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die Energiegewinnung aus Glucose in mammalischen Zellen in zwei Teilschritten. Den ersten Abschnitt bildet die Glykolyse, in welcher Glucose unter ATP-Generierung zu Pyruvat abgebaut wird (s. Abb. 1).

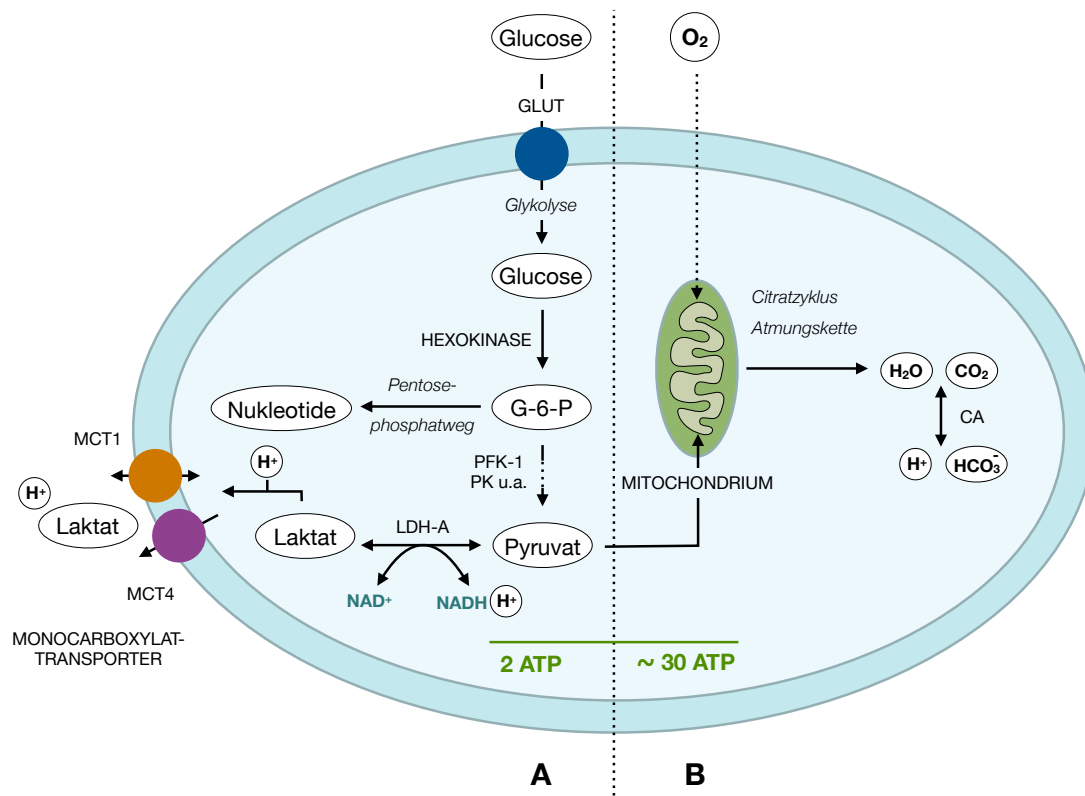


Abbildung 1: Glucosemetabolismus benigner Zellen

Glucose und Sauerstoff erreichen die Zelle über Diffusion. Über spezifische Transporter (GLUTs) wird Glucose in die Zelle aufgenommen und in der Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt. Pro Glucosemolekül ergibt sich dabei eine Energieausbeute von 2 ATP. Intermediate der Glykolyse werden unter anderem im Pentosephosphatweg zur Generierung von Nucleotiden benötigt. Unter aeroben Bedingungen (B) wird Pyruvat im Citratzyklus und der Atmungskette zu H₂O und CO₂ abgebaut. Über die genaue Energiebilanz dieses Stoffwechselwegs herrscht Uneinigkeit in der Literatur. Der vollständige aerobe Abbau von einem Molekül Glucose ergibt jedoch ca. die 15-fache ATP-Menge der anaeroben Glykolyse. In Abwesenheit von Sauerstoff (A) wird Pyruvat zu Laktat reduziert. Dieses kann nun im Symport mit einem Proton über Monocarboxylattransporter (MCT) die Zelle verlassen.

PFK-1 = Phosphofruktokinase-1; PK = Pyruvatkinase; LDH-A = Laktatdehydrogenase-A;

CA = Carboanhydrase;

Modifiziert nach Gatenby und Gillies, 2004.

Diese Reaktion kann sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen ablaufen. Hingegen kann nur in Anwesenheit von Sauerstoff eine weitere Verstoffwechslung von Pyruvat unter Energiegewinnung in der mitochondrialen Atmungskette erfolgen, während unter anaeroben Bedingungen Pyruvat ohne weitere ATP-Ausbeute zu Laktat abgebaut wird (s. Abb. 1).

Die Metabolisierung über oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette ergibt dabei die etwa 15-fache ATP-Menge der glykolytischen Energiegewinnung. Zur Deckung ihres Energiebedarfs benötigt eine Zelle mit ausreichendem Sauerstoffangebot somit eine deutlich geringere Metabolisierungsrate von Glucose, sodass aerobe Verhältnisse in den meisten Zellen zu einer Inhibition der Glykolyse über Hemmung des Schrittmacherenzym Phosphofruktokinase führen. Dieser Mechanismus wird nach seinem Erstbeschreiber auch „Pasteur-Effekt“ genannt (Gatenby und Gillies, 2004).

2.2.2. Glucosemetabolismus maligner Tumoren

Im Rahmen der malignen Entartung unterlaufen die meisten Tumorzellen einer deutlichen Veränderung ihres Stoffwechsels hin zu einem erhöhten glykolytischen Metabolismus (Hanahan und Weinberg, 2011). Zum einen ist das Vorliegen einer Gewebhypoxie bzw. einer fluktuierenden Oxygenierung ein Charakteristikum der meisten soliden Tumoren und resultiert in einer metabolischen Adaptation an den Sauerstoffmangel (Hardee et al., 2009; Bola et al., 2014). Zum anderen erfolgt in der Tumorzelle über onkogene Transformation eine Überexpression glucosetransportierender und -umsetzender Enzyme und somit selbst bei Anwesenheit von Sauerstoff ein Abbau von Glucose zu Laktat (Altenberg und Greulich, 2004; Hirschhaeuser et al., 2011; Pavlova und Thompson, 2016). Dieses Phänomen der sogenannten „aeroben Glykolyse“ wurde bereits in den Zwanziger Jahren des 20. Jahrhunderts durch den Wissenschaftler Otto Warburg beobachtet und beschrieben (Warburg und Minami, 1923; Warburg, 1924).

Durch diesen neuen metabolischen Status zeichnet das Tumorgewebe somit eine hohe Laktatakkumulation mit deutlicher Gewebeazidose aus (Sattler et al., 2007b).

Es ist noch nicht allumfassend geklärt, aus welchem Grund eine maligne Transformation von Zellen mit der Umstellung auf eine aerobe Glykolyse einhergeht. Zumal diese - bezogen auf ein Molekül Glucose - eine deutlich geringere Energieausbeute liefert als der Abbau von Pyruvat über die oxidative Phosphorylierung und ursächlich

ist für eine zunehmende, potenziell zytotoxische Azidität des Gewebes (Gatenby und Gillies, 2004) (s. Abb. 1).

Es existieren mehrere Theorien über die Ursachen und Vorteile dieses Phänomens, die sich in drei Gruppen unterteilen lassen und im Folgenden erläutert werden.

2.2.2.1. Veränderter Tumormetabolismus als Anpassungsmechanismus

Zum einen werden biochemische und strukturelle Ursachen im Tumorgewebe für die Stoffwechseländerung verantwortlich gemacht.

So postulierte der Wissenschaftler Otto Warburg bereits, dass die glykolytische Stoffwechsellage bei aeroben Bedingungen auf eine Störung der Mitochondrien und damit der Atmungskette zurückzuführen sei (Warburg, 1956). Diese Hypothese eines Mitochondriendefekts konnte jedoch widerlegt werden, da gezeigt werden konnte, dass Tumorzellen mitochondriale metabolische Kapazität besitzen und ihren Energiebedarf gleichermaßen über eine oxidative Phosphorylierung decken können (Moreno-Sanchez et al., 2007; Parks et al., 2020). Abhängig von der Oxygenierung des Tumorzellareals zeigen einige ausreichend oxygenierte Tumorzellen dabei auch einen primär oxidativen Metabolismus (Sonveaux et al., 2008).

Somit ist die Tumorzelle nicht auf die Glykolyse als Alternativstoffwechsel zur Atmungskette angewiesen. Vielmehr erfolgt die metabolische Umstellung aufgrund der Aktivität von Onkogenen und des Funktionsverlusts von Tumorsuppressorgenen, wie beispielsweise myc, EGF, mTOR, KRAS oder HIF1 α (Levine und Puzio-Kuter, 2010; Boroughs und DeBerardinis, 2015).

Zum anderen wird vermutet, dass die Umstellung auf den primär glykolytischen Stoffwechsel ursprünglich eine Adaption auf eine intermittierende Hypoxie in prä-malignen Läsionen darstellen könnte, da die Karzinogenese zunächst separiert in einem avaskularisierten Stroma und die Tumorversorgung lediglich über Diffusion stattfindet (Gatenby und Gillies, 2004). Durch die Hypoxie stabilisiert, erfolgt über den Transkriptionsfaktor HIF-1 α eine Aktivierung glykolytischer Enzyme, eine Suppression mitochondrialer Gene sowie eine Induktion der Angiogenese (Kim et al., 2007; Xie und Simon, 2017).

In diesem Zusammenhang ist auch die Frage zu beantworten, weshalb die hohe glykolytische Pyruvatproduktion nicht zu einem gesteigerten Umsatz in der energieliefernden oxidativen Phosphorylierung führt, sondern Pyruvat zu Laktat abgebaut wird.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die hohe Glykoyserate die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit der Oxidierung von Pyruvat erreicht ist. Um eine Akkumulation des stetig anfallenden Pyruvats zu vermeiden, ist die Zelle auf die schnelle Umsetzung von Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase (LDH-A) angewiesen. Gleichzeitig erfolgt durch diesen Schritt die Generierung von NAD^+ , welches als Redoxpartner einer erneuten glykolytischen Reaktion zugeführt wird, während das Abbauprodukt Laktat leicht aus der Zelle transportiert werden kann (DeBerardinis et al., 2008).

2.2.2.2. Veränderter Tumormetabolismus als Wachstumsvorteil

Ein weiterer Aspekt, der für einen Wechsel des Tumors zum glykolytischen Stoffwechsel spricht, ist in der hohen tumoralen Proliferationsrate zu sehen. Für das schnelle Wachstum benötigt der Tumor die entsprechende Versorgung mit Synthesebausteinen sowie Expansionsmöglichkeiten, die über die aerobe Glykolyse gestellt werden können.

Zum einen liefert die Glykolyse Intermediate, welche für weitere biosynthetische Wege und damit für ein Tumorwachstum benötigt werden (s. Abb.1). So entstehen durch Verstoffwechslung dieser Zwischenprodukte unter anderem Nukleotide, Aminosäuren, Lipide sowie NADPH als wichtiger Mediator antioxidativer Reaktionen (Hirschhaeuser et al., 2011; Boroughs und DeBerardinis, 2015; Semenza, 2017). Zudem ist die ständige Regeneration von NAD^+ in der Reduktion von Pyruvat zu Laktat ein wichtiger Faktor für die Zellproliferation, für welche zur Nukleotidsynthese ein hoher NAD^+/NADH -Quotient benötigt wird (Vander Heiden und DeBerardinis, 2017). Zum anderen induziert die hohe Laktatkonzentration eine Stabilisation des Transkriptionsfaktors $\text{HIF1}\alpha$, welcher somit selbst bei normoxischen Bedingungen akkumuliert und beispielsweise über die Transkriptionsaktivierung des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) die hypoxieunabhängige Angiogenese und damit ein weiteres Wachstum des Tumors befördert und eine Metastasierung ermöglicht (Lu et al., 2002; Sonveaux et al., 2012; Parks et al., 2020).

Zudem induziert $\text{HIF1}\alpha$ die Expression des Membrantransporters MCT4, welcher durch einen nach extrazellulär gerichteten Symport von Laktat und H^+ eine Übersäuerung des intrazellulären Milieus verhindert (Ullah et al., 2006). Die durch den MCT4-Export und weitere H^+ -Transporter entstehende extratumorale Azidität birgt

über Destruktion des Umgebungsgewebes und der damit einhergehenden erleichterten Invasion von Tumorzellen einen weiteren Wachstumsvorteil (Gatenby und Gillies, 2004; Ferreira et al., 2012; Coman et al., 2016).

Ein erleichterter Invasionsmechanismus ergibt sich zudem durch die laktatvermittelte Steigerung der Zell-Motilität sowie der Stimulation tumorassoziierter Fibroblasten zur Produktion einer hyaluronhaltigen Extrazellulärmatrix, mit welcher eine weitere Steigerung der Zell-Motilität einhergeht (Stern et al., 2002; Goetze et al., 2011).

2.2.2.3. Veränderter Tumormetabolismus als Resistenzmechanismus

Einer der klinisch deutlichsten Vorteile des veränderten Tumormetabolismus ist jedoch die dadurch erworbene Resistenz gegenüber zellschädlichen Konditionen.

So wird dem Tumor selbst in hochpathologischem Milieu ein Überleben - sogar ein weiteres Wachstum - ermöglicht.

Aufgrund der hohen Laktatakkumulation und Azidität im Gewebe erhält der Tumor einen deutlichen Selektionsvorteil, welcher bereits in einigen Entitäten mit hoher intratumoraler Laktatkonzentration in Form einer signifikant höheren Malignität und Aggressivität des Tumors belegt werden konnte (Walenta et al., 2000; Brizel et al., 2001; Walenta et al., 2003; Walenta et al., 2004; Vlachostergios et al., 2015). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind auch hier noch nicht gänzlich aufgeklärt.

Bekannt ist die antioxidative Wirkung von Laktat, welche bei erhöhter Akkumulation des Metaboliten zu einer Inaktivierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS: *reactive oxygen species*) führt. Diese ROS bilden durch Fixierung induzierter DNA-Schäden die Wirkgrundlage ionisierender Strahlung, eine der Säulen konventioneller Krebstherapie. So kann über die Ausschaltung dieses Mechanismus ein Überlebensvorteil stark glykolytisch metabolisierender Hochlaktattumoren durch reduzierte Strahlensensibilität sowie Chemoresistenz gegenüber ROS-induzierenden Medikamenten erklärt werden (Sattler et al., 2010; Hirschhaeuser et al., 2011).

Zudem besitzt Laktat bei erhöhter Akkumulation im Tumorgewebe eine potente immunsuppressive Funktion. Zytotoxische CD8⁺-T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen besitzen ebenfalls einen hochglykolytischen Stoffwechsel und sind damit auf einen Export des dabei produzierten Laktats angewiesen.

2. Literaturdiskussion

Eine erhöhte peritumorale Laktatkonzentration bewirkt somit einen verminderten chemischen Laktatgradienten und eine zytotoxische Laktatakkumulation im Intrazellulärraum der Immunzellen mit negativer Konsequenz für deren bioenergetisches Profil und ihre zytotoxische Wirksamkeit (Ferreira et al., 2012; Fischbeck et al., 2020). In der Untersuchung von CD8⁺-T-Lymphozyten zeigte sich dies in einer eingeschränkten Motilität, Zytokinproduktion und Degranulation dieser Zellen (Brand et al., 2016; Fischbeck et al., 2020). Überdies inhibiert die hohe peritumorale Laktatkonzentration die monozytäre Migration und Differenzierung zu dendritischen Zellen, sowie deren Zytokinausschüttung (Goetze et al., 2011).

Neben der Resistenz gegenüber radio- und chemotherapeutischen Ansätzen limitiert ein solches Tumormilieu somit auch die Erfolge immunologischer Krebstherapien, wie beispielsweise der adoptiven T-Zell-Therapie (Pillai et al., 2019; Fischbeck et al., 2020).

Des Weiteren besitzen maligne Tumoren eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber chemisch induzierter Azidotoxizität (Gatenby und Gillies, 2004). Dies mag darin begründet sein, dass durch den hochglykolytischen Stoffwechsel bereits eine hohe Zellazidität vorliegt, auf welche durch Überexpression von Proteinen aus der Familie der H⁺-Transporter reagiert wird (Martinez-Zaguilan et al., 1993; Gatenby und Gillies, 2004). So liegen in der Tumorzelle bereits Kompensationsmechanismen vor, um einer induzierten Azidotoxizität zu begegnen.

Zu beachten ist hierbei auch der positive Rückkoppelungsmechanismus, welcher durch einen Export von H⁺-Ionen auf die Glykolyse hervorgerufen wird, da die damit einhergehende Alkalisierung des Zellinneren eine Aktivierung des Enzyms Phosphofruktokinase-1 bewirkt (Erecinska et al., 1995).

Auch wenn die Hypothese Warburgs über die Ursache der metabolischen Umprogrammierung in Tumorzellen bereits widerlegt werden konnte, wird in den vorangegangenen Abschnitten nochmals deutlich, dass der Fokus auf einen glykolytischen Metabolismus kein reiner Anpassungsmechanismus auf einen defekten mitochondrialen Stoffwechsel oder andauernde hypoxische Bedingungen ist.

Obwohl in der Theorie die glykolytische ATP-Ausbeute pro Mol Glucose im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung gering ausfällt, hat sich gezeigt, dass durch einen gesteigerten Glucosetransport in die Tumorzelle und eine hohe Glucoseumsatzrate

die Energiegewinnung der oxidativen Phosphorylierung entsprechen kann (Warburg, 1956).

Neben der bioenergetischen Versorgung des Tumors bei ausreichendem Glucosefluss wird über die Glykolyse der biosynthetische Bedarf der Zelle über Bereitstellung proliferationsrelevanter Intermediate und Gewährleistung der Redoxbalance gedeckt. Des Weiteren geht die starke Akkumulation von Laktat aus diesem Stoffwechselweg mit der Ausbildung weiterer Wachstumsvorteile sowie unterschiedlicher Resistenzmechanismen einher.

Zur Aufrechterhaltung dieser Selektionsvorteile ist jedoch eine suffiziente Homöostase des intrazellulären Milieus erforderlich. Insbesondere gilt es, den Export des anfallenden Laktats genau zu regulieren, um eine toxische intrazelluläre Konzentration zu vermeiden und die Selektionsvorteile der erhöhten peritumoralen Laktatkonzentration zu bewahren. Gleichzeitig ist der Erhalt eines alkalischen Zellinneren von Bedeutung, um einen weiteren glykolytischen Stoffwechsel zu ermöglichen (Park et al., 2018).

In diesem Zusammenhang kommt der Expression von Monocarboxylattransportern (MCT) eine entscheidende Funktion zu, welche im folgenden Kapitel erläutert wird.

2.3. Monocarboxylattransporter

Monocarboxylattransporter stellen eine Gruppe transmembraner Proteine aus der Gruppe der SLC16-Genfamilie (SLC: *solute carrier*) dar. Innerhalb dieser Gruppe finden sich 14 Isoformen (MCT1-14), wobei allen die Anzahl von 12 Transmembrandomänen gemein ist. Bisher sind nicht alle dieser Isoformen detailliert beschrieben worden, sodass bei einigen Transportern noch immer Unklarheit über ihre Substrate und physiologische Funktion herrscht. Bekannt ist soweit, dass die Subtypen MCT1-4 einen protonengekoppelten Transport betreiben und sich dabei in Substrataffinität, Vorkommen und Regulation unterscheiden (Halestrap, 2012).

Tabelle 3: Zusammenfassung der pathophysiologischen Charakteristika von MCT1 und MCT4 in unterschiedlichen Tumorentitäten

nach Chen et al., 2010; Pinheiro et al., 2012; Park et al., 2018 und Spina et al., 2020

	Überexpression in den Tumorentitäten:	Bereits beschriebene Assoziation von Überexpression und verschlechterter Tumorprognose:
MCT1	Brust, ZNS, Kopf und Hals, Lunge, Prostata, Harntrakt, Pankreas, Magen, Knochen, Mundhöhle, Kolon, gynäkologischer Trakt	Blasenkrebs, Endometriumkarzinom, klarzelliges Nierenkarzinom, Ovarialkarzinom
MCT4	Prostata, Ovar, Zervix, Lunge, Brust, Kolon, Knochen, Niere, Mundhöhle	Mundhöhlenkrebs, kolorektale Tumore, Prostatakazinom, Lungenkrebs, klarzelliges Nierenkarzinom, Ovarialkarzinom, Glioblastom

Da diese Transporter sowohl für die Bereitstellung essenzieller Substrate als auch für die Homöostase des intrazellulären Milieus von außerordentlicher Bedeutung sind, werden Monocarboxylattransporter ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert.

In humanen Krebszellen einiger Entitäten findet sich dabei eine Überexpression der Transporter MCT1 und MCT4 (s. Tabelle 3), eine Erkenntnis, die bei einigen dieser Tumorerkrankungen mit einer verschlechterten Prognose einhergeht (Pinheiro et al., 2012; Park et al., 2018; Spina et al., 2020). Für epitheliale Ovarialkarzinome konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von MCT1 und MCT4 signifikant mit dem Tumorprogress, beschrieben durch Stadium und Grading des Karzinoms, korreliert (Chen et al., 2010).

Diese beiden Subtypen transportieren Monocarboxylate wie Laktat, Pyruvat und Ketonensäuren im Symport mit einem Proton (s. Tabelle 4), wobei ihre höchste Affinität Laktat gilt, jedoch nur für das L-Stereoisomer (Halestrap, 2012).

Tabelle 4: Zusammenfassung der biochemischen und physiologischen Charakteristika von MCT1 und MCT4
nach Halestrap, 2013

	Hauptsubstrate	K _m -Wert Laktat	Vorkommen	Richtung des Laktattransports
MCT1	L-Laktat Pyruvat Ketonkörper	3,5 - 10 mM	Ubiquitär mit Ausnahme der pankreatischen β -Zellen	bidirektional
MCT4	L-Laktat Pyruvat	22 - 28 mM	Skelettmuskel, Chondrozyten, Leukozyten, Hoden, Lunge, Gehirn, Ovarien, Plazenta, Herz	Export

2.3.1. MCT1

MCT1 stellt aufgrund seiner Prädominanz in den meisten Geweben den quantitativ wichtigsten Transporter der SLC16-Genfamilie dar (s. Tabelle 4). Seine Expression ist, mit Ausnahme der pankreatischen β -Zellen, für fast alle menschlichen Gewebearten beschrieben (Halestrap, 2013).

Über MCT1 ist - abhängig vom Konzentrationsgradienten der Metabolite - ein bidirektionaler Transport möglich. Zellen mit oxidativem Metabolismus nutzen eine vermehrte Expression dieses Transporters für einen Import von Laktat, welches über eine Oxidation zu Pyruvat im Citratzyklus weiter verstoffwechselt werden kann.

Unter hypoxischen Bedingungen bzw. in Zellen, welche aufgrund eines hochglykolytischen Stoffwechsels eine erhöhte Laktatakkumulation aufweisen, wirkt MCT1 hingegen als Laktatexporter (Halestrap, 2013).

Dieser bidirektionalen Transportfunktion von MCT1 wird eine Schlüsselrolle im Laktatshuttle zwischen Tumorzellen und ihrem umgebenden Gewebe zugeschrieben. Glykolytische Tumorzellen stellen ihr Abbauprodukt Laktat dem peritumoralen Stroma und oxygenierten Tumorzellen über einen MCT1-vermittelten Export zur Verfügung, welche dieses über einen MCT1-Import in ihren oxidativen Stoffwechselweg einspeisen können (Sonveaux et al., 2008).

2.3.2. MCT4

MCT4 wird vornehmlich in glykolytisch metabolisierenden Zellen, wie beispielsweise weißer Skelettmuskulatur, Chondrozyten und Leukozyten, exprimiert (s. Tabelle 4)

und besitzt hauptsächlich eine Exportfunktion (Halestrap, 2012; Jones und Morris, 2016).

Mit einem K_m -Wert von 22–28 mM besitzt MCT4 unter allen Laktattransportierenden Isoformen die geringste Affinität zu Laktat (vgl. MCT1: 3,5–10 mM), zeigt aber eine hohe Umsatzrate (Perez-Escuredo et al., 2016). Auffällig ist zudem die geringe Affinität von MCT4 für Pyruvat. Für den Einbau dieses Transporters in Tumorzellen ist dies von Bedeutung, da somit der Export des Redoxpartners für die Oxidation von NADH zu NAD^+ eingeschränkt ist und ein hoher glykolytischer Stoffwechsel beibehalten werden kann (Halestrap und Wilson, 2012).

Aufgrund seiner Laktat-Exportfunktion kommt MCT4 eine wichtige Rolle bei der Vermeidung einer erhöhten intrazellulären Laktatakkumulation bei Gewebehypoxie bzw. gesteigertem glykolytischem Metabolismus zu. In diesem Zusammenhang konnten Ullah et. al. bereits zeigen, dass unter hypoxischen Konditionen eine Interaktion des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 α (HIF1 α) mit der MCT4-Promoterregion stattfindet und eine Überexpression des Transporters induziert wird (Ullah et al., 2006).

2.3.3. Ankerproteine und Modulation von MCT1 und MCT4

Der Membraneinbau und die Funktion von MCT1 und MCT4 sind abhängig von der Coexpression der Proteine CD147 (auch: EMMPRIN, Basigin, HT7 und OX-47) und gp170 (auch: Embigin), welche als Chaperone und Ankerproteine für die Monocarboxylattransporter MCT1–4 fungieren (Jones und Morris, 2016; Park et al., 2018). In ihrer Abwesenheit ist ein korrekter Einbau der MCTs in die Plasmamembran nicht möglich und resultiert in einer Akkumulation der Transportproteine im Golgiapparat (Wilson et al., 2005).

Für die Transporter MCT1, 3 und 4 zeigte sich dabei eine stärkere Interaktion mit CD147 als mit gp170, welches den primären Regulationspartner von MCT2 darstellt (Perez-Escuredo et al., 2016). Neben der Modulation durch die Expression von Chaperonen wird die Aktivität der Monocarboxylattransporter durch die Reaktion der Carboanhydrase II und IX reguliert, in welcher die Umsetzung von CO_2 und Wasser zu Bicarbonat und einem Proton katalysiert wird. Es wird vermutet, dass MCTs diese Reaktion über einen „Protonensensor“ erfassen und eine Anpassung ihrer Transportrate vornehmen (Jones und Morris, 2016). Allerdings erfordert diese Theorie bis zum detaillierten Verständnis der Interaktionsmechanismen noch weitere Untersuchungen.

2.4. Inhibition der Monocarboxylattransporter

MCT1 und MCT4, welche als Garanten intratumoraler Milieustabilisierung, multipler Resistenzmechanismen und Selektionsvorteile wirken, erscheinen als vielversprechende Zielobjekte zukünftiger Therapeutika. Aus diesem Grund gibt es in den unterschiedlichsten Gebieten der Krebsforschung Bestrebungen, diese Transporter weiter zu analysieren, um ihr mögliches Potential als Biomarker und prognostische Faktoren zu erörtern sowie effektive und spezifische Inhibitionen ihrer Expression, Lokalisation und Funktion zu entwickeln (Jones und Morris, 2016).

Aufgrund seiner quantitativen Bedeutung und Rolle innerhalb des Tumorstoffwechsels basiert der größte Anteil dieser pharmakotherapeutischen Forschung auf einer Inhibition des Transporters MCT1. Besonders wirkungsvoll ist eine solche Hemmung in Abwesenheit von MCT4 in glykolytisch metabolisierenden Tumoren. Da nicht alle Tumorentitäten die Isoform MCT4 exprimieren, hat eine MCT1-Inhibition bei Mangel an dieser alternativen Laktat-Exportmöglichkeit eine deutliche zytotoxische Konsequenz. Gleichzeitig fehlt oxidativ phosphorylierenden Tumorzellen über eine MCT1-Inhibition eine Importquelle für das Stoffwechseledukt Laktat und macht die Metabolisierung anderer Energiequellen wie Glucose nötig. Dies wiederum resultiert in einer gesteigerten Glykolyse mit erhöhter intrazellulärer Laktatkonzentration (Sonneaux et al., 2008; Doherty et al., 2014; Noble et al., 2017).

Während sich die Untersuchungen zur Hemmung anderer protonengekoppelter Monocarboxylattransporter bisher nur auf präklinische und *in vitro* Modelle beschränken, gibt es bereits erste klinische Studien zur MCT1-Inhibition.

Einige der ersten identifizierten Hemmstoffe dieser Isoform waren α -Cyano-4-Hydroxycinnamate (CHC) und Stilbendisulfonate, welche jedoch eine wesentlich potentere Inhibitionswirkung auf den mitochondrialen Pyruvattransporter bzw. auf den erythrozytären Anionenaustauscher AE1 zeigten (Halestrap und Denton, 1975; Salhany und Schopfer, 2001).

Eine neue Klasse spezifischer hochaffiner Inhibitoren mit einem K_i -Wert im nM-Bereich sind in den letzten Jahren vom Unternehmen AstraZeneca entwickelt worden. Die ursprüngliche Intention hinter der MCT1-Inhibition war die Induktion einer Immunsuppression durch Hemmung der T-lymphozytären Aktivierung und Proliferation (Guile et al., 2006; Ovens et al., 2010).

Zwei dieser Wirkstoffe (AR-C177977 und AR-C122982) zeigten vielversprechende *in vitro* Ergebnisse für den Einsatz an Tumorzellen, erreichten jedoch aufgrund ungenügender oraler Bioverfügbarkeit und kurzer Plasmahalbwertszeit keine klinische Relevanz (Park et al., 2018).

Auf Basis dieser Vorgänger folgten weitere Hemmstoffe mit verbessertem pharmakokinetischem Profil. Für AR-C155858, welcher MCT1 und 2 ohne Beeinflussung von MCT4 inhibiert und ursprünglich ebenfalls als Immunsuppressivum entwickelt worden war, konnte eine hemmende Wirkung auf Laktatexport sowie Glykolyse und Tumorwachstum in Ras-transformierten Fibroblasten gezeigt werden. Gleichzeitig wurde eine Resistenz gegen eine MCT1/2- Hemmung bei Expression des laktatexportierenden MCT4 deutlich (Le Floch et al., 2011).

Eine Variante von AR-C155858, AZD3965 besitzt das gleiche Inhibitionsspektrum bei 6-fach höherer Spezifität für MCT1 gegenüber MCT2 und wird als vielversprechender Wirkstoff zur Inhibition des Laktattransports vor allem in Tumorzellen mit fehlender bzw. geringer MCT4-Expression beschrieben (Polanski et al., 2014; Noble et al., 2017).

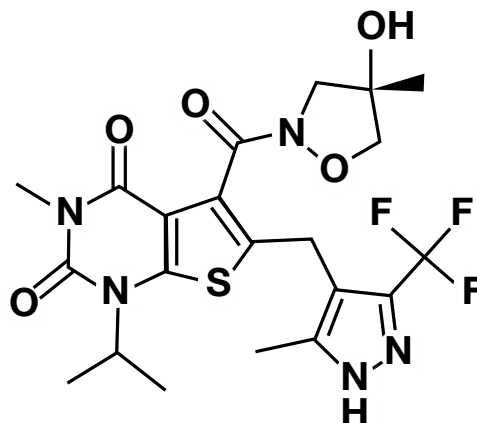


Abbildung 2: Chemische Struktur von AZD3965
nach Curtis et al., 2017

Insbesondere im hämatoonkologischen Einsatzbereich wurden für diesen Hemmstoff bereits eine antiproliferative Aktivität demonstriert. *In vitro* verursachte die MCT1-Inhibition einen supprimierten Laktatefflux mit reduzierter Proliferationsrate in Zellen des Non Hodgkin, Burkitt- und diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms. Auch *in vivo* konnte anhand eines Xenograftmodells des Raji-Burkitt-Lymphoms eine signifikante Wachstumsinhibition nachgewiesen werden (Curtis et al., 2017).

Des Weiteren zeigte sich in einem solchen Modell eine signifikante Zunahme der Infiltration des Tumorgewebes durch Immunzellen sowie eine Inhibition der tumoralen Lipidbiosynthese (Belouèche-Babari et al., 2020).

Vor diesem Hintergrund ist bereits eine Kombinationsmöglichkeit von AZD3965 mit Therapeutika wie Doxorubicin und Rituximab aus dem R-CHOP Standardschema zur Behandlung des Burkitt und diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms *in vitro* und *in vivo* mit positivem Resultat untersucht worden (Curtis et al., 2017).

Im Bereich solider Tumoren wurde die Wirkung von AZD3965 auf die Entität des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben. Besonders sensitiv zeigten sich dabei Zelllinien unter hypoxischen und damit obligat glykolytischen Bedingungen. Diese wiesen eine signifikante Reduktion der Zellzahl und einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Laktatkonzentration auf (Polanski et al., 2014). *In vivo* konnten die Effekte eines reduzierten Wachstums und einer Erhöhung des intratumoralen Laktats bereits nach siebentägiger Behandlungsdauer repliziert werden (Bola et al., 2014).

Bola et al. konnten zudem zeigen, dass eine AZD3965-Behandlung *in vitro* sowohl zu einer signifikanten Reduktion des zellulären ATP-Levels als auch zu einem hemmstoffabhängigen Anstieg der Glutathion-Disulfid-Konzentration unter hypoxischen Bedingungen führt. Letzteres weist auf eine Verschiebung des intrazellulären Redoxstatus hin, welche in einer nachweisbaren Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies resultiert. Bei Kombination von AZD3965 und Bestrahlung *in vivo* zeigte sich die Auswirkung dieses gesteigerten oxidativen Stresses in Form einer signifikant erhöhten Radiosensitivität (Bola et al., 2014).

Auch bei der *in vitro* und *in vivo* Anwendung von AZD3965 auf MCT4-negative Mammakarzinomzellen konnte eine Reduktion des Zell- bzw. Tumorwachstums beobachtet werden. Diese wurde *in vivo* von einer signifikanten Abnahme des Zellproliferationsmarkers Ki67 begleitet. Zudem zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine signifikante Zunahme der intrazellulären bzw. intratumoralen Laktatkonzentration unter AZD3965-Therapie (Guan und Morris, 2020).

Wie bereits für den Vorgängerhemmstoff AR-C155858 festgestellt, konnte auch für AZD3965 im Rahmen der Untersuchungen an SCLC-Tumoren eine Hemmstoffresistenz bei erhöhter MCT4-Expression gezeigt werden (Polanski et al., 2014). Bola et al. konnten ergänzend dazu eine signifikante hypoxieunabhängige Steigerung der

MCT4-Expression nach AZD3965-Behandlung nachweisen (Bola et al., 2014). Dies lässt vermuten, dass AZD3965-behandelte Tumoren eine solche Hemmstoffresistenz kompensatorisch erwerben können.

Einen weiteren möglichen Resistenzfaktor stellt die metabolische Reaktion AZD3965-behandelter Tumorzellen dar. In zwei *in vitro* Untersuchungen zur Behandlung mit AZD3965 und dem Vorgängerwirkstoff AR-C155858 konnte festgestellt werden, dass durch mehrwöchige Inhibitor-Therapie ein Shift vormals glykolytisch metabolisierender Tumorzellen zu einem oxidativ phosphorylierenden Stoffwechsel stattfindet (Doherty et al., 2014; Noble et al., 2017).

Zusammenfassend ist somit die höchste Effektivität in der Anwendung von AZD3965 für hypoxische bzw. hochglykolytische Tumoren bei geringer bis fehlender MCT4-Expression zu vermuten.

Basierend auf den erfolgsversprechenden präklinischen Resultaten wurde im Februar 2013 eine klinische Phase I-Studie im Vereinigten Königreich mit einem Kollektiv aus Patientinnen und Patienten mit soliden Tumoren, Burkitt Lymphom oder diffussem großzelligen B-Zell-Lymphom gestartet, welche zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen war (ClinicalTrials.Gov., Identifikationsnummer: NCT01791595).

Bisherige Vorveröffentlichungen dieser Studie beschreiben eine gute Verträglichkeit von AZD3965, wobei Übelkeit und Müdigkeit die am häufigsten berichteten Nebenwirkungen waren. Aufgrund der retinalen Expression von MCT1 wurde für fast alle Hemmstoffdosierungen anhand eines Elektoretinogramms eine reversible Änderung der retinalen Funktion in zeitlichem Zusammenhang mit der Einnahme beschrieben (Halford et al., 2017). Diese Beobachtung ist konsistent mit den Untersuchungsergebnissen von drei MCT1-Inhibitoren (u.a. AZD3965) im Tierexperiment. Auch hier wurde eine Beeinträchtigung der Sehschärfe sowie Veränderungen im Elektoretinogramm festgestellt, welche sich bereits unter Fortführung der Therapie partiell und sieben Tagen nach Beendigung der Behandlung vollständig zurückbildeten (Allen et al., 2020).

In einer weiteren Vorveröffentlichung wird jedoch auch über den Fall einer schweren hyperlaktämischen Azidose nach Gabe der ersten AZD3965-Dosis berichtet. Bei dem mittlerweile an seiner Krebserkrankung verstorbenen Patienten handelte es sich um einen 47-jährigen Mann mit metastasiertem Melanom, welcher bereits bei Studienbeginn erhöhte Laktatwerte im Urin aufwies.

Aufgrund des Wirkmechanismus des Medikaments und der zeitlichen Beziehung zu dessen Verabreichung wurde ein Zusammenhang zwischen der massiven Erhöhung des Plasmalaktatspiegels und der AZD3965-Gabe vermutet.

Da umfassende Untersuchungen des Patienten keine zugrundeliegende angeborene Stoffwechselstörung feststellen konnten, wird die wahrscheinlichste Ursache für die hyperlaktämische Azidose in einem tumoralen „Hyper-Warburgismus“ gesehen (McNeillis et al., 2020). Dieses Phänomen bezeichnet die hochgradige Glucoseaufnahme und -verstoffwechslung maligner Zellen mit dem Resultat einer chronischen Hypoglykämie und Hyperlaktämie (Elhomsy et al., 2012).

Entsprechende Screeningverfahren auf solche vorliegenden Störungen mit besonderer Beachtung des Ausgangswerts des Plasmalaktatspiegels wurden daraufhin etabliert und identifizierter Probandinnen und Probanden von der Studie ausgeschlossen (McNeillis et al., 2020).

Des Weiteren erfolgen Untersuchungen zur Charakterisierung des Hemmmechanismus von AZD3965. Für den Hemmstoff AR-C155858 ist dies bereits in größerem Umfang geschehen, wobei gezeigt werden konnte, dass dieser Inhibitor zur Ausbildung seiner Wirkung zunächst die Zellmembran passieren muss, um anschließend intrazellulär an MCT1 zu binden (s. Abb. 3). Die dabei involvierten Transmembrandomänen konnten festgestellt und als Bestandteil im Substratbindungs- und -translokationsprozess identifiziert werden (Ovens et al., 2010; Nancolas et al., 2015).

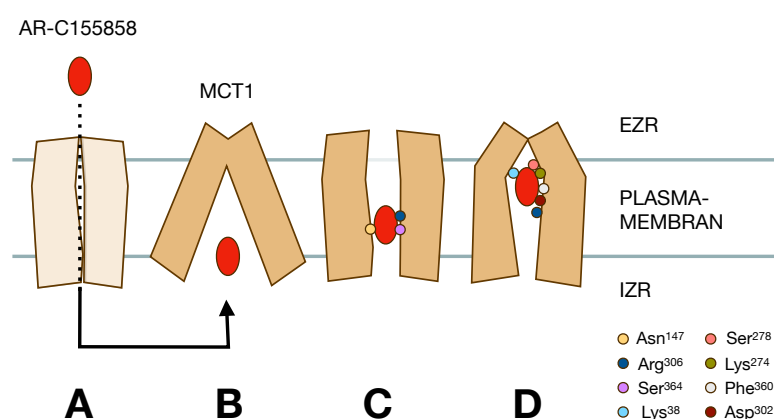


Abbildung 3: Schematische Darstellung des vermuteten Wirkmechanismus von AR-C155858

AR-C155858 passiert vermutlich MCT1-vermittelt (Guan et al., 2019) die Zellmembran (A) und interagiert mit dem zum Zellinneren geöffneten Transporter (B). Es bildet sich eine Zwischenkonformation (C), in welcher AR-C155858 an Transmembrandomänen (farbige Kreise) bindet. Eine erneute Konformationsänderung von MCT1 ermöglicht die weitere Bewegung des Hemmstoffs in Richtung der extrazellulären Transporterhälfte bei Interaktion mit weiteren Transmembrandomänen (D).

EZR: Extrazellulärraum; IZR: Intrazellulärraum.

Modifiziert nach Nancolas et al., 2015, ergänzt durch Guan et al., 2019.

In einer Vergleichsanalyse der beiden Inhibitoren AR-C155858 und AZD3965 zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Übergang der Hemmstoffe in die Tumorzelle. Während für AR-C155858 ein MCT1-vermittelter Transport nachgewiesen werden konnte, zeigte AZD3965 eine passive Diffusion in die Tumorzelle. Diese Beobachtung ist stimmig mit der deutlich höheren Lipophilie von AZD3965 (Guan et al., 2019).

2.5. Aufgabenstellung dieser Arbeit

Mit dieser Arbeit soll die Wirkung des MCT1-Hemmstoffs AZD3965 an einer weiteren soliden Tumorentität mit bekanntem glykolytischem Stoffwechsel untersucht werden.

Hierzu wurden Zelllinien zweier Ovarialkarzinome mit unterschiedlichem metabolischem Profil und Expressionsausmaß glykolyseassoziiierter Transporter ausgewählt. Zellen der Linie OC316 zeigen einen hochglykolytischen Metabolismus mit entsprechend hoher Laktatproduktion und Überexpression glykolytischer Enzyme sowie assoziierter Transporter, wie MCT4 und GLUT1. Die Zelllinie IGROV-1 besitzt einen niedrigeren glykolytischen Stoffwechsel mit geringerer Laktatproduktionsrate und signifikant geringerer Expression glykolytischer Enzyme. In der Expressionsdichte von MCT1 wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien beschrieben, jedoch findet sich in IGROV-1-Zellen eine um den Faktor 2 geringere Expression von MCT4. Aufgrund des hohen Glucoseverbrauchs im Rahmen eines hochglykolytischen Stoffwechsels zeigen OC316-Zellen verglichen mit IGROV-1 einen erniedrigten intratumoralen Glucosespiegel bei signifikant höherem ATP-Level (Favaro et al., 2008; Fabian et al., 2012).

Anhand dieser bekannten Informationen über die Zelllinien soll *in vivo* die Wirkung der MCT1-Inhibition auf die Expression von MCT1 und MCT4 sowie ihres Ankerproteins CD147 untersucht werden. Des Weiteren soll gezeigt werden, inwieweit eine Inhibition des Laktattransports durch AZD3965 den Metabolitstatus innerhalb des Tumors verändert.

Hierzu wurden Experimentaltumoren beider Zelllinien in immundefizienten Mäusen gezüchtet und eine Teilmenge der Versuchstiere mit AZD3965 behandelt. Während der Anzucht und Behandlungsphase wurde das Wachstum der Tumoren regelmäßig kontrolliert und für die unbehandelten Tumoren Wachstumskurven erstellt. Nach Entnahme der Tumoren und ihrer Kryokonservierung wurde die Expressionsdichte der zu analysierenden Proteine in immunhistochemischen Verfahren untersucht.

Zur Beschreibung des Metabolitstatus innerhalb der Experimentaltumoren wurde das Verfahren der bildgebenden Biolumineszenz gewählt, welches eine arealspezifische Momentaufnahme der Konzentration von ATP, Glucose und Laktat innerhalb des Tumors ermöglicht (Walenta et al., 2002).

Mittels dieser Methoden soll festgestellt werden, inwiefern sich die bei Favaro et al. und Fabian et al. beschriebenen Protein- und Stoffwechselprofile der beiden Zelllinien *in vivo* reproduzieren lassen.

Vor allem soll aber untersucht werden, inwieweit sich die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse der AZD3965-Anwendung auch in der *in vivo* Behandlung von Ovarialkarzinomen zeigen. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Betrachtung möglicher Veränderungen im zellulären Proteinexpressionsprofil sowie der Beeinflussung des Metabolitstatus durch AZD3965. Innerhalb dieser Untersuchungen soll zudem die Frage geklärt werden, welche Unterschiede in der Hemmstoffwirkung aufgrund der Differenzen in der Expression von MCT4 und im metabolischen Profil der beiden Tumorzelllinien auftreten.

3. Material und Methoden

3.1. Probenmaterial

3.1.1. Tumorzelllinien

Die Ergebnisse dieser Arbeit basieren auf der experimentellen Untersuchung an zwei xenotransplantierten humanen Zelllinien mit unterschiedlichem glykolytischen Metabolismus.

Bei der Linie OC316 handelt es sich um hochglykolytische Zellen eines niedrig differenzierten serösen Ovarialkarzinoms im FIGO Stadium IV (s. Tabelle 2), welche 1994 postchemotherapeutisch aus der Aszitesflüssigkeit einer 60-jährigen Patientin entnommen wurden. Für diese Zelllinie ist *in vivo* eine erhöhte Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika beschrieben (Alama et al., 1996; Fabian et al., 2012).

Die Zellen der Linie IGROV-1 wurden 1982 aus der Biopsie eines bis dato unbehandelten endometrioiden Ovarialkarzinoms (FIGO Stadium III) einer 47-jährigen Frau gewonnen. Zellen dieser Linie weisen einen niedrigeren glykolytischen Stoffwechsel auf (Bénard et al., 1985; Fabian et al., 2012).

Beide Zelllinien wurden der Arbeitsgruppe von _____ durch Herrn _____ (Istituto Oncologico Veneto, Padua) zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Xenotransplantate

Die Züchtung der Xenotransplantate erfolgte in mehreren Phasen und wurde von Frau _____ durchgeführt. Hierfür wurden Zellen der Linien OC316 und IGROV-1 in einer Konzentration von 8×10^4 (OC316) bzw. 6×10^4 (IGROV-1) in 100 μ l eines Gemisches aus zwei Teilen Matrigelmatrix (Corning Inc., USA) und einem Teil 1x PBS (AppliChem, Darmstadt) subkutan in die rechte und linke Flanke einer 7 Wochen alten, weiblichen SCID-Maus (CB17/Icr-Prkdc, Janvier Labs, Frankreich) implantiert. Aufgrund eines induzierten Immundefekts der Maus (SCID: *severe combined immunodeficiency*) war eine spezifische Immunreaktion gegen das xenogene Zelltransplantat nicht möglich.

Nach Implantation erfolgte eine Unterteilung der Versuchstiere in Kontroll- und Behandlungsgruppe. Fünf Tage vor der geplanten Entnahme der Tumoren erhielten

die Tiere der Behandlungsgruppe zweimal täglich eine orale Dosis des Hemmstoffs AZD3965 (100 mg/kg in 0,5% Hydroxypropylmethylcellulose, 0,1% Tween80), die Tiere der Kontrollgruppe nur die Trägersubstanz. Die letzte Dosis wurde jeweils morgens am Tag der Tumorentnahme verabreicht.

Die Wachstumszeit der Tumoren variierte zwischen den einzelnen Anzuchtphasen, da vor allem innerhalb des ersten OC316-Kollektivs auf eine starke Nekrosenbildung bei einer Wachstumszeit von mehr als 30 Tagen reagiert werden musste. Somit wurden die Wachstumszeiten dieser Tumorlinie für die weiteren Phasen stark reduziert und lediglich die Tumoren der ersten OC316-Gruppe in das Gesamtkollektiv aufgenommen, welche eindeutig auswertbare Tumorareale zeigten. Somit ergaben sich für beide Tumorlinien Wachstumszeiten von 21-34 Tagen (OC316) und 25-30 Tagen (IGROV-1).

An die Tumorentnahme schloss sich eine direkte Kryokonservierung in Flüssigstickstoff und eine Verwahrung der Proben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung an.

Über den Zeitraum dieser Arbeit wurde in vier zeitversetzten Phasen ein Kollektiv an AZD3965-behandelten Transplantaten und Kontrolltumoren gebildet. Bevor weitere Analysen an diesen vorgenommen werden konnten, wurde die Gewebebeschaffenheit der Tumoren anhand von HE-Bildern (s. Kapitel 3.4.) untersucht und Xenotransplantate, welche eine starke Nekrosenbildung ohne auswertbare Tumorinseln oder keine klare Tumorstruktur zeigten, ausgeschlossen. Anhand dieser Vorauswahl reduzierte sich das Probenkollektiv auf die in Tabelle 5 angegebenen Tumorzahlen.

Tabelle 5: Übersicht des Probenkollektivs aus OC316- und IGROV-1-Tumoren

	OC316	IGROV-1
n _{Kontrolle}	12	16
n _{AZD3965}	8	10

3.1.3. Zellkulturproben

Für einen Vergleich der untersuchten Proteinexpression *in vivo* und *in vitro* wurde die in Kapitel 3.6.1. beschriebene Methodik der Fluoreszenz-Immunhistochemie auch für isolierte Tumorzellen angewendet.

Hierfür wurden auf Objektträgern (Menzel-Gläser GmbH) fixierte Zellen gleicher Passagen verwendet, welche freundlicherweise von _____ zur Verfügung gestellt wurden. Für Angaben zur entsprechenden Zellkultivierung wird an dieser Stelle auf ihre Dissertationsschrift verwiesen (Krumm, 2020).

3.2. Erstellung von Wachstumskurven

Für den Vergleich des Wachstumsverhaltens der beiden Zelllinien OC316 und IGROV-1 wurde das Volumen der unbehandelten Tumoren während der Erzeugung der Xenografts ab Tag 2 post implantationem bis zur Tumorsektion in zwei- bis dreitägigem Abstand protokolliert.

Die Vermessung der Tumoren wurde mit einem Messschieber vorgenommen, wobei jeweils die Länge und Breite eines Tumors bestimmt und mit der folgenden Formel das Volumen berechnet wurde:

$$\text{Volumen [mm}^3\text{]} = \frac{\text{Länge [mm]} \cdot (\text{Breite [mm]})^2}{2}$$

3.3. Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Herstellung der Tumorschnitte erfolgte nach einem exakten Protokoll, um vor allem für die Kryoschnitte der Biolumineszenz eine einheitliche Serie mit fester Reihenfolge und Schnittdicke zu garantieren (s. Abb. 4).

In der Vorbereitung wurden die Objektträger und Deckgläschen (Menzel-Gläser GmbH) einheitlich mit Tumor-Nummer, Zelllinie, vorgesehener Methode, Schnittdatum und Kürzel beschriftet und im Kryotom (SLEE medical GmbH) bei -20°C vorgekühlt. Anschließend wurden die Tumorproben der -80°C Kühlung entnommen, im Kryotom auf -20°C aufgetaut und mit dem Skalpell in zwei Hälften geteilt, um eine optimale Schnittfläche in der Tumormitte zu ermöglichen.

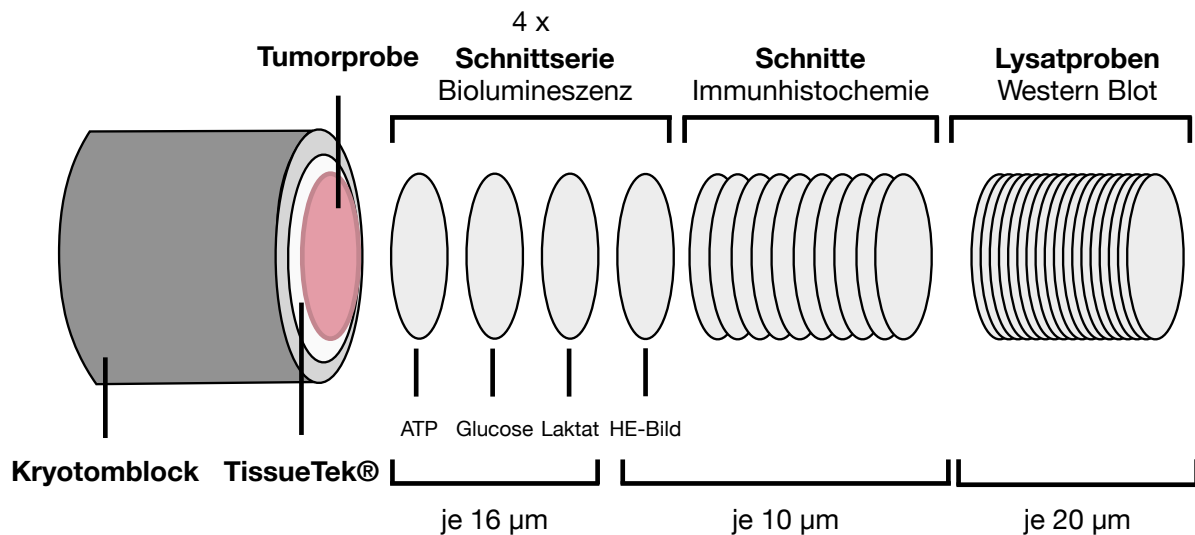


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Schnittprotokolls

Jeder Tumor wurde in einer festgelegten Reihenfolge zu Schnittproben verarbeitet. Zu Beginn erfolgten 20 µm dicke Schnitte für Lysatproben des Western Blot-Verfahrens. Darauf wurden 10 µm Schnitte für die immunhistochemischen Färbungen und am Ende des Protokolls vier Schnittserien für die Biolumineszenzmessung angefertigt. Jede dieser Serien bestand aus einem HE-Schnitt (10 µm) und den 16 µm dicken Schnitten der ATP-, Glucose- und Laktatbestimmung. Im Rahmen einer Serie war ein unmittelbares Aufeinanderfolgen der einzelnen Schnitte unbedingt zu gewährleisten, um in der Auswertung eine Überlagerung der Metabolitmessungen auf dem HE-Bild zu ermöglichen.

Die erste Tumorthälfte wurde nun mittels Tissue Tek® (Sakura Finetek) fixiert und zunächst mit einer Einstellung von 20 µm eine glatte Oberfläche der Probe geschaffen. Die dabei entstandenen Schnitte wurden in einem Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf AG) aufgefangen und für die Herstellung von Lysaten bei -20°C gelagert.

Auf diesen Schritt folgte die Anfertigung von Schnitten für die immunhistochemischen Färbungen in einer Dicke von 10 µm und ihre Aufnahme auf Objektträger.

Der dritte Protokollschritt beinhaltete die Erstellung von Serien für die Biolumineszenzmessung. Eine Serie bestand jeweils aus einem Schnitt für ein orientierendes HE-Bild auf einem Objektträger und drei Schnitten für die Bestimmung der Metabolitkonzentration von ATP, Glucose und Laktat auf jeweils einem Deckgläschen. Hierbei war von besonderer Wichtigkeit, dass die Metabolitschnitte in einer exakten Dicke von 16 µm unmittelbar aufeinander und auf den HE-Schnitt folgten, was eine möglichst genaue Darstellung der Metabolitsituation in einer Ebene des Tumors ermöglichen sollte. Aus diesem Grund wurde nach jeder Änderung der Schnittdicke der erste Schnitt verworfen, um für den darauffolgenden eine exakte Dicke garantieren zu können.

Insgesamt wurden vier Serien dieser Art angefertigt und anschließend in verschiedenen Verfahren fixiert und getrocknet.

Für den Objektträger des HE-Bildes sowie die Schnitte für die immunhistochemische Färbung erfolgte dies über Nacht bei Raumtemperatur. Für die Schnitte der ATP- und Laktat-Messung war eine Denaturierung der tumoreigenen Enzyme nötig, um eine Verstoffwechslung dieser Metabolite vor Messbeginn zu verhindern. Daher wurden diese Deckgläschen für 10 min bei 100°C auf einer Heizplatte (C. Gerhardt GmbH & CO. KG) hitzefixiert. Für die Fixierung des Glucoseschnittes war lediglich ein kurzes Antauen auf dem Deckgläschen nötig.

Nach erfolgreicher Trocknung wurden alle Schnitte bei -20°C gelagert.

3.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ermöglicht eine Übersicht eines histologischen Gewebes anhand der unterschiedlichen Anfärbbarkeit seiner Bestandteile. Durch Hämatoxylin erfolgt eine kontrastreiche Darstellung der Zellkerne in blau-violetter Farbe, während das azidophile Eosin eine rötliche Anfärbung der Zytoplasmaproteine und des Bindegewebes bewirkt (Lang, 2013).

Für diese Arbeit war besonders die Differenzierung von vitalem und nekrotischem Gewebe durch die HE-Färbung wichtig, um eine frühzeitige Selektion auswertbarer Tumoren vornehmen zu können.

Vor Beginn der Färbereihe war eine Fixierung der aufgetauten Schnitte für 7 min in Aceton (Carl Roth GmbH & Co. KG) und eine anschließende Trocknung bei Raumtemperatur nötig.

Den ersten Schritt des Färbeprotokolls bildete die einminütige Kernfärbung durch eine Hämatoxylinlösung (modifiziert nach Gill II, Carl Roth GmbH & Co. KG) und die Bläuungsreaktion unter fließendem Leitungswasser. Nach einem kurzen Abspülen in Ammoniakwasser (7 Tropfen 25%ige Ammoniaklösung in 250 ml Leitungswasser) und Aqua dest. erfolgte die Gegenfärbung mit 10 % wässriger Eosinlösung (Eosin G, Merck KGaA, vor Gebrauch mit 1 Tropfen Essigsäure angesäuert). Diese Anfärbung wurde im Anschluss erneut mit Leitungswasser und Aqua dest. gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100% Isopropanol, Carl Roth GmbH & Co. KG) differenziert und die Präparate entwässert. Im letzten Färbeschritt folgte die Klärung durch dreimalige Inkubation der Schnitte in Xylol und die Eindeckung mit Roti®-Histokit II (beide Carl Roth GmbH & Co. KG).

Zur Auswertung und weiteren Verwendung in der Biolumineszenzmethode wurden die Tumorschnitte nach einer Trocknungszeit von 24 h in 1,25-facher Vergrößerung (Mikroskop: Zeiss Axiophot, Carl Zeiss AG) fotografiert (Kamera: Nikon D100, Nikon GmbH).

3.5. Grafische Nekroseanalyse

Aufgrund der Fokussierung dieser Arbeit auf stoffwechselrelevante Proteine und der Auswirkung ihrer Hemmung auf die Konzentration ausgewählter Metabolite war die Betrachtung und Diskussion des Einflusses intratumoraler Nekrosen auf diese Messwerte unumgänglich.

Zur Quantifizierung des Nekroseanteils eines Tumors wurden mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop (Version CS5, Adobe Inc.) und anhand der HE-Bilder zwei Masken (Tumorgesamtfläche und Nekrosefläche) für jeden Tumor angefertigt. In Abbildung 5 ist die Auswertung zweier Tumoren mit hohem und niedrigem Nekroseanteil exemplarisch dargestellt.

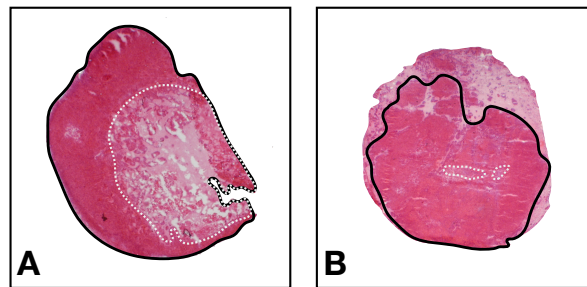


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der Nekroseanalyse zweier Tumorproben

Dargestellt sind der HE-gefärbte Schnitt eines stark nekrotischen Tumors der Zelllinie OC316 (A) und der Schnitt eines IGROV-1-Tumors mit sehr geringem Nekroseanteil (B).

Die schwarze Umrandung kennzeichnet das Tumorgewebe, die helle gestrichelte Markierung die intratumoralen Nekroseareale. Für die Auswertung durch das Programm ImageJ wurden die markierten Flächen schwarz eingefärbt und anschließend ihre Pixelzahl bestimmt.

Im Anschluss wurde die Größe der Maskenflächen durch das Programm ImageJ (National Institutes of Health, USA; Version: 1.52e; Plugin: *Batch values 0 and 255*) bestimmt und die Fläche der Nekrose in Relation zur Tumorgesamtfläche gesetzt.

3.6. Immunhistochemische Färbungen

Für einen quantitativen Nachweis der Expression von MCT1, MCT4 und CD147 wurde das Verfahren der Immunhistochemie gewählt. Die Verifizierung der dabei erhaltenen Messergebnisse sollte im ursprünglichen Arbeitsplan durch Western Blots erfolgen. Aufgrund ungenügender Differenzierung der dabei verwendeten Antikörper zwischen humanen und murinen Proteinen musste diese Methode im Verlauf der Arbeit durch die DAB-Immunhistochemie ersetzt werden.

Zur immunhistochemischen Färbung befanden sich auf jedem Objektträger zwei unmittelbar hintereinander erfolgte Kryoschnitte von 10 µm Dicke, wobei sich die Aufteilung der Negativkontrollen zwischen den beiden Färbemethoden unterschied. Für die Fluoreszenzfärbung war die Mitführung einer Negativkontrolle pro Objektträger bzw. Membranprotein nötig, während zur DAB-Färbung eine Negativkontrolle pro Tumor ausreichend war. Sämtliche Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer unter leichtem Schütteln und bei einheitlicher Verwendung eines Volumens von 60 µl pro Schnitt.

Für die DAB-Färbung war zunächst eine genaue Ermittlung der bestmöglichen Antikörperkonzentration mit Hilfe unterschiedlicher Konzentrationsfärbungen sowie die Bestimmung der optimalen Inkubationszeit mit DAB nötig, um eine größtmögliche Unterscheidung der spezifischen Färbungen bei minimaler Hintergrundfärbung zu ermöglichen. Für das Verfahren der Immunhistochemie waren diese Konzentrationen bereits in der Arbeitsgruppe etabliert. Die verwendeten Konzentrationen sowie weitere Informationen zu den Primär- und Sekundärantikörpern der immunhistochemischen Verfahren finden sich in den Tabellen 6 und 8.

Die ersten Schritte der beiden Färbungen bildeten eine kurze Auftauphase der Kryoschnitte sowie eine siebenminütige Fixation in Aceton und eine Trocknungsphase unter dem Abzug. Anschließend wurde das Gewebe mit einem hydrophoben Stift (PapPen, DAKO GmbH) umrandet, worauf die färbespezifischen Schritte der Fluoreszenz- bzw. DAB-Immunhistochemie folgten.

3.6.1. Fluoreszenz-Immunhistochemie

Nach einer zweiminütigen Rehydrierung mit 1x PBS wurden unspezifische Bindungsstellen unter Verwendung eines 2% Eselserums (Dianova GmbH) in PBS für 45 min geblockt. Nach Abklopfen des Blockingserums folgte die einstündige Inkubation

mit dem primären Antikörper (in 1% Eselserum in PBS) bzw. mit 1% Eselserum in PBS (Negativkontrolle). Nach erneutem dreimaligen Waschen in 1x PBS für je 3 min wurden alle Schnitte mit dem sekundären Antikörper in PBS für 45 min inkubiert.

Tabelle 6: Primär- und Sekundärantikörper der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen

	Primärantikörper			Sekundärantikörper		
	Ausrichtung	Verdünnung in 1% ES (in PBS)	Firma	Ausrichtung	Verdünnung in PBS	Firma
MCT1	<i>rabbit anti human</i>	1 : 100	Santa Cruz	<i>donkey anti rabbit</i>	1 : 800	Dianova
MCT4	<i>rabbit anti human</i>			<i>donkey anti rabbit</i>		
CD147	<i>goat anti human</i>			<i>donkey anti goat</i>		

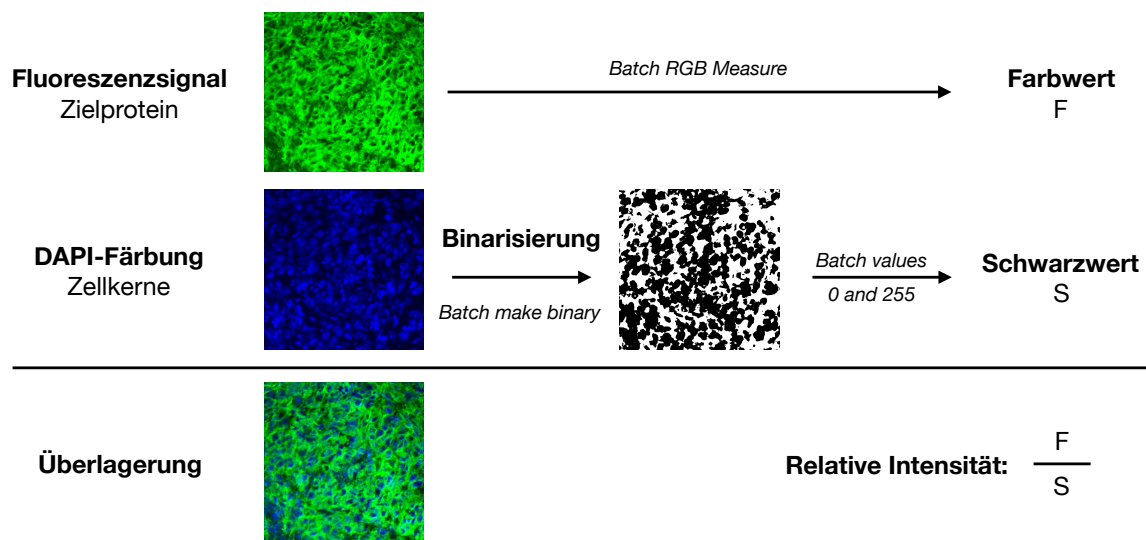
Aufgrund der Koppelung des Fluorochroms an den Sekundärantikörper musste die Inkubation und alle weiteren Schritte im Dunkeln ausgeführt werden, um eine vorzeitige Anregung des Farbstoffes durch Licht zu verhindern. Den letzten Schritt des Färbeprotokolls bildeten nach viermaligem Waschen für jeweils 3 min in 1x PBS die Kerngegenfärbung mit DAPI (enthalten im Eindeckmedium ImmunoSelect Antifading Mounting Medium, Dianova) und die Eindeckelung der Objektträger mit Deckgläschen. Nach einer Lagerung von 24 h bei 4°C wurden abschließend die Ränder der Deckgläschen mit Klarlack versiegelt und die Schnitte unmittelbar daran anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (BZ-8000, Keyence GmbH) fotografiert.

Die Aufnahmen erfolgten unter Verwendung des Programms *BZ Observation Application* und des Objektivs PlanApo 20x bei weiterer digitaler Vergrößerung. Zunächst wurde die Belichtungszeit unter Berücksichtigung der Signalstärke der Negativkontrolle angepasst und anschließend Bildsätze von fünf unterschiedlichen Tumorarealen angefertigt. Der Bildsatz eines Areals bestand dabei aus jeweils einem Bild der Kernfärbung mit DAPI, einem Bild der jeweiligen Zielproteinfärbung und einer Übersichtsaufnahme, die die Überlagerung der beiden Bilder zeigte. Die hierfür verwendeten Polarisationsfilter sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendete Polarisationsfilter am Keyence 8000-BZK

Name	Anregung [nm]	Absorption [nm]	Detektion
DAPI-BP OP-66832 BZ	360/40	460/50	Zellkerne
GFP-BP OP-66836 BZ	470/40	535/40	MCT1/MCT4
TexasRed OP-66383 BZ	560/40	630/60	CD147

Die Quantifizierung des Signals der detektierten Membranproteine erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ und spezifischer Plugins (s. Abb. 6).

**Abbildung 6: Auswertungsschema der computerbasierten Quantifizierung des IHC-Fluoreszenzsignals**

Gezeigt ist eine exemplarische immunhistochemische Fluoreszenzfärbung einer Tumorprobe. Pro Bildserie eines ausgewerteten Areals entstanden jeweils ein Bild der Zielproteinfärbung, der Kernfärbung und der Überlagerung dieser beiden Bilder. Das Bild der Kernfärbung wurde zunächst binarisiert und anschließend die totale Zellkernfläche als Schwarzwert S ermittelt. Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals ergab den Farbwert F, welcher in Relation zum Schwarzwert gesetzt wurde. Die verwendeten Plugins sind in *kursiver Schrift* abgebildet.

Zunächst wurde das blaue Fluoreszenzsignal im Bild der Kernfärbung binarisiert (Plugin: *Batch make binary*). Die Fläche der so erhaltenen schwarzen intensitätsgleichen Zellkerne konnte anschließend mit Hilfe des Plugins *Batch values 0 and 255* anhand ihrer Pixelzahl ermittelt werden (Schwarzwert S).

Im letzten Schritt wurde das Intensitätssignal des detektierten Membranproteins in

Relation zur totalen Zellkernfläche des entsprechenden Bildareals gesetzt. Hierfür analysierte das Plugin *Batch RGB Measure* die Intensität sowie die Fläche der Proteinfuoreszenz und gab, abhängig vom Fluorochrom des verwendeten Sekundärantikörpers, den daraus resultierenden „Rot-“ bzw. „Grünwert“ an. Dieser Farbwert (F) wurde nun in ein Verhältnis zur Zellkernfläche (S) des Bildareals gesetzt, sodass mit diesem Quotienten eine Aussage über die Intensität der Proteinexpression bezogen auf die Zellkernfläche eines Areals getätigt werden konnte.

3.6.2. DAB-Immunhistochemie

Nach den oben genannten gemeinsamen Schritten des immunhistochemischen Färbeprotokolls erfolgte zunächst eine zehninminütige Permeabilisierung in Tritonlösung (0,1% Triton in 1x PBS), an welche sich ein zweiminütiges Waschen in 1 x PBS anschloss. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 3% BSA (AppliChem GmbH) in 1 x PBS für 1 h geblockt und die Objektträger darauf erneut für 2 min in 1 x PBS gewaschen.

Tabelle 8: Primär- und Sekundärantikörper der DAB-Immunhistochemie

	Primärantikörper			Sekundärantikörper		
	Ausrichtung	Verdünnung in 3% BSA (in PBS)	Firma	Ausrichtung	Verdünnung in PBS	Firma
MCT1	<i>rabbit anti human</i>	1 : 200	Santa Cruz	<i>donkey anti rabbit</i>	1 : 250	Dianova
MCT4		1 : 500				
CD147		1 : 50	Cell Signaling		1 : 100	

Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper (in 3% BSA in 1 x PBS) bzw. mit 3% BSA in 1x PBS gefolgt von einem zweimaligen zweiminütigen Waschen in 1 x PBS. Nach fünfminütiger Inkubation in 3% H₂O₂ (AppliChem GmbH) in 1 x PBS zur Absättigung endogener Peroxidasen und erneutem zweimaligen zweiminütigen Waschen in 1 x PBS wurden die Schnitte für 45 min mit dem Zweitantikörper (in 1x PBS) inkubiert und anschließend viermal für 2 min in 1 x PBS gewaschen.

Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) bildet mit Wasserstoffperoxid einen Komplex und führte im nächsten Schritt durch Zugabe des Chromogens DAB+ (Diaminobenzidin, DAKO GmbH) zu einer Oxidation des Chromogens, welches dabei in ein unlösliches, stabiles, braunes Farbprodukt umgesetzt wurde. Diese Farbreaktion wurde nach 6 min durch dreimaliges zweiminütiges Waschen in 1 x PBS gestoppt.

Um die erhaltene Intensität der Färbereaktion in Bezug zur Zellzahl des untersuchten Areals setzen zu können, schloss sich an die immunhistochemische Färbung eine Kernfärbung mittels Hämatoxylin (Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Carl Roth GmbH & Co. KG) an, wobei auf eine leichte Farbtintensität zu achten war, um die spezifische IHC-Anfärbung nicht zu überlagern. Hierzu wurden die Objektträger kurz in Aqua dest. eingetaucht und anschließend für 2,5 min in Mayers saurem Hämalaun inkubiert, für 10 min unter langsam fließendem Leitungswasser gebläut und erneut kurz mit Aqua dest. abgespült. Darauf folgte die Entwässerung und Differenzierung durch die aufsteigende Isopropanolreihe (äquivalent zur HE-Färbung in Kapitel 3.4.) und eine fünfminütige Inkubation in 100% Isopropanol. Den letzten Schritt bildete die dreimalige Inkubation der Schnitte in Xylol für jeweils 5 min.

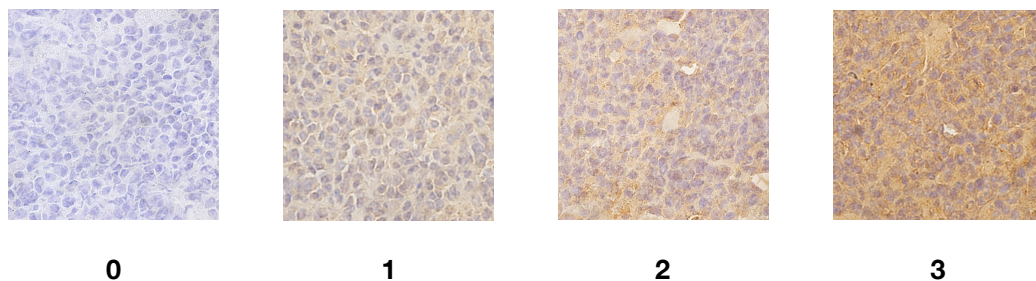


Abbildung 7: Intensitätsskala zur Auswertung DAB-gefärbter Kryoschnitte

Die Skala zeigt Ausschnitte unterschiedlich stark angefärbter und 40-fach vergrößerter Tumorschnitte inklusive einer Bewertung der aufsteigenden braunen Farbtintensität von 0 - 3.

Nach Eindeckung der Schnitte mit Roti®-Histokitt II und einer Trocknung über Nacht wurden die Objektträger bei 1,25- und 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss AG) dokumentiert (Kamera: Nikon D100, Nikon GmbH). Für jeden Tumorschnitt wurden jeweils drei nekrosefreie Bildausschnitte in 40-facher Vergrößerung angefertigt, wobei auf eine ähnliche Zelldichte der Areale geachtet wurde. Anschließend wurden diese Ausschnitte mit Hilfe einer Nominalskala von 0-3 (s. Abb. 7) in der Intensität ihrer Braunfärbung von fünf unabhängigen Personen bewertet.

3.7. Western Blot

Aufgrund der oben beschriebenen mangelhaften Differenzierungsmöglichkeit zwischen humanen und murinen Proteinen im Western Blot, wird an dieser Stelle auf eine ausformulierte Beschreibung des Verfahrens verzichtet und auf das Protokoll der Arbeitsgruppe verwiesen, welches sich im Anhang (Kapitel 8.1) findet.

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wird die aufgetretene Problematik kurz beschrieben und im darauffolgenden Kapitel diskutiert.

3.8. Bildgebende Biolumineszenz

3.8.1. Prinzip der bildgebenden Biolumineszenz

Das Verfahren der bildgebenden Biolumineszenz (auch: *induced metabolic Bioluminescence Imaging*, imBI) ermöglicht die quantitative Analyse des Metabolitstatus in Kryoschnitten verschiedener Gewebe. Hierzu kann arealsspezifisch die Konzentration von ATP, Glucose, Laktat und Pyruvat bestimmt und zu einem farbkodierten digitalen Bild des aktuellen Metabolitstatus im Kryoschnitt verarbeitet werden (Mueller-Klieser und Walenta, 1993; Sattler et al., 2007a; Walenta et al., 2016).

Das Messprinzip beruht auf der biochemischen Koppelung des zu analysierenden Metabolits an eine enzymatische Lichtreaktion. Diese Redoxreaktion findet unter Katalysation von Luziferasen statt, bei welcher Luziferine unter Photonenemission oxidiert werden (Walenta et al., 2014). Die entsprechende Reaktionsgleichung für die untersuchten Metabolite ATP, Glucose und Laktat findet sich in den jeweiligen Unterkapiteln.

Die erhaltene Lichtemission ist in einem bestimmten Bereich der Reaktionskurve proportional zur lokalen Konzentration des analysierten Metaboliten und kann über ein lichtsensitives Kamerasystem detektiert werden. Die erhaltenen Messwerte können im Anschluss über Kalibrierungskurven bekannter Standardkonzentrationen auf eine arealbezogene Metabolitkonzentration ($\mu\text{mol/g}$ Gewebe) zurückgerechnet werden (Walenta et al., 2002).

3.8.2. Aufbau des Messsystems

Eine grafische Darstellung des Messaufbaus findet sich in Abbildung 8.

Aufgrund der starken Temperaturabhängigkeit der Enzymreaktion und hohen Lichtsensitivität des Kamerasystems war eine exakte Einstellung der Temperatur von Raum und Messkammer und eine maximal mögliche Abdunkelung nötig. Hierzu wurde der Raum auf 20°C klimatisiert und die Messkammer mittels Wasserbad ebenfalls auf 20°C gekühlt.

Zusätzlich zur Abdunkelung und Klimatisierung des Raumes befand sich das Messsystem, bestehend aus Mikroskop (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss AG) mit 1,25x Objektiv sowie aufgesetzter EM-CCD-Kamera (*electron multiplying - charge-coupled device*, iXon^{EM+} DU-888, Andor Technology) und Messkammer, in einem ventilierten, lichtundurchlässigen Schrank.

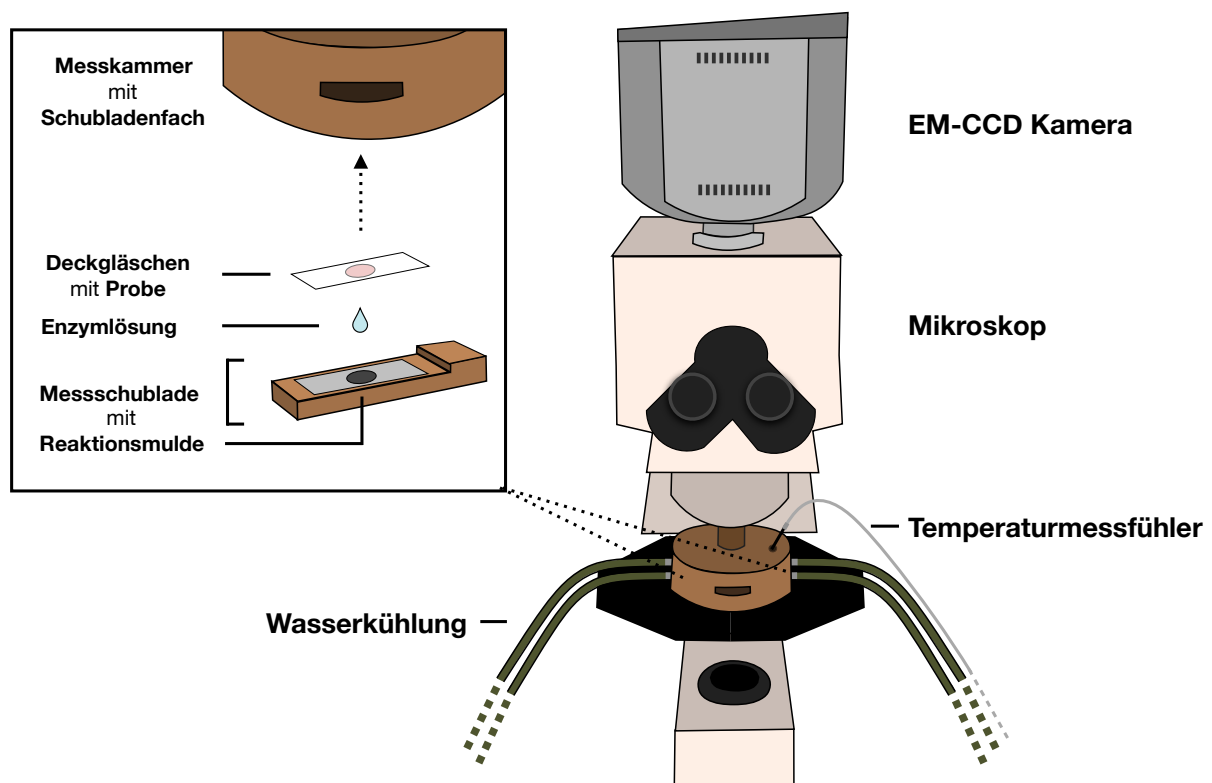


Abbildung 8: Aufbau des Messsystems der induzierten Biolumineszenz

Die Nachweisreaktion der induzierten Biolumineszenz (imBi) findet in der Reaktionsmulde der Messschublade zwischen 50 µl Enzymmix und dem Tumorschnitt auf der Unterseite eines Deckgläschens statt. Die Detektionsapparatur besteht aus einem Mikroskop mit 1,25x Objektiv und aufgesetzter EM-CCD-Kamera. Aufgrund der hohen Temperaturempfindlichkeit ist eine konstante Wasserkühlung und Temperaturkontrolle der Messkammer nötig.

Die Messkammer bestand aus zwei Komponenten, der wassergekühlten, unter dem Objektiv des Mikroskops fixierten äußeren Messkammer und einer mobilen Schublade, in welcher sich auf einem Aluminiumplättchen die Reaktionsmulde befand. Aufgrund des gläsernen Muldenbodens konnte der Strahlengang des Mikroskops durch die Schublade und die äußere Messkammer zum Objektiv des Mikroskops erfolgen (s. Abb. 8). Um diesen Lichteinfall bei Bestimmung der Photonenemission der Probe zu verhindern, konnte die Lichtquelle des Mikroskops bei der Messung durch eine schwarze Plastikcappe abgedeckt werden.

3.8.3. Durchführung der Messung

In der Vorbereitungsphase der Biolumineszenzmessung wurden die Gewebeschnitte der -20°C-Kühlung entnommen und im Kryotom bei -20°C bis zum Messbeginn gelagert. Die Enzymkits aller drei Metabolitbestimmungen erforderten bis zum Verwendungszeitpunkt eine Lagerung bei -80°C und vor Gebrauch ein langsames Auftauen auf Eis sowie eine dortige Lagerung über den Messzeitraum.

Vor Beginn jeder Metabolitmessung war die Erstellung bzw. Anpassung der metabolitspezifischen Kalibrierungskurven nötig, indem mindestens drei Standardschnitte unterschiedlicher Konzentration gemessen wurden.

Die Standardproben wurden durch Zugabe einer definierten Metabolitmenge zum Eindeckmedium Tissue Tek® hergestellt und nach mehrfacher Invertierung der Suspension bei -20°C am Kryotom 16 µm dünn geschnitten und anschließend bei -20°C gelagert.

Zur Erstellung bzw. Anpassung der Kalibrierungskurve wurde die mittlere Lichtintensität des Schnitts ermittelt, die erhaltenen Messwerte gegen die bekannte Metabolitkonzentration in einem Excel-Datenblatt aufgetragen und die Übereinstimmung mit dem Verlauf der bisherigen Kurve überprüft. Mit den erhaltenen Intensitätswerten konnte die nichtlineare Regressionsformel (Box Lucas Funktion: $y = a \cdot (1-b^x)$) der Kalibrierungskurve weiter angepasst werden. Im Falle einer fehlenden Übereinstimmung der gemessenen Standardschnitte mit den Werten vorangegangener Kalibrierungsmessungen, war für das entsprechende Enzymkit die Erstellung einer neuen Kurve nötig.

Für den Messvorgang wurde der einzelne Gewebe- bzw. Standardschnitt dem Kryotom entnommen und für wenige Sekunden auf der 100°C heißen Heizplatte (IKA Werke GmbH & Co. KG) erhitzt, um Kondenswasser abzdampfen. Anschließend wurde das Deckgläschen mit der Gewebeseite nach unten auf dem Aluminiumplättchen der Messschublade fixiert, sodass sich das Probenstück genau über der Reaktionsmulde befand.

Vor Zugabe der Enzymmischung erfolgte die Aufnahme eines orientierenden *Durchlichtbildes I* (s. Abb. 9) zur Bestätigung der korrekten Position des Schnittes in der Messkammer und anschließend die Abdeckung der Lichtquelle am Mikroskop.

Die Messschublade wurde erneut der Messkammer entnommen, das Deckgläschen mit Hilfe eines Skalpell hochgestemmt und 50 µl Enzymmix in die Reaktionsmulde pipettiert. Es folgte das langsame Absenken des Deckgläschens auf die Reaktionsmulde, wobei ein luftblasenfreier Kontakt von Gewebe und Flüssigkeit zu beachten war. Im Moment dieses Kontakts wurde der Countdown der Inkubationszeit gestartet, die Messschublade in die Messkammer geschoben und der Schrank geschlossen. Bei Ablauf der Inkubationszeit wurde die Messung in der Kamera-Software Andor iQ gestartet.

Die metabolitspezifischen Inkubations- und Messzeiten waren in der Arbeitsgruppe in vorausgegangenen enzymkinetischen Versuchen ermittelt worden und sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Metabolitspezifische Inkubations- und Messzeiten

Metabolitmessung	Inkubationszeit [s]	Messzeit [s]
ATP	20	40
Glucose	60	60
Laktat	20	40

Der Emissionsmessung folgte die Aufnahme eines weiteren *Durchlichtbildes II*, um ein eventuelles Verrutschen des Schnitts innerhalb der Messschublade feststellen und bei der Auswertung beachten zu können (s. Abb. 9).



Abbildung 9: Bildreihenfolge innerhalb einer Biolumineszenzmessung

Im ersten Schritt erfolgte die Aufnahme eines orientierenden Durchlichtbildes I, gefolgt vom Biolumineszenzbild. Um ein Verrutschen des Schnitts im Messverfahren feststellen und in der Auswertung beachten zu können, wurde anschließend noch ein Durchlichtbild II erstellt.

3.8.3.1. Reaktionsmechanismus des ATP-Nachweises

Der Bestimmung der ATP-Konzentration im Gewebe liegt folgende direkte Lichtreaktion unter ATP-Umsatz zu Grunde:

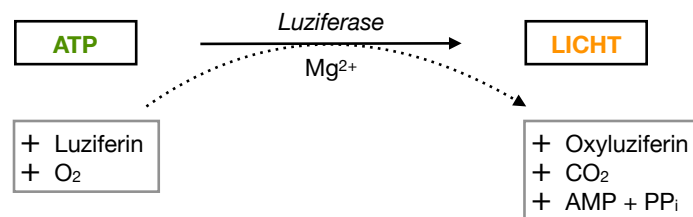


Abbildung 10: Biochemisches Reaktionsschema für die biolumineszenzbasierte Detektion von ATP.

Modifiziert nach Mueller-Klieser und Walenta, 1993.

Dieser Nachweis ist durch Zugabe des Substrates Luziferin und des Enzyms Luziferase möglich. Dieses Enzym wird aus dem Abdomen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* gewonnen und katalysiert obige Reaktion der Oxidation des Luziferins unter ATP-Umsetzung, Sauerstoffverbrauch und Lichtemission mit Mg²⁺ als Cofaktor.

Die genaue Zusammensetzung des verwendeten ATP-Enzymkits sowie der Kits für den Nachweis von Glucose und Laktat findet sich im Anhang (Kapitel 8.5.1.).

Vor Gebrauch der Lösung wurde das ATP-Enzymkit kurz zentrifugiert und nur der Überstand für die Messung verwendet.

3.8.3.2. Reaktionsmechanismus des Glucose-Nachweises

Der Bestimmung der Glucose-Konzentration im Gewebe liegt folgende Reaktionsgleichung zu Grunde:

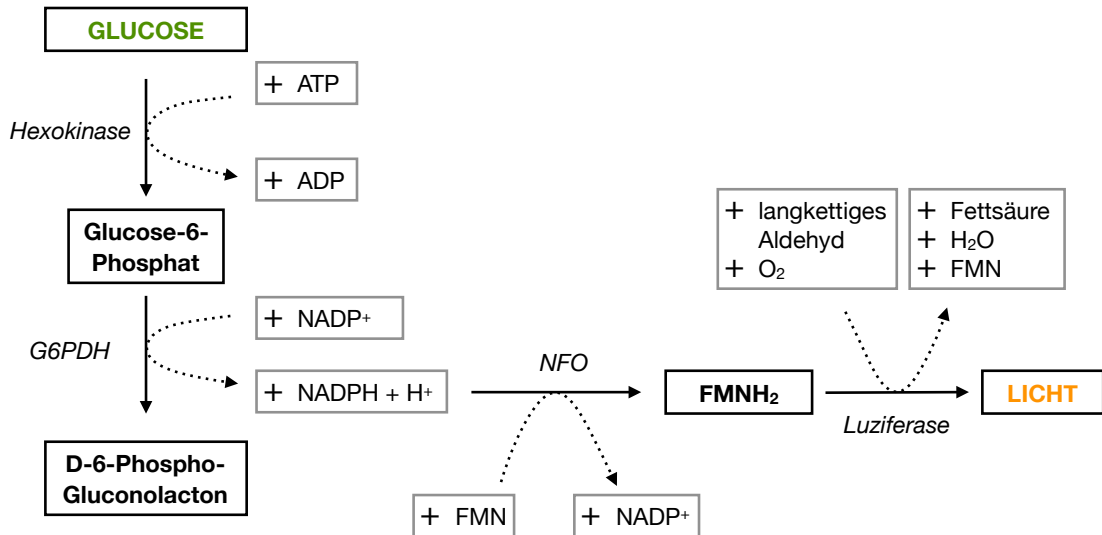


Abbildung 11: Biochemisches Reaktionsschema für die biolumineszenzbasierte Detektion von Glucose.

Modifiziert nach Mueller-Klieser und Walenta, 1993.

Den ersten Reaktionsschritt bildet die Phosphorylierung von Glucose unter ATP-Spaltung. Anschließend erfolgt die Umsetzung von Glucose-6-Phosphat zu D-6-Phospho-Gluconolacton. Das dabei entstandene NADPH bildet den Reaktionspartner der Reduktion von FMN zu FMNH₂ durch die NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase (NFO). FMNH₂ wird im letzten Reaktionsschritt durch die Luziferase des *Photobacterium fischeri* unter Photonenemission wieder zu FMN oxidiert.

3.8.3.3. Reaktionsmechanismus des Laktat-Nachweises

Der Bestimmung der Laktat-Konzentration im Gewebeschnitt liegt die Reaktionsgleichung in Abbildung 12 zu Grunde. Der lichtemittierende Reaktionsschritt dieses Verfahrens entspricht dem des Glucosenachweises, indem FMNH₂ - katalysiert durch die Luziferase des *Photobacteriums fischeri* - unter Photonenemission zu FMN oxidiert wird. Die Bildung von FMNH₂ erfolgt zuvor in einer Redoxreaktion mit NADH durch die NAD(P)H:FMN-Oxidoreduktase (NFO). NADH entsteht aus der vorangegangenen Reaktion der Umsetzung von Laktat zu Pyruvat, welches zu Alanin weiterreagiert.

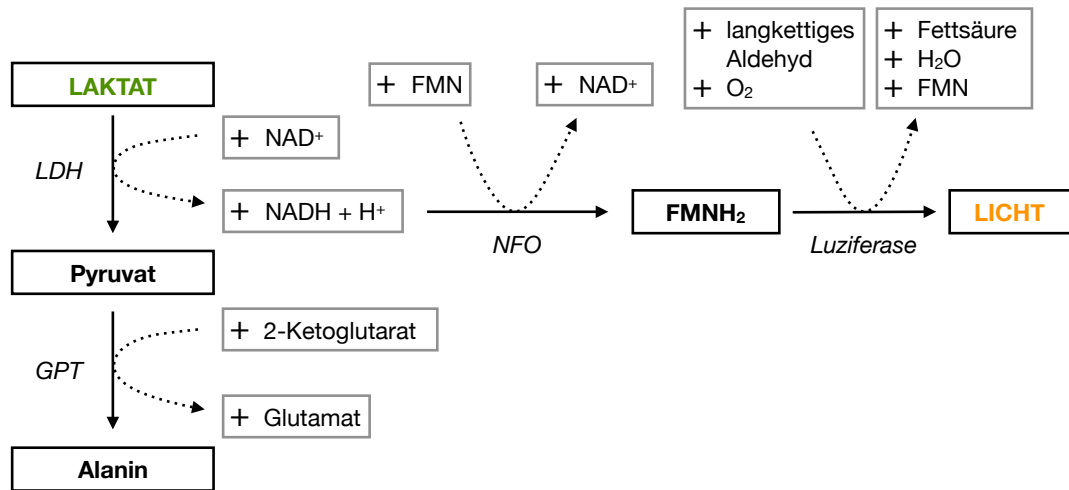


Abbildung 12: Biochemisches Reaktionsschema für die biolumineszenzbasierte Detektion von Laktat.

Modifiziert nach Mueller-Klieser und Walenta, 1993.

3.8.4. Auswertung

Die Auswertung der bildgebenden Biolumineszenzmessung erfolgte mit Hilfe der Programme Adobe Photoshop und ImageJ. Das Prinzip der quantitativen Stoffwechselanalyse als Momentaufnahme der Konzentrationen von ATP, Glucose und Laktat basiert auf dem unmittelbaren Aufeinanderfolgen der 4 Schnitte einer Tumorserie (HE-Bild, ATP-, Glucose-, Laktatschnitt, s. Kapitel 3.3.). Dies ermöglichte im Programm Photoshop eine Überlagerung von HE-Bild, Biolumineszenz- und Durchlichtbildern einer Schnittserie zu einem Bildstapel. Zur automatisierten Stapelbildung wurde die Aktion *Schnellverfahren* in der Software programmiert, die das bisher manuelle, zeitaufwändige Verfahren ersetzt.

Um das vitale Gewebeareal des Tumorschnitts zu bestimmen, wurden das HE- und Biolumineszenzbild der ATP-Messung analysiert und der vitale Bereich auf einer transparenten Ebene über dem zweiten Durchlichtbild in Form einer Bildmaske markiert und abgespeichert. Hierbei war zu beachten, dass eventuelle Luftblasen und Gewebelöcher ausgespart wurden. Anhand der nun vorliegenden ATP-Maske konnten unter Aussparung avitaler Bereiche ebenso Masken für Glucose und Laktat angefertigt und gespeichert werden. Im Anschluss erfolgte die Übertragung dieser Masken auf das entsprechende Biolumineszenzbild im Programm ImageJ. Unter Verwendung des Plugins *Tumor Statistics* wurde die maskierte Fläche sowie ihre gemittelte Lichtintensität mit Standardabweichung und dem maximalen Intensitätspeak berechnet.

Mit Hilfe der nichtlinearen Regressionsformel der Kalibrierungskurve konnte nun eine Zuordnung der mittleren Lichtintensität zu einer Metabolitkonzentration erfolgen. Diese war jedoch nur für Intensitätswerte innerhalb des Kalibrierungsbereichs möglich, sodass Schnitte mit außerhalb liegenden Werten von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden mussten.

Um den Stoffwechselstatus mit der regionalen Metabolitverteilung deutlicher darstellen zu können, erfolgte eine Farbkodierung der ermittelten Lichtintensitäten des Biolumineszenzbildes.

Hierfür wurde im Programm ImageJ (Analysetool *Histogram*) der maximale Grauwert des entsprechenden Bildes ermittelt. Durch Eintragung dieses Werts und Einbeziehung der Regressionsparameter der Kalibrierungskurve in ein bestehendes Excel-Datenblatt konnte jeder Konzentration im Bereich der Standardwerte ein Grauwert zugeordnet werden. Diese Grauwerte wurden in definierte RGB-Farbbereiche kodiert, sodass unter Verwendung des *LUT-Importers* im Programm ImageJ eine Übertragung der Farben auf das Biolumineszenzbild erfolgen konnte.

3.9. Statistische Auswertung

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurden für alle Messungen unter Verwendung der Programme Excel (Microsoft, Version: 16.27) und Origin (OriginLab Corporation, Version: 7.5) die jeweiligen Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) berechnet und grafisch dargestellt.

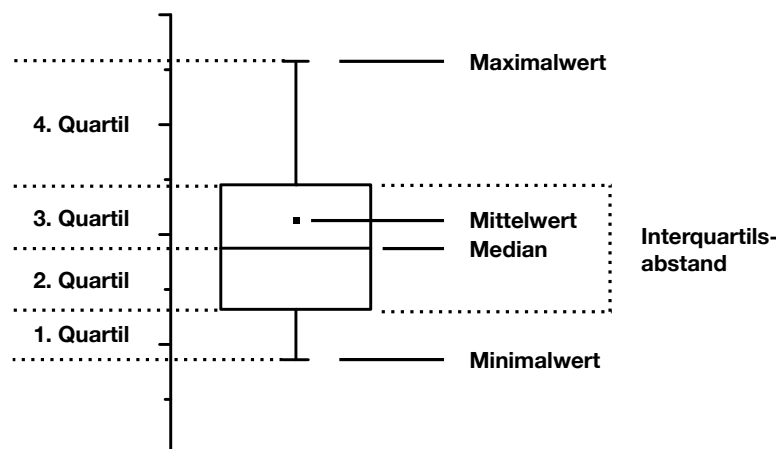


Abbildung 13: Exemplarische Darstellung eines Boxplot-Diagramms

3. Material und Methoden

Aussagen über die Signifikanz konnten durch Nutzung des zweiseitigen t-Tests unabhängiger Stichproben getroffen werden, wobei ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $< 0,05$ durch einen Stern (*) gekennzeichnet wurde. Da keine α -Adjustierung erfolgte, sind diese p-Werte als rein deskriptiv zu betrachten.

Die Ergebnisdarstellung in Boxplot-Diagrammen (s. Abb. 13) zeigt Mittelwert (■), Median (Strich), die vier Quartile, den Interquartilsabstand (Box) sowie die Minimal- und Maximalwerte (sog. Whisker).

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung von Tumorwachstum und Nekrosenbildung

4.1.1. Analyse des Tumorwachstums

Um Unterschiede im Wachstumsverhalten der beiden Tumorzelllinien *in vivo* untersuchen zu können, wurden während der Anzucht der Xenografts der Kontrollgruppen Wachstumskurven erstellt, welche in Abbildung 14 dargestellt sind.

Es ist zu beachten, dass es sich um mehr Tumoren handelt, als letztendlich in das Kollektiv der weiteren Untersuchungen aufgenommen wurden, da auch Tumoren in die Wachstumskurve einbezogen wurden, welche anschließend aufgrund zu großer Nekroseflächen von weiteren Analysen ausgeschlossen wurden.

Wegen der großen Streuung der einzelnen Tumorumfänge wurde zu Gunsten einer besseren Übersichtlichkeit auf eine zusätzliche Abbildung der Standardabweichungen der aufgetragenen Mittelwerte verzichtet und eine exemplarische Nennung im Text vorgezogen.

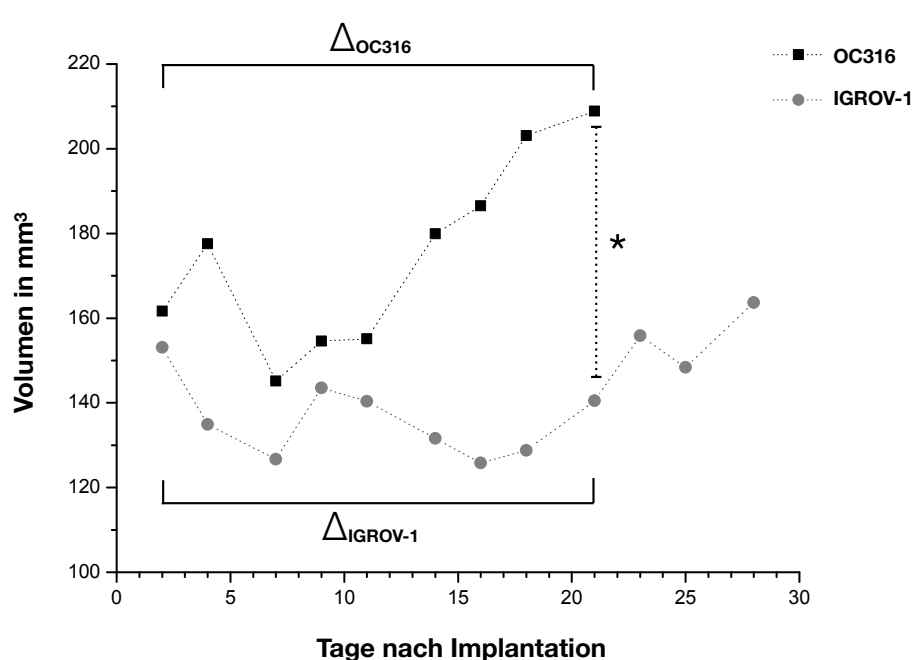


Abbildung 14: Wachstumskurven der OC316- und IGROV-1-Xenotransplantate der Kontrollgruppen

Abgebildet ist der Wachstumsverlauf der Experimentaltumoren ab dem 2. Tag nach Implantation der Zellen bis zur Entnahme der ersten Tumoren am 21. Tag (OC316) bzw. 28. Tag (IGROV-1). Das Wachstum wurde alle 2-3 Tage mit Hilfe eines Messschiebers bestimmt. $n_{OC316} = 31$ Tumoren; $n_{IGROV-1} = 28$ Tumoren. $\Delta_{OC316} / \Delta_{IGROV-1}$: Volumenzunahme zwischen dem 2. und 21. Messtag

4. Ergebnisse

Abbildung 14 zeigt die Gegenüberstellung des Wachstumsverlaufs von Xenotransplantaten der Zelllinien OC316 und IGROV-1 ohne AZD3965-Behandlung. Die Volumenmessung der Tumoren erfolgte jeweils ab dem zweiten Tag nach Implantation und setzte sich bis zur Entnahme der Tumoren fort. Aufgrund des schnelleren Größenwachstums der OC316-Tumoren und der Erfahrung eines größeren Nekroseanteils bei einer Wachstumszeit von mehr als 30 Tagen, wurden die OC316-Tumoren bereits vor den IGROV-1-Tumoren entnommen. Das gesamte Kollektiv der OC316-Tumoren wurde daher nur bis zum 21. Tag post implantationem vermessen, da anschließend die ersten größeren Xenotransplantate seziiert wurden. Daher ist dieser als letzter Messtag der Tumorgruppe OC316 in Abbildung 14 abgebildet.

Zu Beginn der Messungen zeigte sich bei beiden Zelllinien eine stark schwankende Volumenentwicklung. In der ersten Woche nach Implantation konnte vor allem in der Gruppe der IGROV-1-Tumoren zunächst eine deutliche Abnahme des Ausgangsmittelwerts von $153,1 \pm 60,2 \text{ mm}^3$ um ca. 17% auf $126,7 \pm 43,6 \text{ mm}^3$ und erst ab der zweiten Messwoche ein nahezu steter Anstieg ihres Volumens beobachtet werden. Ähnliches galt auch für das Kollektiv der OC316-Tumoren, welches in den ersten Tagen nach Implantation ebenfalls deutliche Schwankungen im gemessenen Volumen aufwies. So zeigte sich am siebten Messtag eine Reduktion des Ausgangsmittelwerts von $161,7 \pm 66,2 \text{ mm}^3$ um 10% auf $145,1 \pm 41,7 \text{ mm}^3$.

Bei einer geringen Differenz der vermessenen Ausgangsvolumina der beiden Tumorkollektive zeigte der Kurvenverlauf des OC316-Kollektivs einen deutlich steileren Anstieg als der der Zelllinie IGROV-1, sodass sich die gemittelten Volumina der OC316-Tumoren am 21. Messtag signifikant von denen der IGROV-Tumoren unterschieden (OC316: $208,9 \pm 67,9 \text{ mm}^3$; IGROV-1: $140,5 \pm 45,4 \text{ mm}^3$). Hinsichtlich der Tatsache einer geringeren implantierten Zellzahl im IGROV-1-Kollektiv muss für einen besseren Vergleich der beiden Zelllinien der Volumenzuwachs ($\Delta_{\text{OC316}}/\Delta_{\text{IGROV-1}}$) innerhalb der ersten drei Wochen betrachtet werden. Auch dieser zeigte eine signifikante Differenz zwischen der steileren Größenzunahme der OC316-Tumoren und der initial flacheren Volumenänderung der IGROV-1-Tumoren.

4.1.2. Grafische Nekroseanalyse

Um einen möglichen Einfluss intratumoraler Nekroseareale auf stoffwechselrelevante Proteine wie MCT1 und MCT4 sowie vor allem auf den Metabolitstatus der Tumoren

diskutieren zu können, wurden die Tumoren hinsichtlich ihres Nekroseanteils analysiert. Es gilt zu beachten, dass es sich bei dem untersuchten Kollektiv um Tumoren handelte, für welche anhand ihrer HE-Bilder auswertbare Tumorstrukturen ermittelt werden konnten. Im Vorfeld dieser Analyse waren bereits 18,6 % aller IGROV-1- und 35,9 % aller OC316-Tumoren aufgrund zu starker Nekrosenbildung ohne auswertbare Tumorgewebeinseln aus dem Kollektiv ausgeschlossen worden.

Tabelle 10: Prozentualer Anteil intratumoraler Nekroseareale an der Gesamtfläche von OC316- und IGROV-1-Tumoren

Die Ergebnisse der Nekroseauswertung sind als gemittelte prozentuale Werte (MW) mit Standardabweichung (SD) für die Kontroll- bzw. Behandlungsgruppe der jeweiligen Zelllinie dargestellt. Signifikante Differenzen zwischen den beiden Tumorzelllinien sind in der Spalte der IGROV-1-Tumoren mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

	OC316			IGROV-1		
	n	MW	SD	n	MW	SD
AZD3965 behandelt	8	48,4 %	19,7 %	10	7,5 % *	11,1 %
Kontrollgruppe	12	37,4 %	23,1 %	16	10,4 % *	7,8 %
Gesamtes Kollektiv	20	41,8 %	22,0 %	26	9,3 % *	9,1 %

Tabelle 10 stellt für beide Tumorzelllinien die prozentuale Angabe des gemittelten Nekroseanteils innerhalb der untersuchten Gruppen dar.

Im Vergleich der Xenografts der Linien OC316 und IGROV-1 zeigte sich für beide Kollektive sowie in den Untergruppen der behandelten und unbehandelten Tumoren signifikante Differenzen von bis zu 40,9 Prozentpunkten zwischen den Nekroseanteilen. Sowohl in der Gruppe der AZD3965-behandelten Tumoren, als auch innerhalb der Kontrollgruppe besaßen die OC316-Tumoren in Bezug auf ihre Gesamtfläche deutlich größere Nekroseareale als die Tumoren der Zelllinie IGROV-1.

4.2. Charakterisierung des Expressionsmusters von MCT1, MCT4 und CD147

Die Analyse der Expression von MCT1, MCT4 und CD147 in Tumoren der Zelllinien OC316 und IGROV-1 und ihrer möglichen Beeinflussung durch eine Behandlung mit dem MCT1-Hemmstoff AZD3965 erfolgte durch immunhistochemische Verfahren.

Der ursprüngliche Arbeitsplan sah eine Immunfluoreszenzfärbung der Gewebeschnitte mit Stützung der Werte mittels Western Blots vor.

Von diesem Vorhaben musste aufgrund mangelnder Differenzierungsmöglichkeit der dabei verwendeten Antikörper abgesehen und die Methode durch die DAB-Immunhistochemie ersetzt werden.

Um den Vergleich der beiden immunhistochemischen Verfahren zu erleichtern, werden ihre Ergebnisse im folgenden Kapitel parallel zueinander dargestellt und erläutert. Im Anschluss findet sich eine kurze Darstellung der Problematik der Western Blot-Methode.

4.2.1. Immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten

In beiden immunhistochemischen Verfahren wurden kryokonservierte Gewebeschnitte von 10 µm Dicke mit Primärantikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine MCT1, MCT4 und CD147 inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper über einen Fluorochrom- bzw. Chromogen-gekoppelten Sekundärantikörper und die zellzahlbezogene Auswertung seiner Signal- bzw. Farbinintensität.

Für die Fluoreszenzfärbung war dies computerbasiert möglich, wogegen die Beurteilung der DAB-Färbung durch fünf unabhängige Personen mit Hilfe einer Nominalskala vorgenommen wurde (s. Abb. 7). Die dabei ermittelten Intensitätswerte entsprechen der Ausprägung der Expression des jeweiligen Zielproteins.

In Abbildung 15 finden sich exemplarische Aufnahmen der beiden immunhistochemischen Färbungen der Proteine MCT1, MCT4 und CD147. Bereits in der optischen subjektiven Auswertung fallen deutliche Unterschiede im Expressionsmuster zwischen beiden Tumorzelllinien sowie zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe auf. Im Vergleich der unbehandelten Tumoren von OC316 und IGROV-1 zeigt sich in den Aufnahmen beider Verfahren eine Differenz in der Expression von MCT4. Ebenso deutlich ist die stark reduzierte Signal- bzw. Farbinintensität der MCT1-Färbung von AZD3965-behandelten Tumoren beider Zelllinien in Bezug auf die Färbung in den entsprechenden Kontrollgruppen.

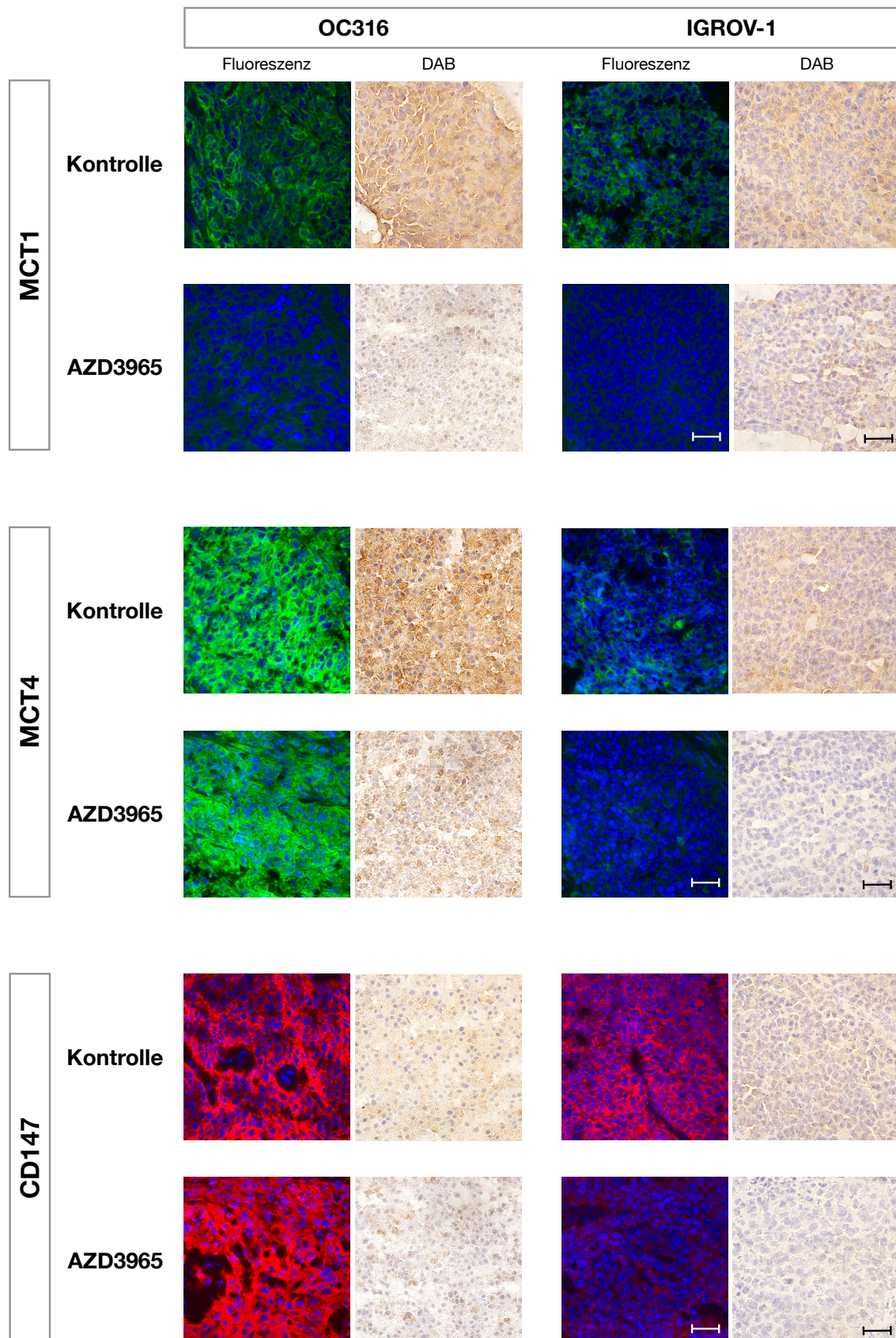


Abbildung 15: Repräsentative IHC-Färbungen der Proteine MCT1, MCT4 und CD147 an OC316 und IGROV-1-Kryoschnitten

Gezeigt sind ausgewählte Schnitte aus Kontroll- und Behandlungsgruppe beider Tumorzelllinien in Fluoreszenz- und DAB-immunhistochemischer Färbung. Der abgebildete Maßstab entspricht in beiden Färbemethoden 50 µm.

4. Ergebnisse

Andere optische Differenzen lassen sich in den Aufnahmen der Fluoreszenzfärbung bereits vermuten, sind aber weniger ausgeprägt in den DAB-Abbildungen zu finden. Weitere Aussagen bezüglich einer Unterscheidung oder Änderung im Expressionsmuster der untersuchten Proteine konnten daher optisch nicht sicher getroffen werden.

Die folgenden Abbildungen 16-19 zeigen die objektive computerbasierte Analyse der Fluoreszenzfärbung sowie die zusammengefasste Auswertung der DAB-Immunhistochemie durch fünf unabhängige Personen.

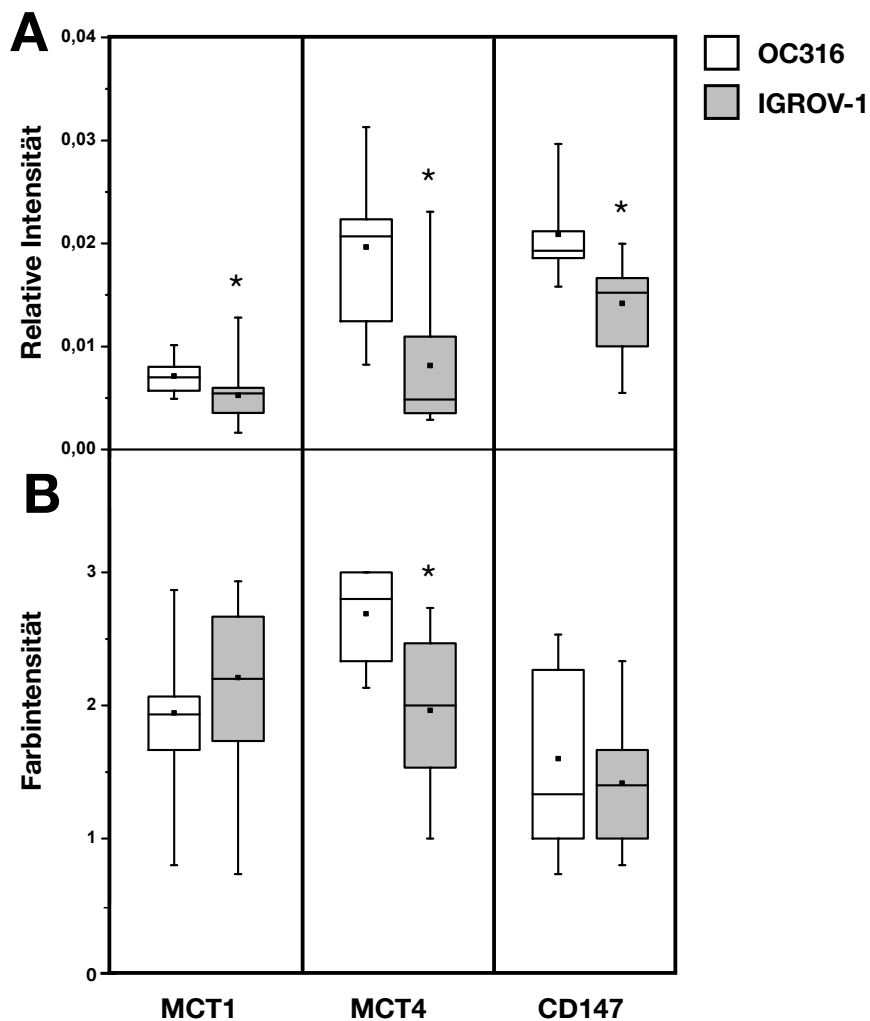


Abbildung 16: Expression der Proteine MCT1, MCT4 und CD147 in immunhistochemisch gefärbten Schnitten unbehandelter OC316- und IGROV-1-Tumoren

Die zellzahlbezogene relative Intensität des Fluoreszenzsignals der Fluoreszenz-Immunhistochemie (A) bzw. die Intensität der Braunfärbung in der DAB-Färbung (B) zeigen die Expressionsdichte des untersuchten Zielproteins an.

$N_{OC316} = 12$ Tumoren; $n_{OC316} = 60/36$ (Fluoreszenz-/DAB-Färbung) ausgewertete Sektoren

$N_{IGROV-1} = 16$ Tumoren; $n_{IGROV-1} = 80/48$ (Fluoreszenz-/DAB-Färbung) ausgewertete Sektoren

Abbildung 16 zeigt die Gegenüberstellung der Kontrollgruppen der beiden Tumorzelllinien, um einen Vergleich der Expressionsmuster zwischen OC316 und IGROV-1 zu ermöglichen.

In der Fluoreszenzfärbung konnte für alle untersuchten Proteine eine signifikante Differenz der gemittelten Intensitätswerte zwischen OC316- und IGROV-1-Tumoren und damit ein signifikanter Unterschied in ihrer Expression gezeigt werden. Sowohl für MCT1 als auch MCT4 und CD147 wies die Zelllinie IGROV-1 im Mittel geringere relative Intensitätswerte auf.

Am deutlichsten ist diese Differenz in der Analyse der MCT4-Fluoreszenzfärbung. Hier zeigte das Kollektiv der IGROV-1-Tumoren eine 60% geringere gemittelte Expression im Vergleich zur Gruppe der OC316-Tumoren (IGROV-1: $0,008 \pm 0,006$; OC316: $0,020 \pm 0,007$).

Die Beobachtungen der Fluoreszenzfärbung konnten in der DAB-Färbung für MCT4 ebenfalls als signifikant nachgewiesen werden. Auch in der Auswertung der CD147-Anfärbung wiesen Tumoren des IGROV-1-Kollektivs verglichen mit Tumoren der Linie OC316 einen geringeren mittleren Intensitätswert auf. Ein Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden immunhistochemischen Verfahren zeigte sich in der Analyse der MCT1-Expression. Die DAB-Färbung ergab für diesen Transporter einen höheren gemittelten Farbinintensitätswert für die Gruppe der IGROV-1-Tumoren (IGROV-1: $2,208 \pm 0,593$; OC316: $1,944 \pm 0,548$).

Die folgenden Abbildungen 17-19 stellen die Veränderungen in der Expression der untersuchten Zielproteine bei Behandlung der tumortragenden Versuchstiere mit AZD3965 dar.

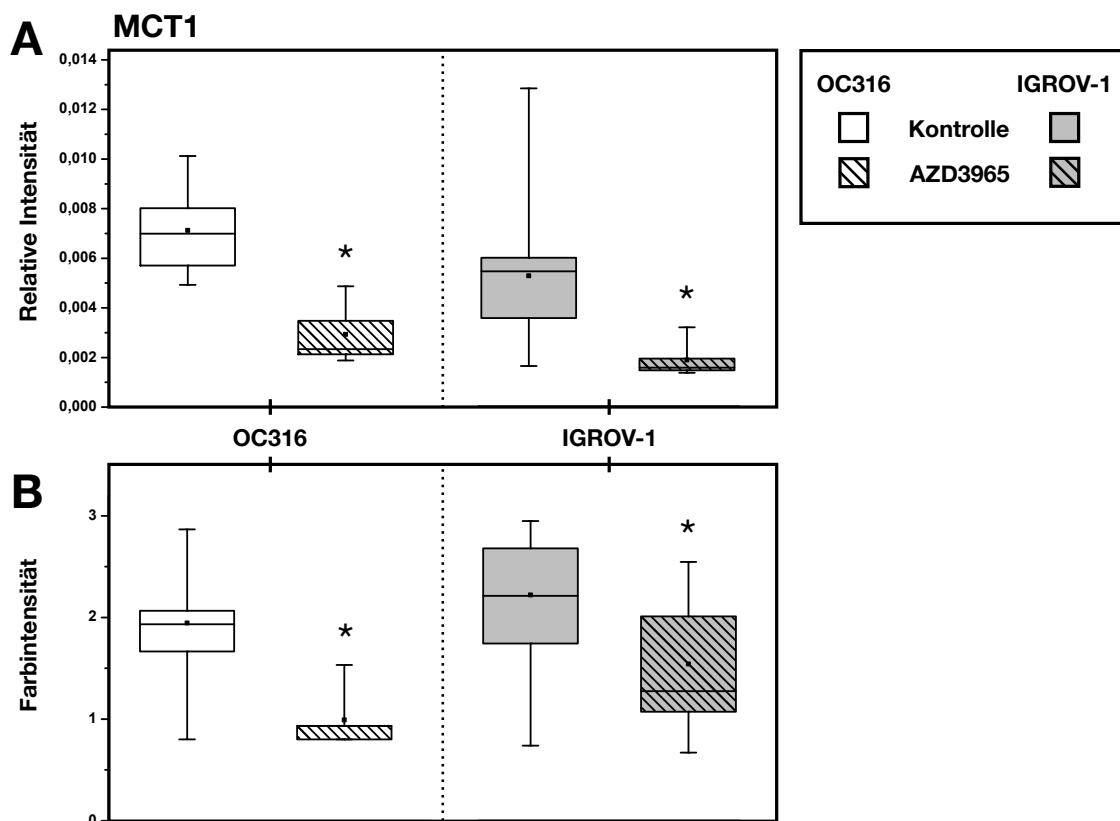


Abbildung 17: Expression von MCT1 in immunhistochemisch gefärbten Schnitten unbehauelter und AZD3965-behandelter OC316- und IGROV-1-Tumoren

Die Grafik zeigt die ermittelten Intensitätswerte der immunhistochemischen Fluoreszenz- (A) und DAB- (B) Färbung von MCT1.

Kontrollkollektiv: $N_{OC316} = 12$ Tumoren; $N_{IGROV-1} = 16$ Tumoren

AZD3965-Kollektiv: $N_{OC316} = 8$ Tumoren; $N_{IGROV-1} = 10$ Tumoren

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte für die Fluoreszenzfärbung computerbasiert an $n = 5$ Sektoren und für die DAB-Färbung durch fünf unabhängige Personen an jeweils $n = 3$ Sektoren je Tumorschnitt.

Die Gegenüberstellung der Kontroll- und Behandlungskollektive in Abbildung 17 zeigt eine signifikante Differenz in der Ausprägung der MCT1-Expression bei AZD3965-Behandlung.

Beide immunhistochemischen Methoden ergaben in der Gruppe behandelter OC316-Xenografts eine Abnahme der gemittelten Intensitätswerte um 59% (F-IHC) bzw. 49% (DAB-IHC) sowie unter den behandelten IGROV-1-Tumoren eine Reduktion um 64% (F-IHC) bzw. 31% (DAB-IHC) und zeigen damit eine deutlich geringere Expression dieses Transporters innerhalb der AZD3965-behandelten Tumoren an.

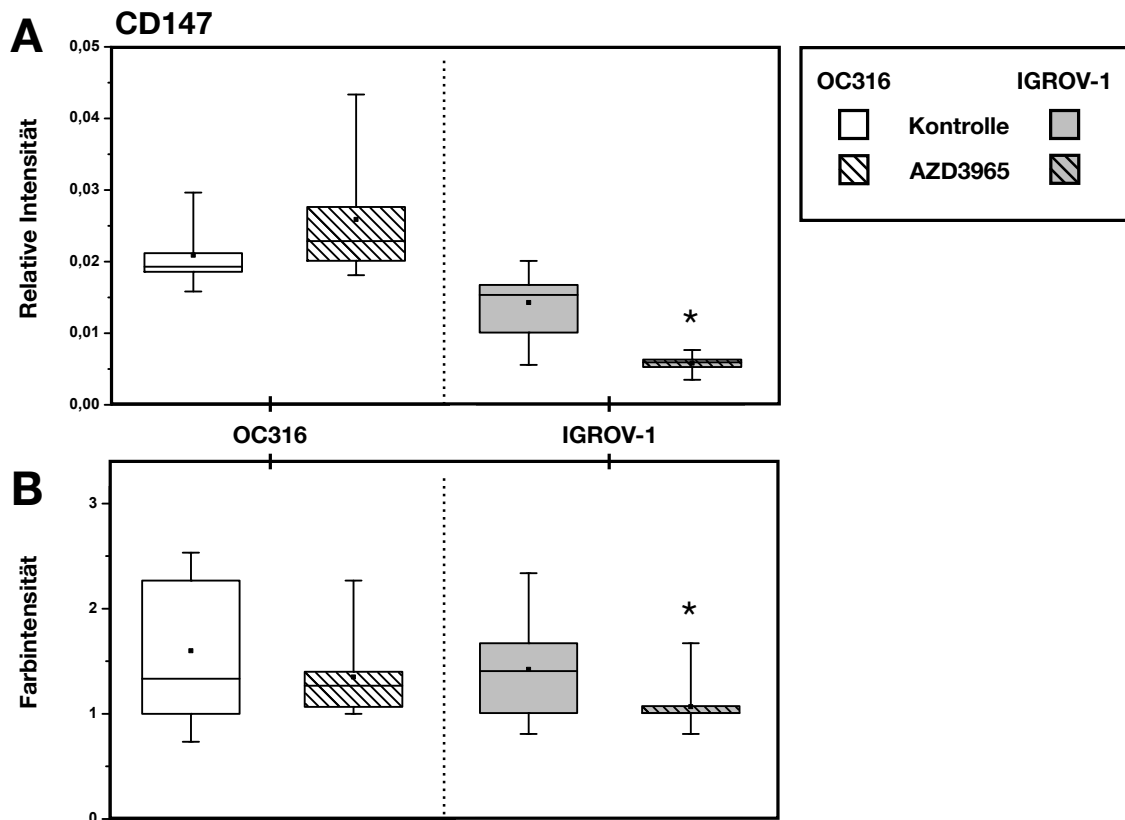


Abbildung 19: Expression von CD147 in immunohistochemisch gefärbten Schnitten unbehauelter und AZD3965-behandelter OC316- und IGROV-1-Tumoren

Die Grafik zeigt die ermittelten Intensitätswerte der immunohistochemischen Fluoreszenz- (A) und DAB- (B) Färbung von CD147. Weitere Details siehe Abbildung 17.

Abbildung 19 zeigt für das Ankerprotein CD147 in beiden Färbungen ebenfalls eine signifikant niedrigere Expression in der Gruppe behandelter IGROV-1-Tumoren. Wie bereits in der Untersuchung der MCT4-Expression, zeigt sich auch für CD147 kein einheitlicher Trend in der Gruppe der OC316-Xenografts bezüglich einer veränderten Expression innerhalb des Behandlungskollektivs. Während für das AZD3965-Kollektiv in der DAB-Färbung eine Abnahme der CD147-Expression zu verzeichnen ist, zeigt dieselbe Gruppe eine Zunahme der CD147-Expression in der Fluoreszenzfärbung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der Gruppe der behandelten IGROV-1-Tumoren eine signifikante Reduktion aller untersuchten Zielproteine in beiden immunohistochemischen Verfahren festgestellt werden konnte.

Neben der deutlichen Abnahme der MCT1-Expression im behandelten IGROV-1-Kollektiv ist diese auch unter den AZD3965-Xenotransplantaten der Zelllinie OC316 als signifikant aufgefallen, während über die Expression der Proteine MCT4 und

CD147 im behandelten OC316-Kollektiv keine eindeutige Aussage anhand signifikanter und einheitlicher Ergebnisse der Färbemethoden getroffen werden kann.

4.2.2. Immunhistochemische Färbung kultivierter Zellen

Trotz Fokussierung dieser Arbeit auf die Untersuchung der Hemmstoffwirkung von AZD3965 *in vivo*, ist ein Vergleich mit der *in vitro* Wirkung sowie die Charakterisierung des Proteinexpressionsmusters unbehandelter OC316 und IGROV-1-Zellen ebenfalls interessant. Aus diesem Grund wurde für eine Auswahl kultivierter unbehandelter und AZD3965-behandelter Zellen gleichsam das Verfahren der Fluoreszenz-Immunhistochemie angewendet. Die Darstellung der relativen Intensitätswerte aus diesen Messungen finden sich in den folgenden Abbildungen 20 und 21. Aufgrund eines mangelhaften Objektträgers musste die Anzahl der CD147-gefärbten IGROV-Zellareale auf $n = 4$ reduziert werden.

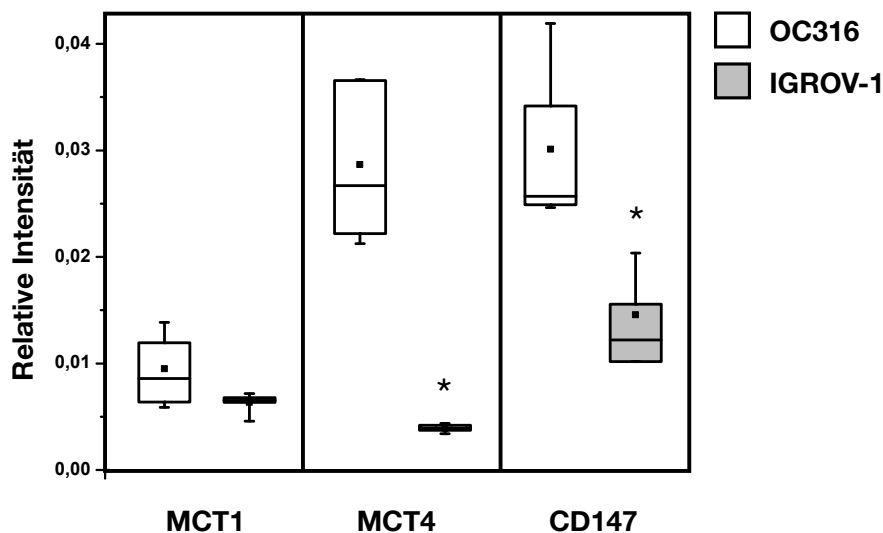


Abbildung 20: Expression von MCT1, MCT4 und CD147 in immunhistochemisch gefärbten unbehandelten OC316- und IGROV-1-Zellen

Gezeigt sind die ermittelten relativen Intensitätswerte der Fluoreszenz-Immunhistochemie an kultivierten, auf Objektträgern fixierten Zellen.

MCT1/ MCT4: $N = 6$ Zellareale pro Zelllinie; $n = 30$ ausgewertete Sektoren pro Zellareal

CD147: $N_{OC316} = 6$ Zellareale; $n = 30$ Sektoren; $N_{IGROV-1} = 4$ Zellareale; $n = 20$ Sektoren

Abbildung 20 zeigt zunächst eine Übersicht über die Expression von MCT1, MCT4 und CD147 im Vergleich der beiden unbehandelten Zelllinien.

Für alle drei untersuchten Proteine ergibt sich die Tendenz eines geringeren Vorkommens innerhalb der Zelllinie IGROV-1. Für MCT4 und CD147 ließ sich diese Tendenz als signifikant nachweisen. Besonders ausgeprägt stellt sich die Differenz in

4. Ergebnisse

der Proteinexpression des Transporters MCT4 dar. Hier wurde für die Tumorzellen des unbehandelten IGROV-1-Kollektivs eine um 86 % geringere relative Intensität der Messwerte festgestellt (OC316: $0,029 \pm 0,007$; IGROV-1: $0,004 \pm 0,0003$).

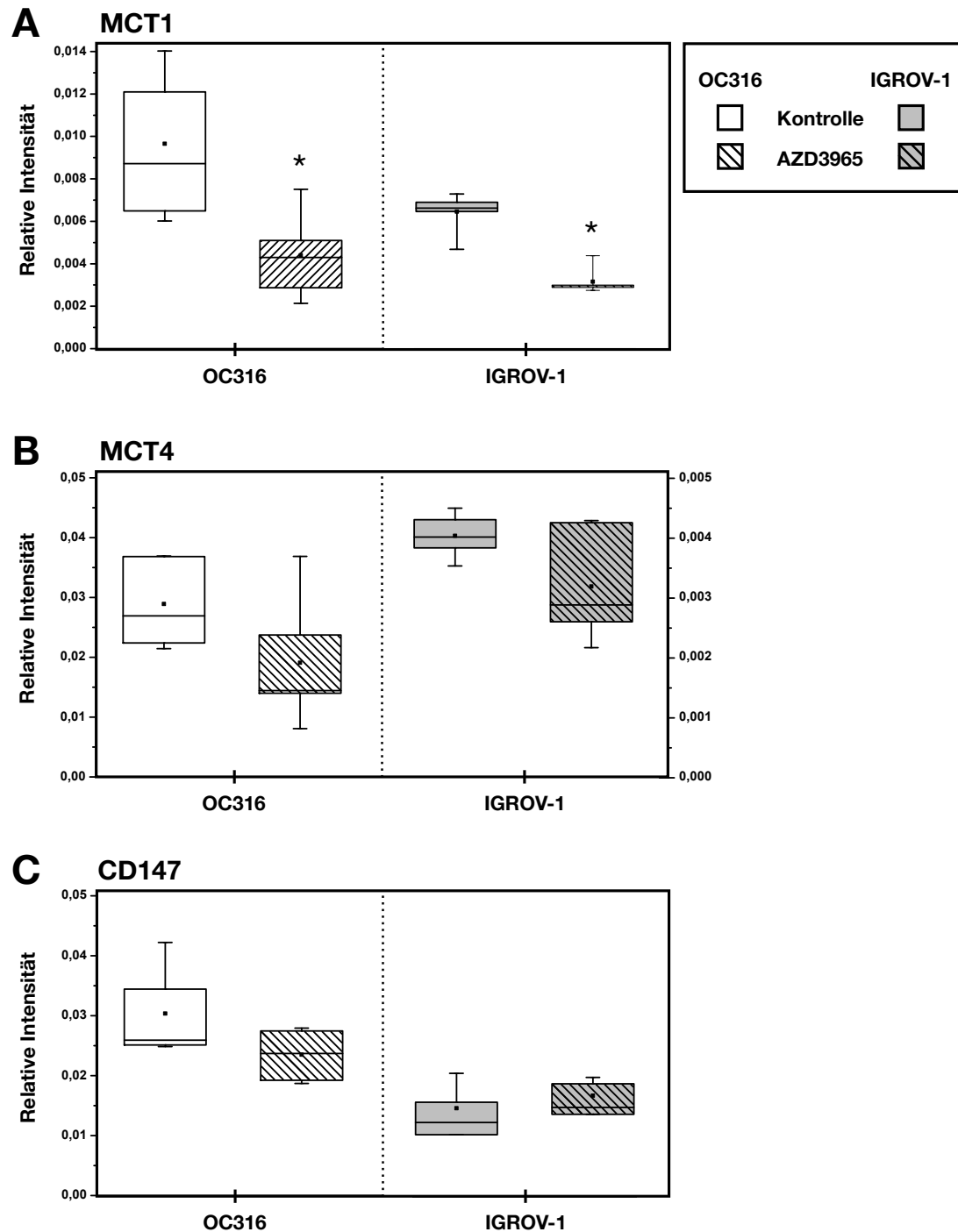


Abbildung 21: Expression von MCT1 (A), MCT4 (B) und CD147 (C) in immunhistochemisch gefärbten unbehandelten und AZD3965-behandelten OC316- und IGROV-1-Zellen

Die Grafik zeigt die auf die Zellzahl bezogenen relativen Intensitätswerte der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung der drei Zielproteine.

MCT1/ MCT4: N = 6 Zellareale pro Kollektiv (Kontrolle bzw. AZD3965);

n = 30 ausgewertete Sektoren pro Zellareal

CD147: N_{OC316} = 6 Zellareale pro Kollektiv (Kontrolle bzw. AZD3965); n = 30 Sektoren

N_{IGROV-1} = 4 Zellareale pro Kollektiv (Kontrolle bzw. AZD3965); n = 20 Sektoren

Abbildung 21 zeigt die Gegenüberstellung der Expressionsmuster unbehandelter und AZD3965-behandelter Zellen der Linien OC316 und IGROV-1.

Bei Betrachtung der Zelllinie OC316 wurde für alle drei untersuchten Transporter eine Reduktion der gemittelten Intensitätswerte unter AZD3965-Behandlung und damit im Mittel eine verminderte Expression des entsprechenden Proteins deutlich. Die Abnahme der MCT1-Fluoreszenzintensität von 56 % unter AZD3965-Therapie (Kontrolle: $0,010 \pm 0,003$; AZD3965: $0,004 \pm 0,002$) ist dabei als signifikant anzusehen.

Auch für die Zelllinie IGROV-1 ergab sich eine signifikante Abnahme der MCT1-Expression von 50 % zwischen der Kontrollgruppe und den AZD3965-behandelten Zellen (Kontrolle: $0,006 \pm 0,001$; AZD3965: $0,003 \pm 0,001$).

In der Expressionsdichte von MCT4 ist ebenso eine Differenz der gemittelten relativen Intensitätswerte zwischen Kontroll- und AZD3965-Gruppe festzustellen. Diese ist jedoch nicht als signifikant zu betrachten. Dies gilt gleichfalls für die gemittelten Werte der CD147-Färbung. Hier zeigt die Gruppe der AZD3965-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen höhere Intensitätswerte.

4.2.3. Western Blot

Im Verlauf der ersten Western Blot-Auswertungen ergaben sich deutlich von der immunhistochemischen Analyse abweichende Ergebnisse. In der Analyse möglicher Fehlerquellen der Methoden wurden unter anderem Western Blots unterschiedlicher muriner Gewebe (Herz- und Muskelgewebe sowie Gewebe aus der Implantationsumgebung) sowie von Matrigel vor und nach Implantation im Versuchstier angefertigt. Abbildung 22 zeigt exemplarisch Membranaufnahmen dieser Messungen.

Es fällt auf, dass der Nachweis des Transporters MCT1 durch den verwendeten Antikörper für nahezu alle aufgetragenen Proben möglich war. Lediglich für Matrigel vor Implantation waren keine Banden auf der Membran festzustellen. Ähnliches galt für den Nachweis von MCT4 und CD147. Diese Proteine konnten sowohl im murinen Muskelgewebe als auch im implantierten Matrigel detektiert werden. Die Tatsache, dass Antikörper, welche zur Bestimmung humaner Proteine verwendet werden sollten, auch murine Proteine nachwies sowie diese bereits in implantiertem Matrigel detektierten, machte eine weitere Verwendung dieser Methode unmöglich.

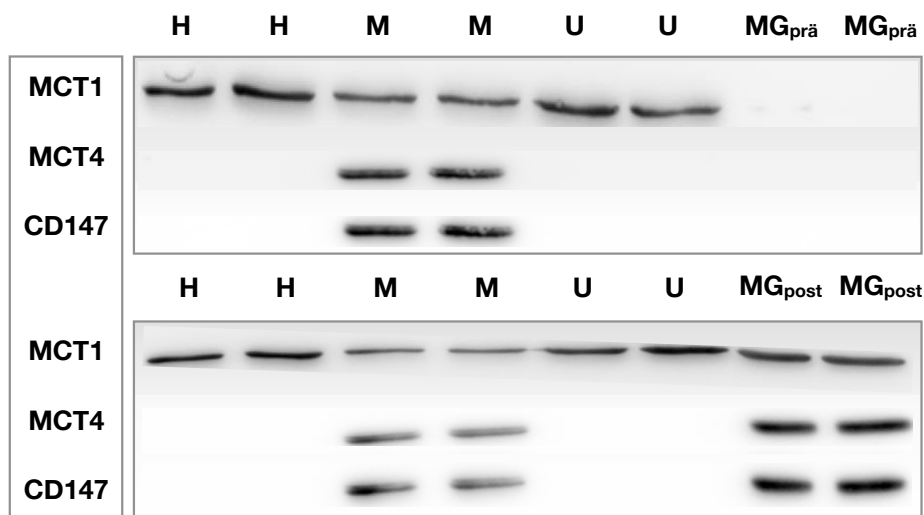


Abbildung 22: Nachweis der Proteinexpression von MCT1, MCT4 und CD147 in murinen Geweben und Matrigel

Dargestellt ist die Zusammenstellung mehrerer Membranaufnahmen aus Western Blots zur Kontrolle der Spezifität der verwendeten Antikörper gegen MCT1, MCT4 und CD147 für humanes Gewebe.

Murines Gewebe: H: Herz, M: Muskel, U: Umgebung

MGprä: Matrigel vor Implantation, MGpost: Matrigel nach Implantation in das Versuchstier

Da innerhalb der immunhistochemischen Färbung humanes Tumorgewebe am Mikroskop eindeutig von Matrigel unterschieden werden kann, gab dies den Ausschlag, die Western Blot-Methode durch eine weitere Methode der Immunhistochemie zu ersetzen.

4.3. Charakterisierung des Metabolitstatus mittels Biolumineszenz

Die arealspezifische quantitative Analyse des Metabolitstatus der Tumoren erfolgte durch das Verfahren der bildgebenden Biolumineszenz.

Das Messprotokoll sah pro Tumor eine Dreifachbestimmung für jeden Metaboliten vor. Dies konnte für nahezu alle Kryoschnitte gewährleistet werden. Für wenige dieser Schnitte ergaben sich jedoch nicht auswertbare Werte, da diese außerhalb des Messbereichs lagen oder keinen ATP-Nachweis und damit kein vitales Gewebe zeigten. Aufgrund der Dreifachbestimmung ging jedoch jeder Tumor mit mindestens einer Schnittserie, bestehend aus ATP-, Glucose- und Laktat-Bestimmung, in die Gesamtauswertung ein.

Für eine Auswahl an Tumoren zeigt Abbildung 23 exemplarisch farbkodierte Darstellungen der ermittelten Metabolitverteilungen von ATP, Glucose und Laktat. Zwischen den Metabolitstatus der verglichenen Tumorgruppen wird in dieser Bildauswahl kein Unterschied deutlich.

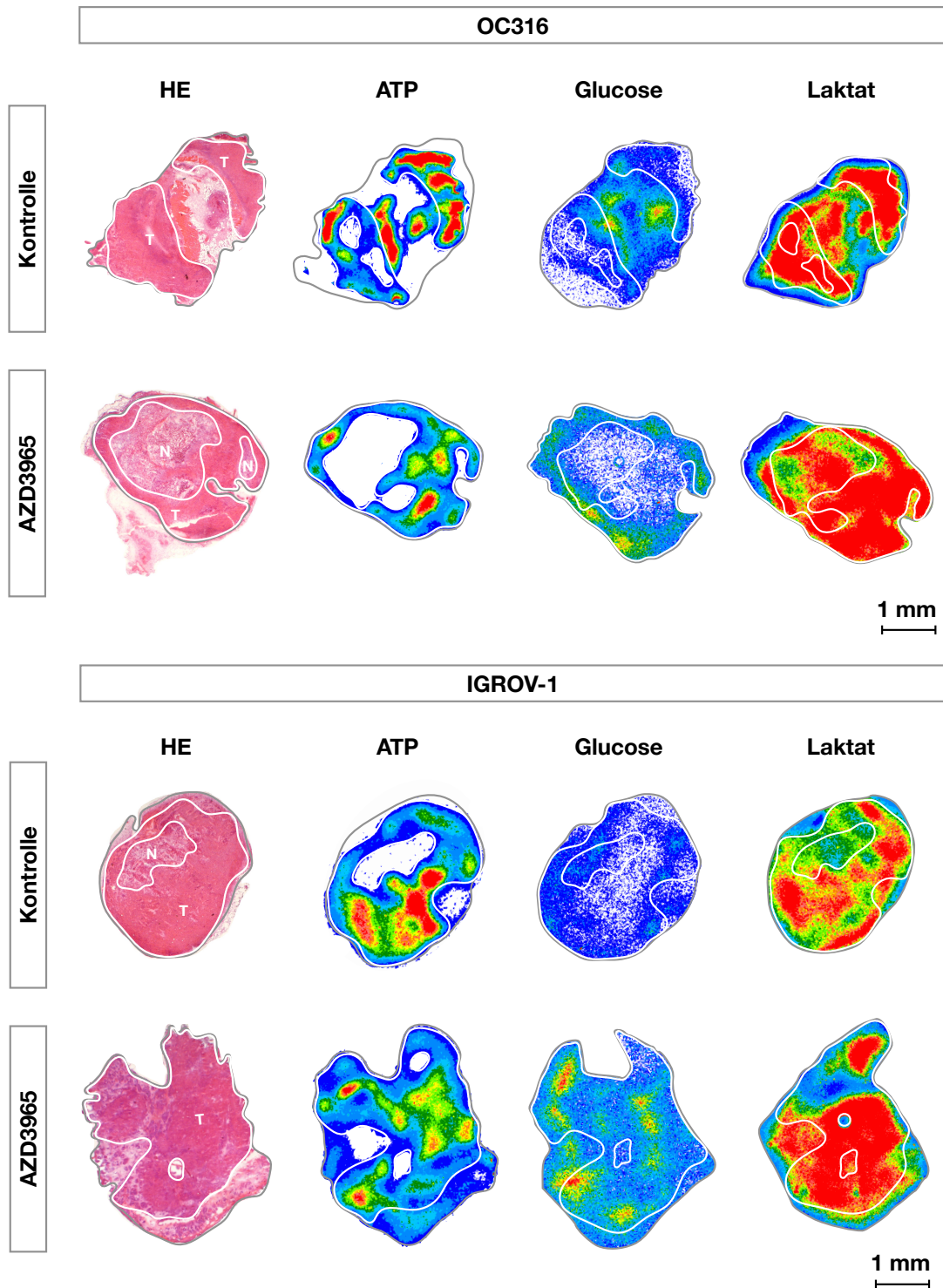


Abbildung 23: Repräsentative Darstellung von HE-Färbungen und falschfarbenkodierten Biolumineszenzbildern ausgewählter OC316- und IGROV-1-Experimentaltumoren

Gezeigt sind HE-Färbungen sowie Biolumineszenzbilder der Metabolite ATP, Glucose und Laktat von vier ausgewählten Tumorschnittserien. Die Metabolitverteilung (in $\mu\text{mol/g}$) in den Bildern der Biolumineszenzmessung ist farblich kodiert (s. Legende rechts). Graue Linie: Umriss des gesamten Kryoschnitts, weiße Linie: Umriss des vitalen Tumorareals, T: Tumor, N: Nekrose.

in $\mu\text{mol/g}$		
ATP	Glucose	Laktat
< 0,5	< 0,5	< 4,0
0,5 - 1,0	0,5 - 1,0	4,0 - 8,0
1,0 - 1,5	1,0 - 1,5	8,0 - 12,0
1,5 - 2,0	1,5 - 2,0	12,0 - 16,0
2,0 - 2,5	2,0 - 2,5	16,0 - 20,0
2,5 - 3,0	2,5 - 3,0	20,0 - 24,0
3,0 - 3,5	3,0 - 3,5	24,0 - 28,0
3,5 - 4,0	3,5 - 4,0	28,0 - 32,0
4,0 - 4,5	4,0 - 4,5	32,0 - 36,0
> 4,5	> 4,5	> 36,0

4. Ergebnisse

Bei gemeinsamer Betrachtung aller dargestellten Schnitte ist jedoch das starke Biolumineszenzsignal der Laktatmessung auffällig. Dieses findet sich sowohl in der Gruppe der OC316- als auch der IGROV-1-Tumoren und überschreitet die Grenze zwischen vitalem und nekrotischem Tumorgewebe.

Des Weiteren ist die niedrige intratumorale Glucosekonzentration in allen betrachteten Schnitten zu bemerken.

Abbildung 24 stellt die quantitative Analyse der Konzentrationen von ATP, Glucose und Laktat innerhalb des Tumorgewebes der unbehandelten OC316- und IGROV-1-Tumoren dar.

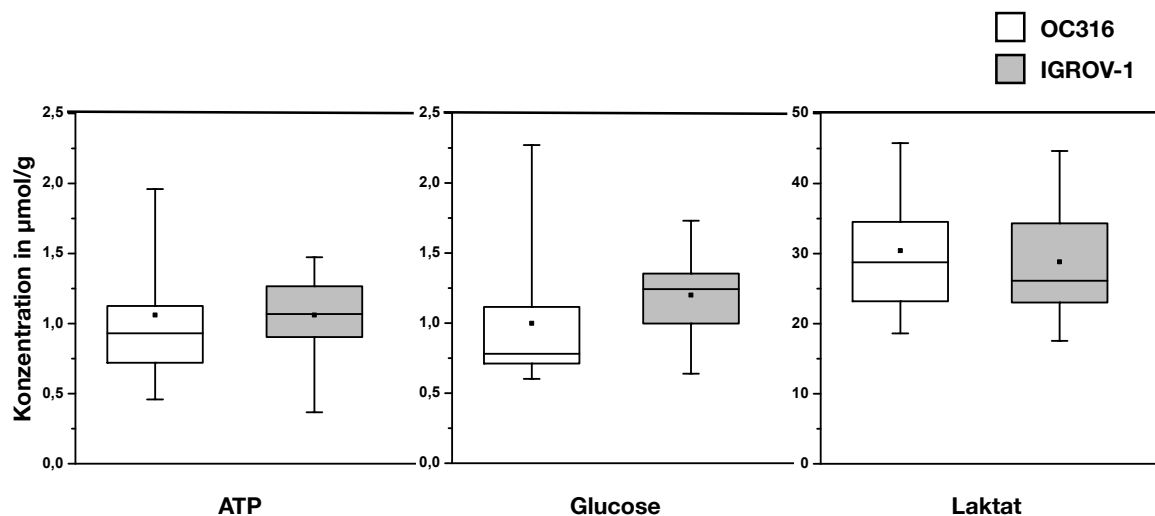


Abbildung 24: Gegenüberstellung der Biolumineszenz-Messungen von Schnittserien unbehandelter OC316- und IGROV-1-Xenografts

Dargestellt sind der ATP-, Glucose- und Laktatgehalt in µmol/g für N = 12 OC316-Tumoren (n = 103 Schnitte) und N = 16 IGROV-1 Tumoren (n = 138 Schnitte). Für jeden Tumor wurden Serien aus vier direkt aufeinanderfolgenden Kryoschnitten (1 HE-Bild + 3 Metabolitschnitte) angefertigt und die Auswertung anhand der Informationen aus HE- und ATP-Bild nur in vitalem Gewebe vorgenommen.

Im Vergleich der beiden Zelllinien wird kein signifikanter Unterschied der untersuchten Metabolite sichtbar. Es ist lediglich eine Tendenz zu höheren Glucosewerten innerhalb der IGROV-1-Kontrollgruppe zu erkennen.

Der bereits in der Falschfarbenkodierung auffällig niedrige Glucosegehalt innerhalb des Tumorgewebes der exemplarisch ausgewählten Xenotransplantate erscheint in Abbildung 24 für nahezu das gesamte Kollektiv beider Zelllinien zuzutreffen. Selbiges gilt für die gemittelten Laktatwerte beider Zelllinien, welche keinen Unterschied zwischen der hochglykolytischen Linie OC316 und der als niedrigglykolytisch charakterisierten Linie IGROV-1 sichtbar werden lassen.

Aufgrund der Vermutung eines Zusammenhangs zwischen erhöhten intratumoralen Laktatwerten als Zeichen hypoxischer Konditionen und der Ausbildung von Nekrosen, wurden in Abbildung 25 die gemittelten Laktatkonzentrationen der einzelnen Tumoren gegen den grafisch ermittelten Nekroseanteil des entsprechenden HE-Schnitts aufgetragen.

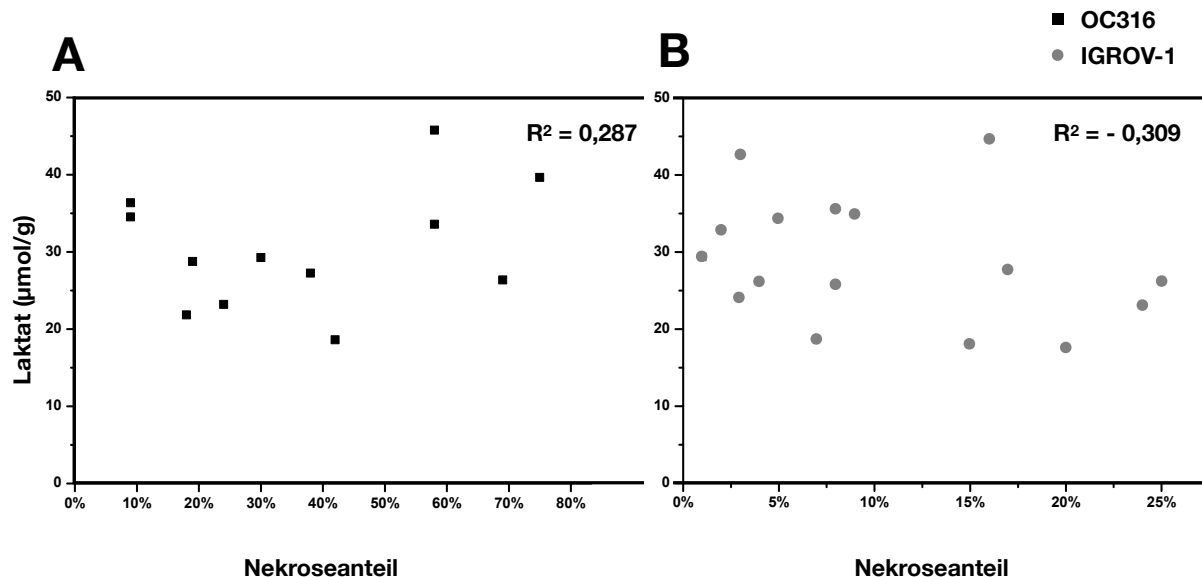


Abbildung 25: Laktatgehalt in Kryoschnitten unbehandelter OC316- und IGROV-1-Tumoren in Bezug auf ihren Nekroseanteil

Für N = 12 OC316 Tumoren (n = 33 Schnitte) (A) und N = 16 IGROV-1 Tumoren (n = 44 Schnitte) (B) ist der aus dem HE-Bild errechnete Nekroseanteil der jeweiligen Xenotransplantate gegen den in der Biolumineszenzmessung ermittelten Laktatgehalt (in µmol/g) dieser Tumoren aufgetragen.

R² = Korrelationskoeffizient.

Da eine Beeinflussung des intratumoralen Laktatgehalts durch AZD3965 vermutet wird, wurden nur die Kontrollkollektive beider Tumorzelllinien betrachtet. Sowohl grafisch als auch durch die statistische Analyse konnte keine Korrelation zwischen der Höhe des Nekroseanteils und der intratumoralen Laktatkonzentration festgestellt werden.

Die Gegenüberstellung von AZD3965-behandelten und unbehandelten Tumoren der Zelllinien OC316 und IGROV-1 findet sich in Abbildung 26.

Für beide Zelllinien ergaben sich durch die AZD3965-Therapie keine signifikanten Änderungen in der Metabolitkonzentration von ATP. Auffällig ist sowohl in der Betrachtung der OC316- als auch der IGROV-1-Tumoren eine signifikante Zunahme der gemittelten Glucosekonzentration in den AZD3965-Kollektiven um 57% (OC316) und 85% (IGROV-1).

4. Ergebnisse

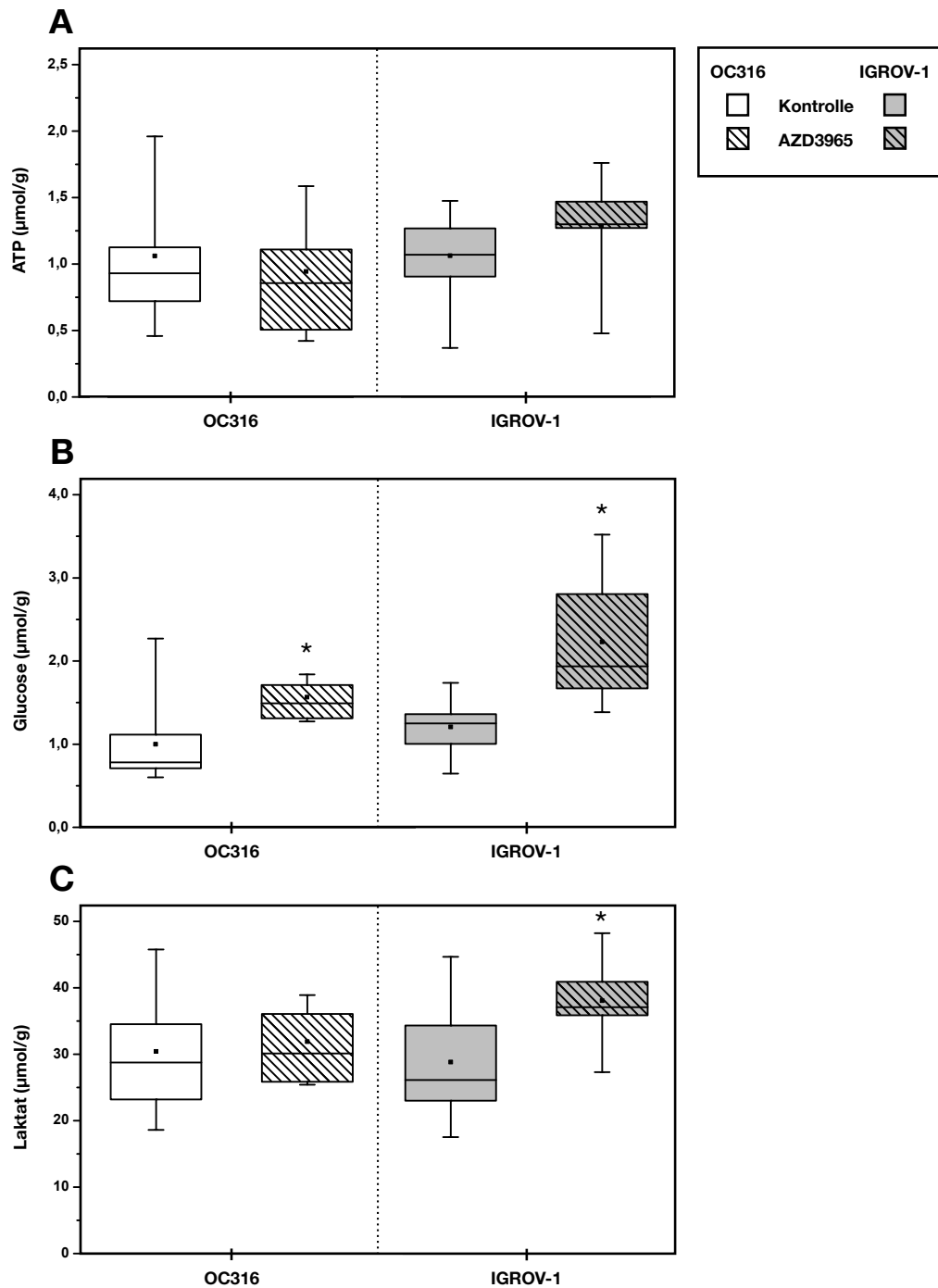


Abbildung 26: Biolumineszenz-Messungen von Schnittserien unbehandelter und AZD3965-behandelter OC316- und IGROV-1-Xenografts

Gezeigt ist die Gegenüberstellung der Metabolitkonzentrationen (in $\mu\text{mol/g}$) von ATP (A), Glucose (B) und Laktat (C) unbehandelter und AZD3965-behandelter Tumoren der Linien OC316- und IGROV-1.

Kontrollkollektiv: $N_{\text{OC316}} = 12$ Tumoren ($n = 103$ Schnitte); $N_{\text{IGROV-1}} = 16$ Tumoren ($n = 138$ Schnitte)
AZD3965-Kollektiv: $N_{\text{OC316}} = 8$ Tumoren ($n = 63$ Schnitte), $N_{\text{IGROV-1}} = 10$ Tumoren ($n = 79$ Schnitte)

Während die intratumorale Durchschnittskonzentration von Laktat in der Gruppe der OC316-Tumoren unter AZD3965-Behandlung nahezu unverändert bleibt, ist sie innerhalb des behandelten IGROV-1-Kollektivs im Vergleich mit dem Durchschnittswert der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

5. Diskussion

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Wirkungsbeschreibung des MCT1-Inhibitors AZD3965 auf die Proteinexpression und den Metabolitstatus von Ovarialtumoren der Zelllinien OC316 und IGROV-1. Die Charakterisierung beider Zelllinien bezüglich ihres Stoffwechsels und ihrer Proteinexpression ist vor allem im *in vitro* Modell bereits erfolgt. Auf Basis der Beschreibung der Linien als hoch- bzw. niedrigglykolytisch und der unterschiedlichen Dichte ihrer MCT4-Expression sollten in dieser Arbeit mögliche Unterschiede in der Auswirkung einer MCT1-Hemmung auf die jeweiligen Tumorzelllinien analysiert werden. Gleichzeitig konnte mit den erhaltenen Daten der Kontrollgruppen auch ein *in vivo* Vergleich der beiden Zelllinien vorgenommen werden.

Im Folgenden soll eine Diskussion der Ergebnisse unter kritischer Betrachtung der dabei verwendeten Methoden erfolgen.

5.1. Charakterisierung von Tumorwachstum und Nekrosenbildung

Eine Gegenüberstellung der beiden untersuchten Zelllinien bezüglich ihres Wachstums findet sich in der Literatur bisher nur für das *in vitro* Modell, in welchem für beide Tumorzelllinien ein ähnlicher Proliferationsverlauf nachgewiesen werden konnte (Favaro et al., 2008).

Um in dieser Arbeit einen Vergleich zwischen den Wachstumsverläufen der beiden Tumorzelllinien *in vivo* zu ziehen, muss jedoch die Differenz in der implantierten Tumorzellzahl beachtet werden. Während sich Xenotransplantate der Linie OC316 auf Basis einer Implantation von 8×10^4 Zellen/100 μ l Matrigelmatrix entwickelten, war die Zellzahl für IGROV-1-Tumoren mit 6×10^4 Zellen/100 μ l Matrigelmatrix um 25% geringer. Aus diesem Grund ist kein absoluter Volumenvergleich möglich, jedoch kann die relative Volumenzunahme über den Wachstumszeitraum gegenübergestellt werden.

Die initiale Volumenabnahme in beiden Kurvenverläufen lässt sich mit der Resorption der Matrigelmatrix erklären. Ausgehend von dieser anfänglichen Volumenreduktion zeigten die OC316-Xenotransplantate einen direkten steilen Volumenanstieg, welcher bereits in der Erstbeschreibung dieser Zelllinie im Mausmodell beobachtet und als aggressiv infiltrierend charakterisiert wurde (Alama et al., 1996).

Auch murine Xenotransplantate der Linie IGROV-1 wurden in der Erstbeschreibung bereits als schnell wachsende Tumoren bezeichnet (Bénard et al., 1985). Ein solcher Wachstumsverlauf lässt sich ab der Mitte des Beobachtungszeitraums in Abbildung 14 erahnen. Dieser wäre womöglich bei längerer Implantationsdauer noch deutlicher, erscheint aber weiterhin flacher verglichen mit der Kurve des OC316-Kollektivs.

Die längere Zeit bis zum Beginn einer steten Volumenzunahme ist möglicherweise mit der geringeren implantierten Zellzahl und der damit einhergehenden längeren Zeit bis zur Entwicklung eines deutlich palpablen Tumors zu erklären. Dementsprechend sind die signifikanten Differenzen der mittleren absoluten Volumina am 21. Messtag sowie die signifikanten Unterschiede der Volumenzunahme zwischen dem 2. und 21. Messtag auch unter dem Gesichtspunkt unterschiedlicher Implantationszahlen zu betrachten.

Gleichzeitig könnte der über den gesamten Beobachtungszeitraum flachere Verlauf der Volumenzunahme der IGROV-1 Tumoren auch Zeichen des weniger intensiven glykolytischen Metabolismus mit niedrigerer Produktionsrate proliferationsrelevanter Zellbausteine sein.

Es bleibt festzuhalten, dass eine eindeutige Aussage über das Wachstumsverhalten der beiden Tumorzelllinien aufgrund der unterschiedlichen implantierten Tumorzellzahl nur schwer zu treffen ist.

Des Weiteren fallen Messfehler bei der Längen- und Breitenbestimmung aufgrund des Fehlerfortpflanzungsgesetzes in der Volumenberechnung deutlich ins Gewicht. Dies ist mitverantwortlich für die breite Streuung der einzelnen Volumina und ergibt eine weitere Einschränkung einer vergleichenden fundierten Beurteilung.

Eine Betrachtung der Größenentwicklung der Tumoren wäre womöglich erst ab dem Erreichen eines bestimmten Mindestvolumens als Startpunkt der Wachstumskurve einheitlicher und damit aussagekräftiger gewesen. Dies war jedoch für das verwendete Tiermodell nicht praktikabel, da jedem Versuchstier zwei Tumoren in die Flanken implantiert worden waren, welche sich oftmals deutlich in ihrem Wachstumsverlauf unterschieden und nur gemeinsam zum Zeitpunkt der Tötung des Versuchstiers entnommen werden konnten.

Ein deutlicher Unterschied in der Tumorentwicklung der beiden Zelllinien zeigt sich in der Ausbildung nekrotischer Areale innerhalb des Tumorgewebes (s. Tabelle 10).

Es muss beachtet werden, dass es sich bei dem betrachteten Gesamtkollektiv um das Resultat einer Vorselektion handelt. Somit wurden bereits stark nekrotische Tumoren und Xenotransplantate ohne nachweisbares Tumorgewebe von weiteren Auswertungen ausgeschlossen. Die Tatsache, dass 18,6 % aller IGROV-1-Tumoren aufgrund starker Nekrosenbildung ausgeschlossen wurden, während dies im OC316-Kollektiv 35,9 % waren, unterstreicht jedoch die Auffälligkeit unterschiedlich starker intratumoraler Nekrosenbildung zwischen den beiden Tumorzelllinien.

Trotz wiederholter Variation der implantierten Zellzahl und Wachstumszeit war es nicht möglich, den Durchschnitt des Nekroseanteils innerhalb des OC316-Kollektivs deutlich zu senken. Daher ist zu vermuten, dass die Ausbildung größerer nekrotischer Areale charakteristischer Bestandteil von Xenotransplantaten dieser Zelllinie ist. Eine solche Annahme wird in der Erstbeschreibung der OC316-Linie nicht gemacht, größere nekrotische Bereiche innerhalb muriner Xenotransplantate werden jedoch in der weiteren Literatur zu OC316-Tumoren beschrieben (Favaro et al., 2008).

Eine mögliche Erklärung für den signifikanten Unterschied der nekrotischen Areale von OC316- und IGROV-1-Tumoren findet sich in der Reaktion dieser Zelllinien auf hypoxischen Stress. Durch *in vitro*-Versuche mit reduzierter O₂-Konzentration konnte für OC316-Zellen eine hohe Hypoxiesensitivität und ein damit verbundener Zelltod beschrieben werden. Bei gleichen sauerstoffreduzierten Bedingungen wiesen IGROV-1-Zellen hingegen keinen hypoxieinduzierten Zelltod auf (Favaro et al., 2008).

Die hypoxiesensitiven Zellen der Linie OC316 zeigten in der histologischen Analyse spätapoptotische bzw. nekrotische Kennzeichen. Demnach ließe sich für das *in vivo*-Modell der OC316-Xenografts folgern, dass die Entstehung intratumoraler Nekrosen auf eine hohe Sensitivität gegenüber intratumoralem Sauerstoffmangel zurückzuführen ist, wogegen Tumoren des IGROV-1-Kollektivs eine relative Resistenz gegenüber einer Hypoxie zeigen.

In vielen soliden Tumoren ergibt sich eine solche chronische Hypoxie aus einem gesteigerten Metabolismus und schnellem Tumorwachstum (Steinbach et al., 2003). Dementsprechend lässt sich für die hypoxiesensitive Zelllinie OC316 ein Zusammenhang zwischen ihrem hochglykolytischen Stoffwechsel, der steilen Volumenzunahme und einer intratumoralen Hypoxie mit resultierender Nekrosenbildung vermuten.

In ihrem hypoxiesensitiven Verhalten, der zentralen Nekrosenbildung, dem hochglykolytischen Stoffwechsel mit starker Expression der Transporter MCT1 und MCT4 sowie der Aggressivität ihres Wachstums weisen Tumoren der Linie OC316 ähnliche Merkmale auf, wie sie für Zellen des Glioblastoms beschrieben worden sind (Jensen, 2009; Kim et al., 2007; Miranda-Goncalves et al., 2016). Für diese Tumorentität ist die zentrale Nekrosenbildung innerhalb des Tumors bereits als charakteristisches Kennzeichen ermittelt worden, welche mit hypoxischen Konditionen assoziiert ist (Miranda-Goncalves et al., 2016).

5.2. Charakterisierung des Expressionsmusters von MCT1, MCT4 und CD147

5.2.1. Unterschiede der Expressionsmuster von OC316 und IGROV-1

Für die Charakterisierung und Interpretation der AZD3965-Wirkung auf den Metabolitstatus und die Proteinexpression der untersuchten Tumoren war zunächst eine Überprüfung der Übertragbarkeit bisheriger *in vitro* Expressionsbefunde auf das *in vivo* Modell nötig.

Die in Abbildung 16 gezeigten Ergebnisse der immunhistochemischen Fluoreszenzfärbungen sind nicht nur stimmig mit den bereits vorhandenen Beschreibungen der beiden Zelllinien in der Literatur, sondern konnten noch in einer eigenen *in vitro* Analyse reproduziert werden.

Besonders deutlich wurde der Unterschied zwischen beiden Tumorzelllinien in der Expressionsdichte von MCT4, welche für die OC316-Tumoren in beiden immunhistochemischen Färbungen der Tumorschnitte sowie in der *in vitro* Fluoreszenzfärbung signifikant höher nachzuweisen war.

OC316 ist als hochglykolytische Zelllinie bereits mehrfach beschrieben worden (Favaro et al., 2008; Fabian et al., 2012), woraus sich zwei Begründungen dieser erhöhten MCT4-Expression ergeben.

Einerseits ist die vor allem in hochglykolytischen Tumoren vorkommende Hypoxie Triggerfaktor einer gesteigerten Expression von MCT4 aufgrund einer Induktion durch HIF-1 α (Ullah et al., 2006). Andererseits ist bekannt, dass unabhängig von hypoxischen Konditionen auch die glykolytischen Endprodukte Pyruvat und Laktat eine Akkumulation von HIF-1 α bewirken und die HIF-1 α induzierte Genexpression aktivieren können (Lu et al., 2002). Als hochglykolytische Zelllinie erreicht OC316

hohe intrazelluläre Laktatwerte, die eine entsprechende Mehrexpression von MCT4 bewirken.

Die IGROV-1-Zelllinie, welche als niedrigglykolytisch metabolisierend charakterisiert worden ist, scheint somit weniger durch große Produktionsmengen von Laktat und intratumoraler Hypoxie beeinflusst zu sein, sodass eine Expression von MCT4 für diese Linie kaum nachzuweisen ist.

In den Ergebnissen dieser Arbeit findet sich ein uneinheitliches Bild der Expression von MCT1 innerhalb der beiden Tumorkollektive, die eine klare Aussage zu einer höheren Expression des Transporters innerhalb einer Zelllinie nicht möglich macht.

Zwar zeigt sich in der Auswertung der immunhistochemischen *in vivo*- und *in vitro*-Fluoreszenzfärbung innerhalb der IGROV-1 Gruppe eine deutlich niedrigere Expression dieses Transporters. Dieses Ergebnis konnte jedoch in der *in vivo*-DAB-Färbung nicht reproduziert werden.

Auch in den bisherigen Beschreibungen des MCT1-Expressionsmusters von OC316- und IGROV-1-Zellen wurde keine deutliche Differenz in der zellbezogenen Transporterdichte zwischen den beiden Linien beobachtet (Fabian, 2013).

Für den Transporter MCT1 konnte eine hypoxieabhängige Expressionsregulation, wie für MCT4 beschrieben, nicht festgestellt werden (Ullah et al., 2006). Ebenso scheint die hohe glykolytische Metabolisierungsrate der OC316-Tumoren keinen starken regulatorischen Einfluss auf das MCT1-Expressionsmuster zu haben, der sich in einer eindeutigen signifikanten Differenz zwischen den beiden unterschiedlich metabolisierenden Zelllinien deutlich machen könnte.

In allen immunhistochemischen Analysen spiegelt die Auswertung der CD147-Expression die Expressionsdichte von MCT1 und MCT4 wider. Aufgrund der Funktion als Ankerprotein der beiden Monocarboxylattransporter war eine verminderte Expression dieses Proteins bei verminderter Transporterdichte zu erwarten. Da vor allem MCT4-Transporter innerhalb des IGROV-1-Kollektivs in signifikant geringerem Maße nachgewiesen wurden, war bei gleichzeitig ähnlicher bis geringerer MCT1-Expression auch eine signifikant geringere Expression von CD147 im Vergleich zum OC316-Kollektiv anzunehmen, welche sich auch in der *in vivo*- und *in vitro*-Fluoreszenzfärbung zeigte.

Die Expressionsanalyse der Monocarboxylattransporter konnte bestätigen, dass durch die signifikant geringere Dichte der MCT4-Transporter innerhalb des IGROV-1-Kollektivs, diese Zelllinie als geeignet für eine *in vivo* AZD3965-Therapie einzuschätzen ist, da von einer AZD3965-Sensitivität dieser Tumoren ausgegangen werden kann. Durch die sehr geringe Expression von MCT4 innerhalb dieser Gruppe fehlt der Tumorzelllinie IGROV-1 bei Inhibition des MCT1 eine geeignete Alternative, das weiterhin glykolytisch produzierte Laktat aus der Zelle zu transportieren, sodass eine intrazelluläre Akkumulation dieses Metaboliten zu erwarten ist.

5.2.2. Auswirkung von AZD3965 auf die Expression der Zielproteine

In der vorliegenden Arbeit soll ein Vergleich zwischen der AZD3965-Wirkung auf hoch- und niedrigglykolytische Ovarialtumoren mit unterschiedlichen Expressionsmustern des Monocarboxylattransporters MCT4 gezogen werden. Aus diesem Grund wurden neben den niedrigglykolytischen IGROV-1-Tumoren, für welche eine AZD3965-Sensitivität vermutet wurde, auch hochglykolytische OC316-Tumoren mit dem MCT1-Hemmstoff behandelt und die Auswirkung dieser Therapie auf die Proteinexpression und den Metabolitstatus der Tumoren untersucht.

Die entsprechenden Ergebnisse der Expressionsanalyse sind in Abbildung 17-19 dargestellt und werden im Folgenden zusammen mit der *in vitro* Expressionsanalyse (s. Abb. 21) diskutiert.

Besonders deutlich und beide Zelllinien betreffend zeigt sich in der gesamten immunhistochemischen Analyse sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine signifikante Reduktion der MCT1-Expression bei AZD3965-Behandlung.

Ein ähnlicher Effekt konnte bereits bei AZD3965-Behandlung von Zellen des Burkitt-Lymphoms beobachtet werden. Bei chronischer Hemmstoffexposition dieser Zellen über sieben Wochen konnte eine Reduktion der MCT1-Expression bei gleichzeitiger Umstellung des Zellmetabolismus auf einen oxidativen Stoffwechsel beobachtet werden. Dieser war gekennzeichnet durch eine höhere Sauerstoffverbrauchsrate und geringere extrazelluläre Azidifizierung (Noble et al., 2017). Es ist jedoch fraglich, ob die Reduktion der MCT1-Expression in Zusammenhang mit dieser Stoffwechselumstellung bei chronischer Exposition mit AZD3965 steht, da MCT1 aufgrund seiner gleichzeitigen Importfunktion von Laktat und Pyruvat ebenso Metabolite für einen oxidativen Stoffwechsel liefern kann.

Auffällig ist, dass der Effekt der MCT1-Reduktion bei chronischer Exposition mit dem Vorgängerwirkstoff AR-C155858 in einem ähnlichen *in vitro*-Modell nicht zu beobachten war (Doherty et al., 2014). Auch konnte bei Untersuchung des Wirkmechanismus dieses Vorgängerhemmstoffs durch immunhistochemische Färbungen festgestellt werden, dass eine Bindung von AR-C155858 an eine intrazelluläre Domäne von MCT1 in der Folge nicht zu einer Internalisierung des Transporters und somit zu einer reduzierten Nachweisbarkeit führte (Ovens et al., 2010).

Anhand der Daten dieser Arbeit stellt sich die Frage, inwieweit sich der Effekt von AZD3965 auf die Expression, Internalisierung und Nachweisbarkeit von MCT1 von der Wirkung des AR-C155858-Hemmstoffs unterscheidet. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Bindung von AZD3965 an MCT1 zu einer Internalisierung und Degradierung des Transporters führt und dieser dementsprechend nicht mehr immunhistochemisch anfärbbar ist.

Abweichend von den Ergebnissen dieser Arbeit kommen Guan und Morris in einem murinen Tiermodell mit implantierten Mammakarzinomzellen zu der Ansicht, dass der Hemmstoff AZD3965 *in vivo* keinen Effekt auf die Expression von MCT1, MCT4 und CD147 hat (Guan und Morris, 2020). Hierbei sei jedoch zu erwähnen, dass für diesen Nachweis das Western Blot-Verfahren gewählt worden war. Die hierfür verwendeten Antikörper sind teilweise auch in dieser Arbeit genutzt worden und zeigten dabei deutliche Probleme in ihrer Spezifität. Hierauf wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

Für das AZD3965-behandelte Kollektiv der IGROV-1-Tumoren ist in beiden immunhistochemischen Färbungen *in vivo* eine signifikante Reduktion in der Expression von MCT4 zu bemerken (s. Abb. 18 und 21). Dieser Trend findet sich auch *in vitro* wieder und kann Anzeichen einer Reaktion auf veränderte metabolische Konditionen sein.

In der Gruppe der OC316-Tumoren ist neben der signifikanten Reduktion in der Transporterdichte von MCT1 keine weitere deutliche Änderung der Expression durch die AZD3965-Therapie zu verzeichnen, welche sich einheitlich in allen immunhistochemischen Färbungen zeigen würde. Vor allem findet sich keine reflektorische Erhöhung der MCT4-Expression aufgrund der MCT1-Inhibition, wie sie bisher allerdings nur unter AZD3965-Behandlung von Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms nachzuweisen war (Bola et al., 2014).

Bei Betrachtung der Auswirkung von AZD3965 auf die Expression von CD147 kann keine einheitliche, mit der unter AZD3965-Therapie veränderten Expressionsdichte von MCT1 und MCT4 konsistente Änderung festgestellt werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass dies nicht zwangsläufig zu erwarten ist, da CD147 u.a. auch für den Transporter MCT3 als Ankerprotein fungiert. Da noch nicht geklärt ist, inwieweit die metabolische Beeinflussung durch eine MCT1-Inhibition auf die Expression anderer Transporter wirkt, wäre auch eine Überexpression anderer MCT-Proteine denkbar und damit auch eine vermehrte Nachweisbarkeit von CD147 möglich.

Insgesamt bleibt zur verwendeten Methode der Immunhistochemie festzuhalten, dass die Wahl der DAB-Färbung als zweites Verfahren zur Charakterisierung der Proteinexpression keine optimale Ergänzung der Fluoreszenzfärbung darstellt. Aufgrund ähnlicher Arbeitsschritte innerhalb der Protokolle weisen beide Verfahren ähnliche Fehlerquellen auf. Zudem basieren die Ergebnisse der DAB-Immunhistochemie auf der subjektiven Einschätzung der auswertenden Personen und sind somit weniger objektiv als die computerbasierte Analyse der F-IHC-Färbung. Dementsprechend sind die Ergebnisse der objektiven F-IHC-Auswertung in dieser Arbeit stärker zu gewichten. In Ermangelung einer Kontrolle der F-IHC-Ergebnisse durch Western Blots und aufgrund der Notwendigkeit eines Verfahrens mit genauer Lokalisierung des Tumorgewebes, stellte eine weitere immunhistochemische Färbung jedoch eine geeignete Methode für eine ergänzende Expressionsanalyse dar.

5.2.3. Diskussion der Western Blot-Methodik

Der ursprüngliche Analyseversuch der tumoralen Proteinexpression über die Methode des Western Blots basierte auf der Annahme, dass durch die verwendeten Antikörper eine spezifische Identifizierung und Quantifizierung der Transporter und ihres Ankerproteins im humanen implantierten Gewebe möglich ist.

Aufgrund stark von der immunhistochemischen Analyse abweichender Werte der Western Blots wurde die Methode in mehreren Schritten überprüft. Einen solchen Schritt bildete die Anwendung der Methode an murinen Geweben und Matrigel vor und nach Implantation im Versuchstier.

Abbildung 22 lässt bereits vermuten, dass mit den verwendeten Antikörpern dieser Methode keine suffiziente Unterscheidung zwischen humanen und murinen Transportern möglich ist, da auch in murinem Gewebe die dort physiologisch exprimierten Proteine nachzuweisen sind. Besonders auffällig ist zudem die Detektion aller drei

Proteine in implantiertem Matrigel, nachdem in einer präimplantativen Analyse keine Banden zu verzeichnen waren.

Die Vermutung einer fehlenden Selektivität der Antikörper für humane Proteine konnte durch Gegenüberstellung und Vergleichsanalyse der Primärstruktur der humanen und murinen Proteine mit Hilfe des Programms BLASTP 2.9.0+ (erläutert bei Altschul et al., 1997) bestätigt werden.

Für die Transporter MCT1 und MCT4 ergab sich eine Übereinstimmung von 86% bzw. 89% zwischen den humanen und murinen Proteinsequenzen. Für das Ankerprotein CD147 waren die ermittelten Primärstrukturen zwischen den beiden Spezies zu 65% identisch.

Aufgrund dieser starken Ähnlichkeit der murinen und humanen Proteine auf Ebene der Primärstruktur sowie der in Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse, kann nicht davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Antikörper in der Western Blot - Methode eine Selektivität gegenüber den humanen Transportern MCT1, MCT4 und dem Ankerprotein CD147 besitzen.

Zwar wurde in der Präparation der Proben darauf geachtet, nur humanes Tumorgewebe zu lysieren, dennoch konnte nicht überprüft werden, ob eine klare Trennung vom murinem Umgebungsgewebe oder verbliebenen Matrigelinseln im Tumor erfolgt war.

Da durch die mikroskopische Betrachtung des Gewebes in den immunhistochemischen Färbungen eine deutlich bessere Unterscheidung zwischen Matrigel-Inseln und Tumorgewebe sowie eine eindeutige Lokalisierung innerhalb des Tumors möglich war, wurde die Methode des Western Blots zu Gunsten einer zweiten immunhistochemischen Färbung mit DAB verlassen.

Durch die in Abbildung 22 exemplarisch dargestellten Membranaufnahmen ergibt sich zudem die Frage, weshalb eine Detektion von CD147 lediglich bei gleichzeitigem Nachweis des Transporters MCT4 im Gewebe des Versuchstier und implantierten Matrigel möglich ist. So scheint es, als fungiere CD147 in den untersuchten murinen Geweben lediglich als Ankerprotein für den Transporter MCT4.

Auch bei Pinheiro et al. wird eine solche Beobachtung bei Untersuchung der Assoziation von CD147 mit der MCT1-Expression unterschiedlicher Tumorentitäten beschrieben und die Vermutung aufgestellt, dass die Expression dieses Transporters noch von weiteren Proteinen abhängen könnte (Pinheiro et al., 2010).

Möglich wäre, dass murine MCT1 statt über Basigin/CD147 beispielsweise über das Protein Embigin/gp170 in der Membran verankert sind.

Des Weiteren bleibt fraglich, weshalb ein Nachweis aller drei untersuchten Proteine im implantierten Matrigel möglich ist. Eine Beeinflussung des Proteingehalts des Matrigels durch das Umgebungsgewebe erscheint ursächlich, jedoch wurde für dieses Gewebe lediglich der Transporter MCT1 nachgewiesen. Es bleibt daher weiter unklar, woher sich bei Implantation von Matrigel ein positiver Nachweis von MCT4 und CD147 ergibt.

Doch auch Guan und Morris machten im Western Blot die Beobachtung, dass nach Implantation MCT4-negativer Mammakarzinomzellen in Mäuse anschließend in ebendiesem Tumorgewebe MCT4 detektiert werden konnte. Diese Auffälligkeit war dabei sowohl für das AZD3965-behandelte als auch das Kontrollkollektiv zu verzeichnen. Der für den Western Blot verwendete MCT4-Antikörper war mit dem in dieser Arbeit identisch, sodass diese Beobachtung ein weiterer Hinweis darauf ist, dass dessen Anwendung im Western Blot nicht für das murine Tiermodell geeignet ist (Guan und Morris, 2020).

5.3. Charakterisierung des Metabolitstatus mittels Biolumineszenz

5.3.1. Unterschiede der Metabolitstatus von OC316 und IGROV-1

Die in der Literatur angegebenen metabolischen Charakterisierungen der beiden untersuchten Zelllinien OC316 und IGROV-1 und der immunhistochemische Nachweis der Differenz in der MCT4-Expressionsdichte ließen Unterschiede in den Metabolitstatus zwischen den beiden untersuchten Kontrollkollektiven und eine Veränderung der Metabolitkonzentrationen unter AZD3965-Therapie erwarten.

Eine deutliche Abgrenzung der als niedrigglykolytisch beschriebenen IGROV-1-Tumoren von den hochglykolytischen OC316-Tumoren kann durch die in Abbildung 24 dargestellten Metabolitkonzentrationen nicht vorgenommen werden.

Es zeigt sich lediglich ein leichter Trend zu einer niedrigeren intratumoralen Glucosekonzentration innerhalb des OC316-Kollektivs, welche konsistent mit einer für diese Zelllinie beschriebenen erhöhten Glucoseverbrauchsrate ist (Favaro et al., 2008).

Im Vergleich zur bisherigen *in vivo*-Charakterisierung der Metabolitstatus dieser Zelllinien durch Fabian et al. fällt die Divergenz der absoluten Konzentrationswerte der untersuchten Metabolite auf (Fabian et al., 2012).

Während die Konzentrationsbestimmungen von ATP und Glucose im Rahmen dieser Arbeit innerhalb beider Tumorgruppen deutlich niedriger ausfielen, zeigte sich verglichen mit den Angaben der bisherigen *in vivo*-Untersuchungen dieser Tumorklinien eine stark erhöhte Laktatkonzentration.

Die niedrigen Werte von Glucose und ATP bei gleichzeitiger Erhöhung des intratumoralen Laktats lassen vermuten, dass die untersuchten Tumoren dieser Arbeit einen höheren glykolytischen Metabolismus mit erhöhter Glucose- und ATP-Verbrauchs- sowie Laktatproduktionsrate zeigten. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, dass die Zelllinie IGROV-1 in der bisherigen Literatur bereits als niedrigglykolytisch metabolisierend analysiert worden ist und dieser Unterschied zur hochglykolytisch charakterisierten Linie OC316 in Abbildung 24 nicht ersichtlich wird.

Insbesondere aufgrund der auffallend hohen Laktatwerte der Biolumineszenzanalyse wurde die Methode ausführlich überprüft. Zu diesem Zweck wurden neue Standardproben bekannter Konzentrationen hergestellt. Die anschließenden Messungen konnten die Metabolitwerte dieser Proben bei gleichen Messbedingungen korrekt wiedergeben, sodass die auffälligen intratumoralen Konzentrationswerte nicht auf einen Fehler im Analyseverfahren zurückzuführen waren.

Mögliche Erklärungen dieser auffälligen Resultate könnten sich somit in der Vorarbeit der Messungen finden. Die Methode der bildgebenden Biolumineszenz ist bereits seit vielen Jahren in der Arbeitsgruppe von etabliert und es bestehen sowohl für die Messung der Proben als auch für deren Präparation genaue Protokolle. Aufgrund der Thermolabilität der zu analysierenden Metabolite als auch der Lichtempfindlichkeit und Temperaturabhängigkeit der Nachweisreaktion ist es besonders wichtig, während der gesamten Vorbereitungsphase einen protokollgetreuen Umgang mit dem Messmaterial zu gewährleisten. Hierzu zählt die konsequente Kühlung der Xenotransplantate bei -80°C , ihr Zuschnitt bei -20°C mit anschließender Hitzefixierung der Proben für die Laktat- und ATP-Bestimmung und die erneute Kühlung der Schnitte bis zum Messzeitpunkt bei -20°C . Trotz genauester Befolgung des Präparationsprotokolls stellt dieser Teil der Methode den fehleranfälligsten Abschnitt dar und muss daher als mögliche Fehlerquelle der Messwerte in Betracht gezogen werden.

Eine weitere Erklärung der abweichenden Metabolitwerte dieser Arbeit, verglichen mit den Ergebnissen von Fabian et al., stellt die Verschiedenheit der untersuchten Tumoren bezüglich ihrer Größe dar. Während in dieser Arbeit Metabolitmessungen

an Tumoren mit einer durchschnittlichen Größe von etwa 190 mm^3 vorgenommen worden sind, waren die Tumoren im Probenkollektiv von Fabian et al. $200\text{-}300 \text{ mm}^3$ groß. Es lässt sich nicht ausschließen, dass die Differenz in der Tumorgöße und womöglich eine damit verbundene verlängerte Wachstumszeit mit einem Unterschied der Metabolitstatus dieser Tumoren einhergeht.

Zudem finden sich in der Dissertationsschrift von C. Fabian, die den Daten des oben genannten Papers (Fabian et al., 2012) zu Grunde liegt, deutliche Differenzen bezüglich des Enzymkits, welches für die Laktatanalyse verwendet wurde (Fabian, 2013). So unterschieden sich die angewandten Inkubations- und Messzeiten der eingesetzten Kits erheblich von den Zeitangaben dieser Arbeit. Besonders auffällig ist eine wesentlich kürzere Messzeit von 15 Sekunden bei Fabian, verglichen mit der in Tabelle 9 angegebenen Zeitspanne von 40 Sekunden.

Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Vermutung, dass diese Differenzen in der Messzeit bzw. der zugrundeliegenden Enzymkinetiken ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse der Laktatbestimmung sein könnten.

Diese Annahme konnte durch nachträgliche Analyse der von Fabian untersuchten und weiterhin gelagerten Tumorproben mit dem Enzymkit dieser Arbeit gestützt werden. Auch bei dieser Nachmessung ergaben sich deutlich höhere Konzentrationswerte für Laktat im Vergleich mit den von Fabian erhobenen Daten.

Um eine Veränderung der Kinetik nach einer bestimmten Lagerungszeit der Kits als Ursache dieser Messwerte auszuschließen, wäre eine vergleichende Analyse der Enzymkinetiken im Rahmen dieser Arbeit notwendig gewesen. In Ermangelung des von Fabian verwendeten Kits war dies jedoch nicht möglich. Dennoch kann für weitere Arbeiten mit der Methode der Biolumineszenz die Empfehlung ausgesprochen werden, vor Beginn der Analyse eine aktuelle Bestimmung der optimalen Inkubations- und Messzeiten durchzuführen.

Aufgrund der hohen Laktatwerte ergab sich zudem die Vermutung, dass diese Kennzeichen hypoxischer intratumoraler Konditionen sind und somit möglicherweise eine Korrelation zwischen der Höhe der Laktatwerte und dem Nekroseanteil eines Tumors bestehen könnte.

Der geringe durchschnittliche Anteil nekrotischer Areale innerhalb des IGROV-1-Kollektivs bei sehr hohen Laktatwerten lässt diese Annahme jedoch unwahrscheinlich erscheinen. Auch die statistische und grafische Auswertung der einzelnen Tumoren konnte keine Korrelation dieser beiden Parameter zeigen (s. Abb. 25).

5.3.2. Auswirkung von AZD3965 auf den Metabolitstatus behandelter

Tumoren

Trotz der von der Literatur abweichenden Metabolitwerte im Vergleich der beiden Tumorzelllinien, konnten im Kollektiv der AZD3965-behandelten Tumoren signifikante Änderungen in den intratumoralen Metabolitkonzentrationen von Laktat und Glucose im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (s. Abb. 26). Eine Reduktion des intratumoralen ATP-Levels, wie sie bei Bola et al. beschrieben wurde, konnte in keiner der beiden Behandlungsgruppen nachgewiesen werden.

Die bereits vielfach in weiteren Arbeiten beschriebene intratumorale Akkumulation von Laktat unter AZD3965-Therapie lässt sich für die Gruppe der IGROV-1-Tumoren in Abbildung 26C deutlich erkennen (Bola et al., 2014; Doherty et al., 2014; Polanski et al., 2014; Belouèche-Babari et al., 2017; Curtis et al., 2017; Noble et al., 2017; Belouèche-Babari et al., 2020).

Die vermutete Sensitivität von IGROV-1-Tumoren gegenüber einer AZD3965-Behandlung scheint somit aufgrund der mangelnden Expression alternativer Laktatexporter wie MCT4 zu einer intrazellulären Ansammlung dieses Metaboliten zu führen. In der Gruppe AZD3965-behandelter OC316-Tumoren ist lediglich ein sehr geringer Anstieg des intratumoralen Laktats zu verzeichnen. Aufgrund der ausgeprägten MCT4-Expression scheint diese Tumorzelllinie eine gewisse Resistenz gegenüber AZD3965 zu besitzen und der Laktatexport durch eine MCT1-Inhibition nur gering beeinflussbar zu sein. Eine ähnliche Beobachtung konnten Belouèche-Babari et al. bei AZD3965-Behandlung von Tumorzellen unterschiedlicher MCT4-Dichte machen. Während Zelllinien mit geringer MCT4-Expression bereits bei sehr niedrigen Hemmstoffdosen einen signifikanten Anstieg ihres intrazellulären Laktats aufwiesen, war dies bei Tumorzellen mit ausgeprägter MCT4-Dichte erst bei der hundertfachen Konzentration des Inhibitors zu verzeichnen (Belouèche-Babari et al., 2017).

Im Zusammenhang mit der Feststellung einer intratumoralen Laktatakkumulation in der Gruppe AZD3965-behandelter IGROV-1-Tumoren ist der ebenfalls signifikante Anstieg der Glucosekonzentration innerhalb dieses Kollektivs zu betrachten.

Zu beachten gilt, dass es sich bei der Detektion dieser erhöhten Biolumineszenzintensität sehr wahrscheinlich nicht ausschließlich um den Nachweis von Glucose handelt.

Da die quantitative Metabolitbestimmung der Biolumineszenz eine Mittelung über den intra- und extrazellulären Raum darstellt, wäre ein deutlicher Anstieg der Glucosekonzentration nur bei gleichzeitigem Anstieg der extrazellulären Glucose bzw. murinen Blutzuckerkonzentration möglich gewesen.

Viel eher wurde mit der Biolumineszenzreaktion des Glucosenachweises auch Glucose-6-Phosphat detektiert. Wie in Abbildung 11 dargestellt, ist dieses ein Zwischenprodukt der zugrundeliegenden Nachweisreaktion. Daher kann nicht zwischen intratumoral vorliegendem und im Reaktionsverlauf entstandenem Glucose-6-Phosphat unterschieden werden.

Ein rein intrazellulärer Anstieg der Glucose-6-Phosphat-Konzentration ist möglich, da dieser Metabolit die Zelle aufgrund der Phosphorylierung nicht mehr passiv verlassen kann und keine Angleichung der intra- und extrazellulären Konzentrationen stattfindet (Berg et al., 2013).

Zudem wird diese Vermutung durch Beobachtungen weiterer Studien unterstützt, wonach die Hemmung von MCT1 durch AZD3965 und weitere Inhibitoren in einer Hemmung der Glykolyse resultiert (Miranda-Goncalves et al., 2013; Doherty et al., 2014; Curtis et al., 2017; Noble et al., 2017). Der Anstieg der intratumoralen Laktatkonzentration führt zu einer Inhibition des glykolytischen Schlüsselenzyms Phosphofruktokinase und somit zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration der Edukte dieses Enzyms und seiner Vorstufen (Costa Leite et al., 2007).

Der Anstieg der intratumoralen Glucose- bzw. Glucose-6-Phosphatkonzentration lässt sich auch für das Kollektiv der AZD3965-behandelten OC316-Tumoren feststellen. Der glykolytische Metabolismus dieser Tumoren scheint ebenfalls durch die Inhibitortherapie verändert worden zu sein, wenn auch der Anstieg mit 57% gegenüber der IGROV-1-Behandlungsgruppe geringer ausfällt (vgl.: 85%) und damit wiederum eine weniger starke Beeinflussung durch den Hemmstoff zu vermuten ist.

Die in der Biolumineszenz ermittelten Veränderungen unter AZD3965-Therapie sind somit vor allem für die Gruppe der IGROV-1 Tumoren konsistent mit den bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Inhibition von MCT1 in anderen Tumorentitäten und den zu erwartenden biochemischen Regulationsprozessen.

5.4. Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die untersuchten Zelllinien OC316 und IGROV-1 *in vivo* im Wachstum, der Nekrosenbildung und ihrem MCT-Proteinexpressionsmuster unterscheiden. Die ermittelten Änderungen im Metabolitstatus behandelter IGROV-1-Tumoren konnten auf die geringe MCT4-Expression dieser Zelllinie zurückgeführt und somit ihre Sensitivität gegenüber AZD3965 bestätigt werden. Aus diesem Grund stellt sich diese Zelllinie als vielversprechend für die weitere Forschung an der Wirkung dieses MCT1-Hemmstoffs dar.

Da für AZD3965-sensitive Zelllinien anderer Tumorentitäten bei längerer Hemmstoffexposition eine relative Inhibitorresistenz gezeigt werden konnte, sind in diesem Zusammenhang weitere Untersuchungen für die Zelllinie IGROV-1 erforderlich (Doherty et al., 2014; Noble et al., 2017). Es muss geklärt werden, inwieweit es durch eine längerfristige AZD3965-Behandlung dieser Zelllinie ebenfalls zu einer Verlagerung des Energiestoffwechsels hin zur oxidativen Phosphorylierung kommt, um dem angestiegenen intrazellulären Laktatgehalt entgegenzuwirken. Im Falle einer solchen erwerbbarer Hemmstoffresistenz wäre die Kombination von AZD3965 mit Inhibitoren der Atmungskette, wie beispielsweise Metformin, sinnvoll.

Einen weiteren Ansatz für zukünftige Untersuchungen stellt die genauere Charakterisierung des Wirkmechanismus von AZD3965 dar, wie sie bereits für den Vorgängerhemmstoff AR-C155858 erfolgt ist. In dieser Arbeit konnte bereits eine Vermutung über die Internalisierung inhibitorgebundener MCT1 getroffen werden. Da bisher lediglich Unterschiede in der Aufnahme von AZD3965 und AR-C155858 über die Membran untersucht und beschrieben worden sind, ist eine Aussage über die Auswirkungen einer Bindung von AZD3965 an MCT1 ohne das Wissen über Bindungsmechanismus und -domäne jedoch nur über weitere Analysen des Inhibitors möglich.

In diesem Zusammenhang wäre auch die Betrachtung des ebenfalls durch AZD3965 gehemmten Transporters MCT2 von Interesse. Auch für dieses Protein sollten die Auswirkungen, die eine Therapie mit dem Inhibitor auf den Transporter hat, genauer untersucht werden.

5. Diskussion

Darüberhinaus ist eine Suche nach weiteren Tumorzelllinien nötig, die sich aufgrund eines geeigneten Proteinexpressionsmusters mit geringer MCT4-Dichte gegenüber einer AZD3965-Therapie sensitiv zeigen könnten.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des MCT1-Hemmstoffs AZD3965 auf Tumoren zweier Ovarialkarzinomzellen mit unterschiedlichem glykolytischem Stoffwechsel untersucht. Als Basis dieser Untersuchung sollte eine Charakterisierung dieser beiden Zelllinien OC316 und IGROV-1 hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens *in vivo*, dem Expressionsmuster der Proteine MCT1, MCT4 und CD147 und ihres Metabolitstatus erfolgen und mit den bisherigen Angaben der Literatur verglichen werden. Ausgehend von dieser Charakterisierung war die Wirkung des MCT1-Hemmstoffs auf die beiden Tumorgruppen zu diskutieren.

Die Methoden zur Bearbeitung dieser Aufgabenstellung umfassten Verfahren der Fluoreszenz- und DAB-Immunhistochemie zur Expressionsanalyse sowie der bildgebenden Biolumineszenz zur arealspezifischen Analyse der Metabolitkonzentrationen von ATP, Glucose und Laktat im Tumorschnitt.

In der Analyse des Wachstumsverhaltens *in vivo* konnte für die Gruppe der OC316-Tumoren eine stärkere Volumenzunahme als mögliches Resultat eines hochmetabolischen Stoffwechsels beobachtet werden. Zugleich zeigte dieses Tumorkollektiv einen signifikant höheren Anteil nekrotischer Areale als mögliches Kennzeichen einer intratumoralen Hypoxiereaktion. Bei vergleichender Betrachtung der beiden Tumorgruppen OC316 und IGROV-1 bezüglich ihres Proteinexpressionsmusters bestätigte sich die in der Literatur beschriebene geringere Expression von MCT4 der Zelllinie IGROV-1 bei ähnlicher MCT1-Dichte in beiden Zelllinien. Dies galt nicht für die Untersuchung der tumoralen Metabolitstatus durch die bildgebende Biolumineszenz. Die Ergebnisse dieser Analyse konnten die literarischen Angaben, die die Zelllinie IGROV-1 als niedrigglykolytisch im Vergleich mit der hochglykolytischen Linie OC316 charakterisieren, nicht bestätigen, da sie kaum Unterschiede in der intratumoralen Laktatkonzentration zeigten.

Auf Basis einer signifikant geringeren MCT4-Expression der IGROV-1-Tumoren und der daraus resultierenden Abhängigkeit des Laktatexports von MCT1 wurde für diese Zelllinie eine Sensitivität gegenüber einer MCT1-Inhibition durch AZD3965 vermutet. Diese Vermutung konnte in den metabolischen Analysen der Hemmstoffwirkung bestätigt werden. Die AZD3965-Therapie führte in dieser Tumorgruppe zu einem signifikanten Anstieg des intratumoralen Laktats und zu einer damit verbundenen

Hemmung weiterer glykolytischer Stoffwechselforgänge. Diese wurde durch die Akkumulation glykolytischer Intermediate in der Biolumineszenz deutlich und ist ebenfalls für weitere Tumorentitäten bei AZD3965-Behandlung *in vitro* und *in vivo* beschrieben worden. In der Gruppe der OC316-Tumoren zeigte sich hingegen nur eine geringe Reaktion auf eine MCT1-Hemmung. Diese war gekennzeichnet durch einen Anstieg glykolytischer Edukte, jedoch in geringerem Ausmaß im Vergleich zum IGROV-1-Kollektiv bei nahezu unveränderter intratumoraler Laktatkonzentration. In der immunhistochemischen Expressionsanalyse dieser Zelllinie konnte eine solche Resistenz gegenüber einer AZD3965-Behandlung aufgrund der deutlich stärkeren Dichte von MCT4 bereits vermutet werden, da dieser Transporter einen alternativen Exportweg für intrazellulär akkumulierendes Laktat darstellt.

Neben den Änderungen im Metabolitstatus der Proben, zeigte sich in beiden untersuchten Tumorkollektiven eine signifikante Reduktion in der Expressionsdichte von MCT1 unter AZD3965-Therapie, sodass eine Internalisierung und Degradierung dieses Transporters nach Inhibitorbindung vermutet wird.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch diese Arbeit zum einen Unterschiede im Proteinprofil und Wachstumsverhalten der beiden untersuchten Zelllinien festgestellt werden konnten. Besonders hervorzuheben ist hierbei der Nachweis der signifikant geringeren MCT4-Expression der Zelllinie IGROV-1. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit AZD3965 sowohl zu einer signifikanten Reduktion der MCT1-Expression als auch zu einer Änderung des Metabolitstatus behandelter Tumoren führt. Auch hier sind die Ergebnisse der Zelllinie IGROV-1 zu betonen. In diesem Tumorkollektiv führte die MCT1-Inhibition zu einem signifikanten Anstieg des intratumoralen Laktats sowie der glykolytischen Edukte.

Ausgehend von der geringen MCT4-Expression und den signifikanten Änderungen in ihrem Metabolitstatus unter AZD3965-Therapie ist die Zelllinie IGROV-1 somit als AZD3965-sensitiv zu charakterisieren. Aus diesem Grund erscheint es wichtig, Folgestudien zur Wirkung dieses Hemmstoffs auf IGROV-1-Tumoren anzuschließen, um Kombinationsansätze mit weiteren Inhibitoren zu erarbeiten sowie andere Tumorzelllinien mit geringer bis fehlender MCT4-Expression zu identifizieren und damit als voraussichtlich AZD3965-sensitiv zu charakterisieren.

7. Literaturverzeichnis

- ALAMA, A., BARBIERI, F., FAVRE, A., CAGNOLI, M., NOVIELLO, E., PEDULLA, F., VIALE, M., FOGLIA, G. und RAGNI, N. (1996). Establishment and characterization of three new cell lines derived from the ascites of human ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol*, 62, 82-8.
- ALLEN, A. E., MARTIN, E. A., GREENWOOD, K., GRANT, C., VINCE, P., LUCAS, R. J. und REDFERN, W. S. (2020). Effects of a monocarboxylate transport 1 inhibitor, AZD3965, on retinal and visual function in the rat. *Br J Pharmacol*, 177, 4734-4749.
- ALTENBERG, B. und GREULICH, K. O. (2004). Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*, 84, 1014-20.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. und LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
- AWMF ONLINE (2020). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren [Online]. abrufbar: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-035OLI_S3_Ovarialkarzinom_2020-04.pdf [zitiert am: 23.03.2021].
- BELOUECHE-BABARI, M., CASALS GALOBART, T., DELGADO-GONI, T., WANTUCH, S., PARKES, H. G., TANDY, D., HARKER, J. A. und LEACH, M. O. (2020). Monocarboxylate transporter 1 blockade with AZD3965 inhibits lipid biosynthesis and increases tumour immune cell infiltration. *Br J Cancer*, 122, 895-903.
- BELOUECHE-BABARI, M., WANTUCH, S., CASALS GALOBART, T., KONIORDOU, M., PARKES, H. G., ARUNAN, V., CHUNG, Y. L., EYKYN, T. R., SMITH, P. D. und LEACH, M. O. (2017). MCT1 Inhibitor AZD3965 Increases Mitochondrial Metabolism, Facilitating Combination Therapy and Noninvasive Magnetic Resonance Spectroscopy. *Cancer Res*, 77, 5913-5924.
- BÉNARD, J., DA SILVA, J., DE BLOIS, M.-C., BOYER, P., DUVILLARD, P., CHIRIC, E. und RIOU, G. (1985). Characterization of a Human Ovarian Adenocarcinoma Line, IGROV1, in Tissue Culture and in Nude Mice. *Cancer Res*, 45, 4970-4979.
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L. und STRYER, L. (2013). Glykolyse und Gluconeogenese. *Stryer Biochemie*. 7. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer. 456-500.
- BOLA, B. M., CHADWICK, A. L., MICHPOULOS, F., BLOUNT, K. G., TELFER, B. A., WILLIAMS, K. J., SMITH, P. D., CRITCHLOW, S. E. und STRATFORD, I. J. (2014). Inhibition of monocarboxylate transporter-1 (MCT1) by AZD3965 enhances radiosensitivity by reducing lactate transport. *Mol Cancer Ther*, 13, 2805-16.

- BOROUGHES, L. K. und DEBERARDINIS, R. J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*, 17, 351-9.
- BRAND, A., SINGER, K., KOEHL, G. E., KOLITZUS, M., SCHOENHAMMER, G., THIEL, A., MATOS, C., BRUSS, C., KLOBUCH, S., PETER, K., KASTENBERGER, M., BOGDAN, C., SCHLEICHER, U., MACKENSEN, A., ULLRICH, E., FICHTNER-FEIGL, S., KESSELRING, R., MACK, M., RITTER, U., SCHMID, M., BLANK, C., DETTMER, K., OEFNER, P. J., HOFFMANN, P., WALENTA, S., GEISSLER, E. K., POUYSSEGUR, J., VILLUNGER, A., STEVEN, A., SELIGER, B., SCHREML, S., HAFERKAMP, S., KOHL, E., KARRER, S., BERNEBURG, M., HERR, W., MUELLER-KLIESER, W., RENNER, K. und KREUTZ, M. (2016). LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab*, 24, 657-671.
- BRIZEL, D. M., SCHROEDER, T., SCHER, R. L., WALENTA, S., CLOUGH, R. W., DEWHIRST, M. W. 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, 349-53.
- BUDERATH, P. und KIMMI, R. (2021). Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie des Ovarialkarzinoms. *gynäkologie + geburtshilfe*, 26, 30-35.
- CHEN, H., WANG, L., BERETOV, J., HAO, J., XIAO, W. und LI, Y. (2010). Co-expression of CD147/EMMPRIN with monocarboxylate transporters and multiple drug resistance proteins is associated with epithelial ovarian cancer progression. *Clin Exp Metastasis*, 27, 557-69.
- COMAN, D., HUANG, Y., RAO, J. U., DE FEYTER, H. M., ROTHMAN, D. L., JUCHEM, C. und HYDER, F. (2016). Imaging the intratumoral-peritumoral extracellular pH gradient of gliomas. *NMR Biomed*, 29, 309-19.
- CORTEZ, A. J., TUDREJ, P., KUJAWA, K. A. und LISOWSKA, K. M. (2018). Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 81, 17-38.
- COSTA LEITE, T., DA SILVA, D., GUIMARAES COELHO, R., ZANCAN, P. und SOLA-PENNA, M. (2007). Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochem J*, 408, 123-30.
- CURTIS, N. J., MOONEY, L., HOPCROFT, L., MICHPOULOS, F., WHALLEY, N., ZHONG, H., MURRAY, C., LOGIE, A., REVILL, M., BYTH, K. F., BENJAMIN, A. D., FIRTH, M. A., GREEN, S., SMITH, P. D. und CRITCHLOW, S. E. (2017). Pre-clinical pharmacology of AZD3965, a selective inhibitor of MCT1: DLBCL, NHL and Burkitt's lymphoma anti-tumor activity. *Oncotarget*, 8, 69219-69236.

- DEBERARDINIS, R. J., LUM, J. J., HATZIVASSILIOU, G. und THOMPSON, C. B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, 7, 11-20.
- DOHERTY, J. R., YANG, C., SCOTT, K. E., CAMERON, M. D., FALLAHI, M., LI, W., HALL, M. A., AMELIO, A. L., MISHRA, J. K., LI, F., TORTOSA, M., GENAU, H. M., ROUNBEHLER, R. J., LU, Y., DANG, C. V., KUMAR, K. G., BUTLER, A. A., BANISTER, T. D., HOOPER, A. T., UNSAL-KACMAZ, K., ROUSH, W. R. und CLEVELAND, J. L. (2014). Blocking lactate export by inhibiting the Myc target MCT1 Disables glycolysis and glutathione synthesis. *Cancer Res*, 74, 908-20.
- DOHR, D., ENGENHART-CABILLIC, R. und GREINER, R. H. (2008). Strahlentherapie des Ovarialkarzinoms. *Der Onkologe*, 14, 1151-1156.
- ELHOMSY, G. C., ERANKI, V., ALBERT, S. G., FESLER, M. J., PARKER, S. M., MICHAEL, A. G. und GRIFFING, G. T. (2012). "Hyper-warburgism," a cause of asymptomatic hypoglycemia with lactic acidosis in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 97, 4311-6.
- ERECINSKA, M., DEAS, J. und SILVER, I. A. (1995). The effect of pH on glycolysis and phosphofruktokinase activity in cultured cells and synaptosomes. *J Neurochem*, 65, 2765-72.
- FABIAN, C. (2013). Untersuchungen zur Wechselbeziehung zwischen Proteom, Energiestoffwechsel, Redoxstatus und Radiosensibilität von Tumorzellen in vitro und in vivo. Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften, Mainz: Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität.
- FABIAN, C., KOETZ, L., FAVARO, E., INDRACCOLO, S., MUELLER-KLIESER, W. und SATTLER, U. G. (2012). Protein profiles in human ovarian cancer cell lines correspond to their metabolic activity and to metabolic profiles of respective tumor xenografts. *FEBS J*, 279, 882-91.
- FAVARO, E., NARDO, G., PERSANO, L., MASIERO, M., MOSERLE, L., ZAMARCHI, R., ROSSI, E., ESPOSITO, G., PLEBANI, M., SATTLER, U., MANN, T., MUELLER-KLIESER, W., CIMINALE, V., AMADORI, A. und INDRACCOLO, S. (2008). Hypoxia inducible factor-1alpha inactivation unveils a link between tumor cell metabolism and hypoxia-induced cell death. *Am J Pathol*, 173, 1186-201.
- FERREIRA, L. M., HEBRANT, A. und DUMONT, J. E. (2012). Metabolic reprogramming of the tumor. *Oncogene*, 31, 3999-4011.
- FISCHBECK, A. J., RUEHLAND, S., ETTINGER, A., PAETZOLD, K., MASOURIS, I., NOESSNER, E. und MENDLER, A. N. (2020). Tumor Lactic Acidosis: Protecting Tumor by Inhibiting Cytotoxic Activity Through Motility Arrest and Bioenergetic Silencing. *Front Oncol*, 10, 589434.

- GATENBY, R. A. und GILLIES, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, 4, 891-9.
- GOETZE, K., WALENTA, S., KSIĄZKIEWICZ, M., KUNZ-SCHUGHART, L. A. und MUELLER-KLIESER, W. (2011). Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int J Oncol*, 39, 453-63.
- GUAN, X. und MORRIS, M. E. (2020). In Vitro and In Vivo Efficacy of AZD3965 and Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid in the Murine 4T1 Breast Tumor Model. *AAPS J*, 22, 84.
- GUAN, X., RODRIGUEZ-CRUZ, V. und MORRIS, M. E. (2019). Cellular Uptake of MCT1 Inhibitors AR-C155858 and AZD3965 and Their Effects on MCT-Mediated Transport of L-Lactate in Murine 4T1 Breast Tumor Cancer Cells. *AAPS J*, 21, 13.
- GUILE, S. D., BANTICK, J. R., CHESHIRE, D. R., COOPER, M. E., DAVIS, A. M., DONALD, D. K., EVANS, R., EYSSADE, C., FERGUSON, D. D., HILL, S., HUTCHINSON, R., INGALL, A. H., KINGSTON, L. P., MARTIN, I., MARTIN, B. P., MOHAMMED, R. T., MURRAY, C., PERRY, M. W., REYNOLDS, R. H., THORNE, P. V., WILKINSON, D. J. und WITHNALL, J. (2006). Potent blockers of the monocarboxylate transporter MCT1: novel immunomodulatory compounds. *Bioorg Med Chem Lett*, 16, 2260-5.
- HALESTRAP, A. P. (2012). The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life*, 64, 1-9.
- HALESTRAP, A. P. (2013). The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med*, 34, 337-49.
- HALESTRAP, A. P. und DENTON, R. M. (1975). The specificity and metabolic implications of the inhibition of pyruvate transport in isolated mitochondria and intact tissue preparations by alpha-Cyano-4-hydroxycinnamate and related compounds. *Biochem J*, 148, 97-106.
- HALESTRAP, A. P. und WILSON, M. C. (2012). The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life*, 64, 109-19.
- HALFORD, S. E. R., JONES, P., WEDGE, S., HIRSCHBERG, S., KATUGAMPOLA, S., VEAL, G., PAYNE, G., BACON, C., POTTER, S., GRIFFIN, M., CHENARD-POIRIER, M., PETRIDES, G., HOLDER, G., KEUN, H. C., BANERJI, U. und PLUMMER, E. R. (2017). A first-in-human first-in-class (FIC) trial of the monocarboxylate transporter 1 (MCT1) inhibitor AZD3965 in patients with advanced solid tumours. *Journal of Clinical Oncology*, 35, 2516-2516.
- HANAHAN, D. und WEINBERG, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.

- HARDEE, M. E., DEWHIRST, M. W., AGARWAL, N. und SORG, B. S. (2009). Novel imaging provides new insights into mechanisms of oxygen transport in tumors. *Curr Mol Med*, 9, 435-41.
- HIRSCHHAEUSER, F., SATTLER, U. G. und MUELLER-KLIESER, W. (2011). Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res*, 71, 6921-5.
- HOCHHAUS, A., LARSON, R. A., GUILHOT, F., RADICH, J. P., BRANFORD, S., HUGHES, T. P., BACCARANI, M., DEININGER, M. W., CERVANTES, F., FUJIHARA, S., ORTMANN, C. E., MENSSEN, H. D., KANTARJIAN, H., O'BRIEN, S. G., DRUKER, B. J. und INVESTIGATORS, I. (2017). Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*, 376, 917-927.
- JENSEN, R. L. (2009). Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogession, and as a therapeutic target. *J Neurooncol*, 92, 317-35.
- JONES, R. S. und MORRIS, M. E. (2016). Monocarboxylate Transporters: Therapeutic Targets and Prognostic Factors in Disease. *Clin Pharmacol Ther*, 100, 454-463.
- KANZOW, M., VAN MACKELBERGH, M., MAASS, N. und BAUERSCHLAG, D. (2018). Diagnostik und Therapie des Ovarialkarzinoms. *Der Onkologe*, 24, 343-356.
- KIM, J. W., GAO, P. und DANG, C. V. (2007). Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer Metastasis Rev*, 26, 291-8.
- KRUMM, G. (2020). Ein neues Verfahren zur Funktionsbestimmung von Monocarboxylattransportern (MCTs) in Tumorzellen mit Hilfe der Positronenemissionstomographie (PET). Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften, Mainz: Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität.
- LANG, G. (2013). Histotechnik. Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. 2. Aufl. Wien: Springer. 197-204.
- LE FLOCH, R., CHICHE, J., MARCHIQ, I., NAIKEN, T., ILC, K., MURRAY, C. M., CRITCHLOW, S. E., ROUX, D., SIMON, M. P. und POUYSSEGUR, J. (2011). CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 16663-8.
- LEVINE, A. J. und PUZIO-KUTER, A. M. (2010). The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*, 330, 1340-4.
- LU, H., FORBES, R. A. und VERMA, A. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J Biol Chem*, 277, 23111-5.

- MARTINEZ-ZAGUILAN, R., LYNCH, R. M., MARTINEZ, G. M. und GILLIES, R. J. (1993). Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol*, 265, C1015-29.
- MCNEILLIS, R., GREYSTOKE, A., WALTON, J., BACON, C., KEUN, H., SISKOS, A., PETRIDES, G., LEECH, N., JENKINSON, F., BOWRON, A., HALFORD, S. und PLUMMER, R. (2020). A case of malignant hyperlactaemic acidosis appearing upon treatment with the mono-carboxylase transporter 1 inhibitor AZD3965. *Br J Cancer*, 122, 1141-1145.
- MIRANDA-GONCALVES, V., GRANJA, S., MARTINHO, O., HONAVAR, M., POJO, M., COSTA, B. M., PIRES, M. M., PINHEIRO, C., CORDEIRO, M., BEBIANO, G., COSTA, P., REIS, R. M. und BALTAZAR, F. (2016). Hypoxia-mediated upregulation of MCT1 expression supports the glycolytic phenotype of glioblastomas. *Oncotarget*, 7, 46335-46353.
- MIRANDA-GONCALVES, V., HONAVAR, M., PINHEIRO, C., MARTINHO, O., PIRES, M. M., PINHEIRO, C., CORDEIRO, M., BEBIANO, G., COSTA, P., PALMEIRIM, I., REIS, R. M. und BALTAZAR, F. (2013). Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets. *Neuro Oncol*, 15, 172-88.
- MORENO-SANCHEZ, R., RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S., MARIN-HERNANDEZ, A. und SAAVEDRA, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*, 274, 1393-418.
- MUELLER-KLIESER, W. und WALENTA, S. (1993). Geographical mapping of metabolites in biological tissue with quantitative bioluminescence and single photon imaging. *The Histochemical Journal*, 25, 407-420.
- NANCOLAS, B., SESSIONS, R. B. und HALESTRAP, A. P. (2015). Identification of key binding site residues of MCT1 for AR-C155858 reveals the molecular basis of its isoform selectivity. *Biochem J*, 467, 192.
- NOBLE, R. A., BELL, N., BLAIR, H., SIKKA, A., THOMAS, H., PHILLIPS, N., NAKJANG, S., MIWA, S., CROSSLAND, R., RAND, V., TELEVANTOU, D., LONG, A., KEUN, H. C., BACON, C. M., BOMKEN, S., CRITCHLOW, S. E. und WEDGE, S. R. (2017). Inhibition of monocarboxylate transporter 1 by AZD3965 as a novel therapeutic approach for diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Haematologica*, 102, 1247-1257.
- OVENS, M. J., DAVIES, A. J., WILSON, M. C., MURRAY, C. M. und HALESTRAP, A. P. (2010). AR-C155858 is a potent inhibitor of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT2 that binds to an intracellular site involving transmembrane helices 7-10. *Biochem J*, 425, 523-30.

- PARK, S. J., SMITH, C. P., WILBUR, R. R., CAIN, C. P., KALLU, S. R., VALASAPALLI, S., SAHOO, A., GUDA, M. R., TSUNG, A. J. und VELPULA, K. K. (2018). An overview of MCT1 and MCT4 in GBM: small molecule transporters with large implications. *Am J Cancer Res*, 8, 1967-1976.
- PARKS, S. K., MUELLER-KLIESER, W. und POUYSSÉGUR, J. (2020). Lactate and Acidity in the Cancer Microenvironment. *Annual Review of Cancer Biology*, 4, 141-158.
- PAVLOVA, N. N. und THOMPSON, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*, 23, 27-47.
- PEREZ-ESCUREDO, J., VAN HEE, V. F., SBOARINA, M., FALCES, J., PAYEN, V. L., PELLERIN, L. und SONVEAUX, P. (2016). Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 2481-97.
- PILLAI, S. R., DAMAGHI, M., MARUNAKA, Y., SPUGNINI, E. P., FAIS, S. und GILLIES, R. J. (2019). Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis. *Cancer Metastasis Rev*, 38, 205-222.
- PINHEIRO, C., LONGATTO-FILHO, A., AZEVEDO-SILVA, J., CASAL, M., SCHMITT, F. C. und BALTAZAR, F. (2012). Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr*, 44, 127-39.
- PINHEIRO, C., REIS, R. M., RICARDO, S., LONGATTO-FILHO, A., SCHMITT, F. und BALTAZAR, F. (2010). Expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in human tumours and their association with CD147 and CD44. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 427694.
- POLANSKI, R., HODGKINSON, C. L., FUSI, A., NONAKA, D., PRIEST, L., KELLY, P., TRAPANI, F., BISHOP, P. W., WHITE, A., CRITCHLOW, S. E., SMITH, P. D., BLACKHALL, F., DIVE, C. und MORROW, C. J. (2014). Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 20, 926-937.
- ROBERT KOCH INSTITUT (2019). Krebs in Deutschland für 2015/2016 [Online]. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. abrufbar: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile [zitiert am: 04.04.2021].
- SALHANY, J. M. und SCHOPFER, L. M. (2001). Kinetic mechanism of DIDS binding to band 3 (AE1) in human erythrocyte membranes. *Blood Cells Mol Dis*, 27, 844-9.

- SATTLER, U. G., MEYER, S. S., QUENNET, V., HOERNER, C., KNOERZER, H., FABIAN, C., YAROMINA, A., ZIPS, D., WALENTA, S., BAUMANN, M. und MUELLER-KLIESER, W. (2010). Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. *Radiother Oncol*, 94, 102-9.
- SATTLER, U. G., WALENTA, S. und MUELLER-KLIESER, W. (2007a). A bioluminescence technique for quantitative and structure-associated imaging of pyruvate. *Lab Invest*, 87, 84-92.
- SATTLER, U. G., WALENTA, S. und MUELLER-KLIESER, W. (2007b). Laktat und Redoxstatus in malignen Tumoren. *Der Anaesthetist*, 56, 466-9.
- SCHWARZ, J., MAHNER, S. und JÄNICKE, F. (2013). Adnexe. In: KAUFMANN, M., COSTA, S. D. und SCHARL, A. (eds.) *Die Gynäkologie*. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer, 529-564.
- SEHOULI, J. und HÖFFKEN, K. (2019). Ovarialkarzinom. *Der Onkologe*, 25, 88-89.
- SEMENZA, G. L. (2017). Hypoxia-inducible factors: coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *Embo j*, 36, 252-259.
- SONVEAUX, P., COPETTI, T., DE SAEDELEER, C. J., VEGRAN, F., VERRAX, J., KENNEDY, K. M., MOON, E. J., DHUP, S., DANHIER, P., FRERART, F., GALLEZ, B., RIBEIRO, A., MICHIELS, C., DEWHIRST, M. W. und FERON, O. (2012). Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One*, 7, e33418.
- SONVEAUX, P., VEGRAN, F., SCHROEDER, T., WERGIN, M. C., VERRAX, J., RABBANI, Z. N., DE SAEDELEER, C. J., KENNEDY, K. M., DIEPART, C., JORDAN, B. F., KELLEY, M. J., GALLEZ, B., WAHL, M. L., FERON, O. und DEWHIRST, M. W. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest*, 118, 3930-42.
- SPINA, R., VOSS, D. M., YANG, X., SOHN, J. W., VINKLER, R., SCHRANER, J., SLOAN, A., WELFORD, S. M., AVRIL, N., AMES, H. M., WOODWORTH, G. F. und BAR, E. E. (2020). MCT4 regulates de novo pyrimidine biosynthesis in GBM in a lactate-independent manner. *Neurooncol Adv*, 2, vdz062.
- STATISTISCHES BUNDESAMT (2019). Todesursachenstatistik Deutschland 2019 [Online]. abrufbar: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=abruf-tabelleBearbeiten&levelindex=1&levelid=1614878162907&auswahloperation=abruf-tabelleAuspraegungAuswaehlen&auswahlverzeichnis=ordnungsstruktur&auswahlziel=werteabruf&code=23211-0001&auswahltext=&werteabruf=Werteabruf#abre-adcrumb> [zitiert am: 04.03.2021].

- STEINBACH, J. P., WOLBURG, H., KLUMPP, A., PROBST, H. und WELLER, M. (2003). Hypoxia-induced cell death in human malignant glioma cells: energy deprivation promotes decoupling of mitochondrial cytochrome c release from caspase processing and necrotic cell death. *Cell Death Differ*, 10, 823-32.
- STERN, R., SHUSTER, S., NEUDECKER, B. A. und FORMBY, B. (2002). Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res*, 276, 24-31.
- ULLAH, M. S., DAVIES, A. J. und HALESTRAP, A. P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 281, 9030-7.
- VANDER HEIDEN, M. G. und DEBERARDINIS, R. J. (2017). Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, 168, 657-669.
- VLACHOSTERGIOS, P. J., OIKONOMOU, K. G., GIBILARO, E. und APERGIS, G. (2015). Elevated lactic acid is a negative prognostic factor in metastatic lung cancer. *Cancer Biomark*, 15, 725-34.
- WALENTA, S., CHAU, T. V., SCHROEDER, T., LEHR, H. A., KUNZ-SCHUGHART, L. A., 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, 321-6.
- WALENTA, S., SCHROEDER, T. und MUELLER-KLIESER, W. (2002). Metabolic mapping with bioluminescence: basic and clinical relevance. *Biomol Eng*, 18, 249-62.
- 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, 2195-204.
- WALENTA, S., VOELXEN, N. F. und MUELLER-KLIESER, W. (2016). Lactate-An Integrative Mirror of Cancer Metabolism. *Recent Results Cancer Res*, 207, 23-37.
- WALENTA, S., VOELXEN, N. F., SATTLER, U. G. A. und MUELLER-KLIESER, W. (2014). Localizing and Quantifying Metabolites In Situ with Luminometry: Induced Metabolic Bioluminescence Imaging (imBI). In: HIRRLINGER, J. und WAAGEPE-TERSEN, H. S. (eds.) *Brain Energy Metabolism*. New York, NY: Springer New York.
- WALENTA, S., WETTERLING, M., LEHRKE, M., SCHWICKERT, G., SUNDFOR, K., ROFSTAD, E. K. 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, 916-21.

7. Literaturverzeichnis

WARBURG, O. (1924). Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Die Naturwissenschaften*, 12, 1131-1137.

WARBURG, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309-14.

WARBURG, O. und MINAMI, S. (1923). Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. *Klinische Wochenschrift*, 2, 776-777.

WILSON, M. C., MEREDITH, D., FOX, J. E., MANOHARAN, C., DAVIES, A. J. und HALESTRAP, A. P. (2005). Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70). *J Biol Chem*, 280, 27213-21.

XIE, H. und SIMON, M. C. (2017). Oxygen availability and metabolic reprogramming in cancer. *J Biol Chem*, 292, 16825-16832.

8. Anhang

8.1. Protokolle im Rahmen des Western Blot-Verfahrens

8.1.1. Proteinextraktion aus Gewebe

- Kryoschnitte mit 200 µl Lysepuffer (RIPA-Puffer inkl. 10 µl Phosphatasehemmer und 5 µl Proteasehemmer - vor Beginn der Methode frisch angesetzt) versetzen
- 30 min Inkubation auf Eis
- 5 x 4 s auf Eis sonifizieren. Dazwischen je 10 s auf Eis abkühlen lassen (Schaumbildung vermeiden)
- 30 min Inkubation auf Eis
- 20 min bei 16 000 G, 4°C abzentrifugieren
- Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettieren
- Lagerung bei -80°C bis zur weiteren Verwendung

8.1.2. Proteinbestimmung mittels BCA

- Auftauen der Zelllysateproben auf Eis
- Ansetzen der BSA-Standardreihe (2000 µg/ml, 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml in RIPA-Puffer)
- Zelllysate 1:10 in RIPA-Puffer verdünnen
(Doppelbestimmung: 6 µl Probe : 54 µl Puffer)
- Als Leerwert RIPA-Puffer verwenden
- 96 Well-Platte beschriften und jeweils 25 µl Tumorprobe, Standardprobe bzw. Leerwert zusetzen (Doppelbestimmung)
- jeweils 200 µl BCA-Reagenz pro Probe/Standard zugeben (Mischungsverhältnis Reagenz A:B = 50:1 - kurz vor Verwendung ansetzen)
- Platte leicht schütteln
- 30 min Inkubation bei 37 °C
- Photometrische Messung bei 562 nm im Microplate-Reader (Platte kurz vorher leicht schütteln)
- Auswertung der Messwerte in Excel
- Berechnung der Proteinkonzentration der Zelllysate anhand der Gleichung der Standardgeraden

8.1.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- Vorbereitung der Gelkammer:
 - Komponenten mit Alkohol (70%) reinigen und zusammensetzen
 - 10% Trenngel und 5% Sammelgel ansetzen, die Kammer befüllen und auspolymerisieren lassen
- Vorbereitung der Proben :
 - 20 µg Protein + SDS-Ladepuffer (Verhältnis 1:5) in einem Reaktionsgefäß mischen und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl auffüllen
 - auf 95°C für 5 min im Thermocycler erhitzen (Proteindenaturierung)
- Gelkammer mit SDS-Laufpuffer befüllen
- Proben (25 µl) und Proteinmarker (3 µl MagicMark™, 5 µl PageRuler™) in die Gel-taschen pipettieren
- Elektrophoresebedingungen: 80 V für 40 min, anschließend 120 V für 90 min

8.1.4. Semi-Dry-Blot

- Gel mit Aqua dest. abspülen
- Membran auf Größe des Gels zurechtschneiden und wenige Sekunden in 100% Ethanol equilibrieren
- Jeweils 4 Filterpapiere für Anode bzw. Kathode zurechtschneiden und in Anoden-/Kathodenpuffer tränken
- Auf der Anodenplatte des Semi-Dry-Blotters einen Stapel aus (von unten beginnend) Anodenfilterpapieren, Membran, Gel und Kathodenfilterpapieren bilden; dabei Luftblasen vermeiden bzw. entfernen
- Blotbedingungen: 20 V für 90 min
- Membran beschriften und bei 4°C in 1x TBS bis zur Immundetektion aufbewahren (max. 2 Wochen)

8.1.5. Blockierung und Antikörperinkubation

Alle Schritte auf dem Horizontalschwenker:

- Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit 3% BSA in 1x TBS für 60 min bei Raumtemperatur
- Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (in 3% BSA in 1 x TBS) über Nacht bei 4°C
- Waschschritte: 2 x 5 min in TBST, anschließend 1 x 10 min in TBS

- Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper (in 5% Milchpulver in 1 x TBS) für 60 min bei Raumtemperatur
- Waschschritte: 2 x 5 min in TBST, anschließend 1 x 10 min in TBS

Anh. Tabelle 1: Primär- und Sekundärantikörper des Western Blot-Verfahrens

	Primärantikörper			Sekundärantikörper		
	Ausrichtung	Verdünnung in 3% BSA (in 1 x TBS)	Firma	Ausrichtung	Verdünnung in 5 % MiPu (in 1 x TBS)	Firma
MCT1	<i>rabbit anti human</i>	1 : 500	Santa Cruz	<i>donkey anti rabbit</i>	1 : 5000	Dianova
MCT4		1 : 500				
CD147		1 : 200	Cell Signaling			

8.1.6. Immundetektion

- Positionierung der Membran in der lichtundurchlässigen Box des Detektors
- Zugabe von 1400 µl des Detektionsreagenz (Peroxid- und Luminollösung im Verhältnis 1:1) und direkter Start der Messung
- Auswertung des Messsignals über die Softwares BIO-1D und ImageJ

8.1.7. Strippen der Western Blot-Membranen

Alle Waschschritte bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschwenker:

- 2 x 10 min in Strippingpuffer
- 2 x 10 min in 1 x PBS
- 2 x 5 min in 1 x TBST

8.2. Chemikalien

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Ammoniaklösung (25%)	Merck KGaA	Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
ATP	Roche AG	Basel, Schweiz
AZD3965	Adooq Bioscience LLC	Irvine, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
BSA	AppliChem GmbH	Darmstadt
Decanal	Merck KGaA	Darmstadt
DTT	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
EDTA	AppliChem GmbH	Darmstadt
Eosin G	Merck KGaA	Darmstadt
Esenserum	Dianova	Hamburg
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
FMN	AppliChem GmbH	Darmstadt
G-6-P-DH EC-Nr.: 1.1.1.49	Roche AG	Basel, Schweiz
G-6-P	Roche AG	Basel, Schweiz
Glutamat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
GPT	Roche AG	Basel, Schweiz
H ₂ O ₂	AppliChem GmbH	Darmstadt
Hämalaun nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Hämatoxylin nach Gill II	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
HCl (1 M)	Merck KGaA	Darmstadt
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Hexokinase EC-Nr.: 2.7.1.1	Roche AG	Basel, Schweiz
Hydroxypropylmethylcellulose	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe

Produkt	Hersteller	Firmensitz
KH ₂ PO ₄	AppliChem GmbH	Darmstadt
Klarlack	Dirk Rossmann GmbH	Burgwedel
LDH	Roche AG	Basel, Schweiz
EC-Nr.: 1.1.1.27		
Luziferase	Roche AG	Basel, Schweiz
EC-Nr.: 1.14.14.3		
Matrigel	Corning Inc.	Corning, USA
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
MgCl ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Magermilchpulver	AppliChem GmbH	Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
NAD ⁺	Roche AG	Basel, Schweiz
NADP ⁺	Roche AG	Basel, Schweiz
Natriumarsenat	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
NFO	Roche AG	Basel, Schweiz
EC-Nr.: 1.6.8.1		
PBS	AppliChem GmbH	Darmstadt
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Photinus pyralis Abdomen	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Roti®-Histokitt II	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Tergitol NP-40	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tissue-Tek®	Sakura Finetek	Alphen, Niederlande
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Triton X 100	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tween20	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Tween80	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe

8.3. Geräte und Materialien

Produkt	Hersteller	Firmensitz
96-Well Platten	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
Analysewaage XA204 Excellence	Mettler Toledo	Columbus, USA
Deckgläser	Menzel-Gläser	Braunschweig
Einmal-Pipetten	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Eismaschine AF 20	ScotsmanIce Systems	Vernon Hills, USA
EM-CCD Kamera iXonEM+ DU-888	Andor Technology	Belfast, USA
Falcons 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Filterpapiere	Whatman GmbH	Dassel
Fluoreszenzmikroskop BZ 8000-K	Keyence Deutschland GmbH	Neu-Isenburg
Gefrierschrank -20°C	Siemens AG	München
Gefrierschrank -20°C	Bauknecht Hausgeräte GmbH (Privileg)	Stuttgart
Gefrierschrank -80°C HERA freeze	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Gefrierschrank Liebherr Comfort	Liebherr	Bulle, Schweiz
Glasgefäße	Schott AG	Mainz
Heizplatte IKA C-MAG HP7	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen
Heizplatte H22 electronic	C. Gerhardt GmbH & Co. KG	Königswinter
Microplate Reader Infinite® M1000 PRO	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Inkubator Heracell 240	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Kamera Nikon D100	Nikon	Tokio, Japan

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Kryotom	SLEE medical	Mainz
Kühlschrank	Bauknecht Hausgeräte GmbH (Privileg)	Stuttgart
Kühlschrank	Siemens AG	München
Laborhandschuhe	VWR International GmbH	Darmstadt
Lichtmikroskop Axiophot	Carl Zeiss AG	Oberkochen
Magnetrührer IKAMAG®RH	IKA®-Werke	Staufen
Mehrfachdispenser HandyStep®	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim a.M.
Mikroskop Olympus IM	Olympus	Tokio, Japan
Mikrozentrifuge Galaxy Ministar	VWR International GmbH	Darmstadt
Minizentrifuge Minispin	Eppendorf AG	Hamburg
Mixer Vibrax-VXR	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen
Objektträger	Menzel-Gläser	Braunschweig
Horizontalschwenker Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach
Petrischalen	Greiner Bio-One International GmbH	Frickenhausen
pH-Meter	Schott Geräte GmbH	Hofheim a. Ts.
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One International GmbH	Frickenhausen
Pipettus	Eppendorf AG	Hamburg
Pipetus®	Hirschmann GmbH	Eberstadt
PVDF Membran Immobilon™-P	Merck Millipore	Billerica, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg

Produkt	Hersteller	Firmensitz
SDS-Gelelektrophoresesystem	BioRad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Semi-Dry-Blotter TE77	GE Healthcare	Chicago, USA
Spritzen und Kanülen	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc.	New York, USA
Waage L 2200 S	Sartorius AG	Göttingen
Zentrifuge Biofuge 15	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA

8.4. Puffer und Lösungen

TBS-Puffer

150 mM NaCl
 10 mM TRIS/HCl (pH 7,4)
 in Reinst-H₂O

TBS-T-Puffer

0,01% Tween20
 in 1x TBS

RIPA-Lysepuffer

50 mM TRIS-HCl (pH 7,4)
 0,25 % SDS
 150 mM NaCl
 1 mM EDTA
 1 % Tergitol NP-40
 in Reinst-H₂O

Vor Verwendung dazugeben:

Phosphatase Inhibitor 10 µl /1 ml Lysepuffer

Protease Inhibitor 5 µl /1 ml Lysepuffer

Trenngel (10%) nach Maniatis

für 1 Gel:

1,9 ml	Aqua dest.
1,7 ml	Rotiphorese® Gel 30
1,3 ml	TRIS/HCl (1,5 M, pH 8,8)
50 µl	10% SDS (in Aqua dest.)
50 µl	10% Ammoniumpersulfat (in Aqua dest.)
2 µl	TEMED

Sammelgel (5%) nach Maniatis

für 1 Gel:

1,4 ml	Aqua dest.
330 µl	Rotiphorese® Gel 30
250 µl	TRIS/HCl (1 M, pH 6,8)
20 µl	10 % SDS (in Aqua dest.)
20 µl	10% Ammoniumpersulfat (in Aqua dest.)
2 µl	TEMED

SDS-Ladepuffer (6-fach)

50%	Glycerin
0,6 M	TRIS/HCl (pH 6,8)
10,28%	SDS
0,35 M	DTT
0,012 %	Bromphenolblaulösung

in Reinst-H₂O

SDS-Laufpuffer

25 mM	TRIS/HCl (pH 8,3)
192 mM	Glycin
0,1 %	SDS

in Reinst-H₂O

Anodenpuffer

20 % Ethanol
300 mM TRIS/HCl (pH, 10,4)
in Reinst-H₂O

Kathodenpuffer

20% Ethanol
40 mM Glycin
25 mM TRIS/HCl (pH 8,0)
in Reinst-H₂O

Strippingpuffer *nach Abcam*

200 mM Glycin
3,5 mM SDS
1 % Tween20
pH 2,2
in Reinst-H₂O

8.5. Kits und Marker

8.5.1. Zusammensetzung der Biolumineszenz-Enzymkits

Enzymkit der ATP-Biolumineszenzmessung

5 g *Photinus pyralis* Abdomen
in 100 ml einer wässrigen Lösung aus:
0,2 M HEPES
0,1 M Natriumarsenat
pH 7,6

nach Zentrifugation: 200 µl MgCl₂ (1 M) zugeben

Enzymkit der Glucose-Biolumineszenzmessung

0,4 mM	DTT
5,56 mM	MgCl ₂
0,07 mM	ATP
0,02 mM	NADP
0,22 mM	FMN
31,67 U/ml	Hexokinase
21,11 U/ml	G-6-PDH
2,84 U/ml	NFO
8,57 U/ml	Luziferase
5,69 µM	Decanal in Methanol
in 0,3 M	Phosphatpuffer (KH ₂ PO ₄ : Na ₂ HPO ₄)

Enzymkit der Laktat-Biolumineszenzmessung

0,4 mM	DTT
35 mM	Glutamat
20 mM	NAD
0,25 mM	FMN
200 U/ml	LDH
50 U/ml	GPT
3,6 U/ml	NFO
13,5 mU/ml	Luziferase
6 µM	Decanal in Methanol
in 0,1 M	Phosphatpuffer (KH ₂ PO ₄ : Na ₂ HPO ₄)

8.5.2. Kommerzielle Kits und Marker

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Clarity Western ECL Substrat	BioRad Laboratories Inc.	Hercules, USA
DAB+ Substratlösung	Dako GmbH	Jena
Immunoselect Antifading Mounting Medium DAPI	Dianova	Hamburg
MagicMark™ Protein Standard	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
PageRuler™ Protein Standard	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA
PapPen	Dako GmbH	Jena
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, USA

8.6. Software und Plugins

Software	Version	Entwickler	Firmensitz
Adobe Photoshop	CS5	Adobe Inc.	St. José, USA
AndorIQ	1.8	Andor Technology	Belfast, Großbritannien
BIO-1D	k.A.	Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell
BLASTP	2.9.0+	National Library of Medicine	Bethesda, USA
BZ Observation Application	k.A.	Keyence Deutschland GmbH	Neu-Isenburg
EndNote	X9	Clarivate Analytics	Jersey, Großbritannien
ImageJ	1.52e	National Institute of Health	Bethesda, USA
iWork	2013	Apple	Cupertino, USA
Microsoft Excel	16.27	Microsoft	Redmond, USA
Origin	7.5	OriginLab Corporation	Northampton, USA

Plugin	Programm	Entwickler
Batch make binary	ImageJ	k.A.
Batch Measure RGB	ImageJ	ImageJ
Batch values 0 and 255	ImageJ	U. Sattler, M. Gutjahr
Histogram	ImageJ	ImageJ
Tumor Statistics	ImageJ	J. Osthof, E. Schömer

9. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei _____ für die Überlassung dieses interessanten Projekts und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich _____ für die engagierte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit aussprechen. Die ständige Bereitschaft, Problematiken zu diskutieren, bei ihrer Lösung zu helfen sowie Anregungen für die weitere Arbeit zu geben, waren für mich in meiner gesamten Studienzzeit eine große Hilfe.

Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Betreuerin _____ bedanken, die mich in die Methodik eingearbeitet hat und mir während meiner Zeit im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem gilt mein Dank allen weiteren Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe, welche zum sehr guten Arbeitsklima beigetragen und mich bei meiner Laborarbeit vielfältig unterstützt haben.

Dem Cusanuswerk danke ich für die ideelle und finanzielle Unterstützung meines Studiums und die unkomplizierte Verlängerung meiner Förderzeit aufgrund dieser aufwändigeren medizinischen Doktorarbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Ingrid und Julia, die sich so ausführlich mit meiner Arbeit beschäftigt haben.

In ganz besonderer Weise möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Sie haben einen erheblichen Beitrag dazu geleistet, dass ich mein Studium auf meine Weise gestalten und mir dabei immer eines grenzenlosen Rückhalts sicher sein konnte.

Abschließend geht mein großer Dank an Marc, der mich in jeder nur möglichen Weise unterstützt.

10. Tabellarischer Lebenslauf

