

**In-vitro-Effekte von
Dichloracetat
in hypoxischen Tumorzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Gerhard, Elisa Janina Waltraud**

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber
2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Weigert

Inhaltsverzeichnis

1. <u>Abkürzungsverzeichnis</u>	1
2. <u>Einleitung</u>	5
3. <u>Material und Methoden</u>	9
3.1 Verwendete Zellen	9
3.2 Zellkulturen	9
3.3 Zellzahlbestimmung	10
3.4 Glukose- und Laktatmessung	10
3.5 Koloniebildungstest- Bestimmung der Überlebensrate	11
3.5.1 Färbung	11
3.6 Durchflusszytometrie	12
3.6.1 Hintergründe	12
3.6.2 Durchflusszytometrische Messung der DNS-Fragmentation/ Nicoletti-Färbung	12
3.6.2.1 Hintergründe: Apoptosebestimmung	12
3.6.2.2 Hintergründe: Zellzyklusbestimmung	13
3.6.2.3 Versuchsablauf	14
3.6.3 Durchflusszytometrische Messung des mitochondrialen Membranpotentials/ TMRE-Färbung	15
3.6.3.1 Hintergründe	15
3.6.3.2 Versuchsablauf	16
3.6.4 Durchflusszytometrische Messung der Nekrose- und Apoptoseinduktion	17
3.6.4.1 Hintergründe	17
3.6.4.2 Versuchsablauf	18
3.7 Western Blot	19
3.7.1 Aussaat der Zellen	19
3.7.2 Lysatherstellung	19
3.7.3 Proteinbestimmung (nach Bradford)	19
3.7.4 SDS-Page	20
3.7.5 Elektrophorese	21
3.7.6 Western Blot-Ablauf	22

3.8 ATP-Bestimmung mittels Colorimetric Assay	23
3.8.1 Hintergründe	23
3.8.2 Versuchsablauf	23
3.9 Statistik	24
4. <u>Ergebnisse</u>	25
4.1 Glukose- und Laktatmessung	25
4.2 HIF-1α	26
4.3 ATP	27
4.4 pAMP- und AMP-Kinase	28
4.5 TMRE	30
4.6 Nicoletti	32
4.7 Annexin- und Propidiumiodid-Färbung	34
4.8 Koloniebildungstest	37
5. <u>Diskussion</u>	38
6. <u>Zusammenfassung</u>	44
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	45
8. <u>Anhang</u>	49
9. <u>Erklärung zum Eigenanteil</u>	59
10. <u>Danksagung</u>	60

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
Cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DCA	Dichloracetat
$\Delta\Psi_m$	Delta psi = mitochondrielles Membranpotential
DTT	Dithiothreitol = Clelands Reagenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (Enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest)
FACS	Durchflusszytometer (Fluorescence-activated cell sorter)

FCS	Fötale Kälberserum (Fetal calf serum)
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward scatter)
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
H ⁺	Kation des Wasserstoffs
Hela Zellen	menschliche Epithelzellen des Zervixkarzinoms
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N´-[2-ethansulfonsäure]
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
Inc.	Incorporated
Int.	International
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
m	Meter
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ mol/l	Mikromol pro Liter

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol/l	Millimolar pro Liter
MPT	Mitochondrial permeability transition pore
n	Anzahl der Versuchsdurchführungen
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaPP	Natriumpolypropylen
Na ₃ VO ₄	Natrium-Orthovanadat
nm	Nanometer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered saline)
pAMPK	phosphorylierte AMP-aktivierte Kinase
PANC-1	menschliche epitheliale Tumorzellen der Bauchspeicheldrüse
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvenylidenfluorid
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellmedium)

s.	siehe
SB	Laemmli Sample Buffer
SD	Standardabweichung (Standard deviation)
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side scatter)
TBS	Tris buffered saline
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
V	Volt
VDAC	Voltage-dependent anion channel

2. Einleitung

Tumorzellen

Tumorzellen zeigen in ihrem Stoffwechsel einige Besonderheiten:

Schon 1924 konnte Otto Warburg zeigen, dass Tumorzellen bevorzugt die anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung nutzen, im Gegensatz zu normalen Zellen, die die oxidative Phosphorylierung vorziehen (Warburg 1924). So beziehen Tumorzellen etwa die Hälfte ihrer ATP-Produktion aus der anaeroben Glykolyse, während normale Zellen nur etwa 10 % ihres ATPs durch anaerobe Glykolyse gewinnen (Warburg 1956). Das bringt Tumorzellen den Vorteil eines anaeroben Stoffwechsels, der ihnen Wachstum auch ohne optimale Sauerstoffversorgung ermöglicht.

Warburg stellte die Hypothese auf, dass der glykolytische Phänotyp bei Tumorzellen durch einen Defekt der Mitochondrien zustande kommt (Warburg 1956). Später konnte allerdings nachgewiesen werden, dass auch Tumorzellen funktionierende Mitochondrien besitzen (Pedersen 1978). Andererseits können auch Nicht-Tumorzellen Glukose vorwiegend anaerob verstoffwechseln (Brand und Hermfisse 1997).

Da viele Tumorzellen eine erhöhte Glukoseverstoffwechslung und einen anaeroben glykolytischen Phänotyp aufweisen (Michelakis et al. 2008), wurde postuliert, dass diese Eigenschaft den Tumorzellen einen evolutionären Vorteil bringen würde und sie deshalb eine unbedingte Voraussetzung für den malignen Phänotyp darstellt (Gatenby und Gillies 2004). Insbesondere, da Tumorzellen auch unter Normoxie die anaerobe Glykolyse bevorzugen, gehen (Gatenby und Gillies 2004) davon aus, dass sie den Tumorzellen einen deutlichen Proliferationsvorteil bringt. Ein Verzicht auf die oxidative Phosphorylierung ermöglicht nämlich auch die Reduktion schädlicher Nebenprodukte wie beispielsweise der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder den Ausstrom von H^+ Ionen aus den Mitochondrien (Sutendra et al. 2013), wodurch die Tumorzellen möglicherweise vor Apoptose geschützt werden

(Bonnet et al. 2007). Neben dem vermuteten Schutz vor der Apoptose führt die anaerobe Glykolyse der Tumorzellen zur vermehrten Milchsäureproduktion und Ansäuerung des Extrazellulärraumes (Gatenby und Gillies 2004). Durch diese Azidifizierung wird der Verdau der extrazellulären Matrix erleichtert und somit die Tumorzellmobilität und -metastasierung gefördert (Bonnet et al. 2007) (Walenta et al. 2000).

Der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF-1 α) kann in Tumorzellen auch unter Normoxie erhöht exprimiert werden. HIF-1 α hemmt die Mitochondrienfunktion (Duan et al. 2013) und somit den Sauerstoffverbrauch (Chen et a. 2009; Kim et al. 2006) der Tumorzelle. Gleichzeitig steigert es den Glukoseumsatz (Semenza 2002) der Tumorzelle. Dementsprechend sind Tumorzellen perfekt vorangepasst an ein hypoxisches Milieu. Hypoxie tritt in soliden Tumoren ab einer bestimmten Größe, aufgrund insuffizienter Vaskularisierung, häufig auf. Tumorzellen sind, dank dieser Anpassungen, auch unter Hypoxie in der Lage zu proliferieren.

Tumorzellen unter Hypoxie sind zugleich auch resistenter gegen Chemo- und Strahlentherapie (Aebersold et al. 2001), da die Minderperfusion der Tumorzellen ein effizientes Anfluten der Chemotherapeutika verhindert. Auch kann es unter hypoxischen Bedingungen zu einer Selektion von maligneren und aggressiveren Tumorzellen mit erhöhter intrinsischer Chemotherapie- oder/ und Strahlenresistenz kommen. Zusätzlich ist die Strahlentherapie in Hypoxie um etwa den Faktor 2-3 ineffizienter, bezogen auf die Induktion von DNS-Doppelstrangbrüchen (Huber et al., 2013).

Dichloracetat

Könnten durch Pharmaka die Tumorzellen gezwungen werden Glukose oxidativ zu verstoffwechseln, wäre - zumindest theoretisch - die Hypoxieanpassung, und somit die oben erwähnten Überlebensvorteile der Tumorzellen, geschwächt. Sehr vielversprechend ist bei diesem Ansatz ein Medikament namens Dichloracetat (DCA). Es ist ein oral oder intravenös applizierbares Medikament

mit einer oralen Bioverfügbarkeit von fast 100 % (Duan et al. 2013). DCA kommt natürlicherweise in niedrigen Dosen im Trinkwasser vor (4 µg/kg) und wird schon seit mehreren Jahrzehnten zur Therapie der Laktatazidose (Stacpoole et al. 1998) mit nur geringen Nebenwirkungen (wie z.B. peripherer Neuropathie) in Dosen von 50 mg/kg/KG (Michelakis et al. 2010) eingesetzt. Auch zur Therapie bei kardialer Ischämie und Herzinsuffizienz wird es benutzt (Bersin und Stacpoole 1997).

In präklinischen und klinischen Studien im Rahmen onkologischer Fragestellungen konnte keine Normalgewebetoxizität für DCA festgestellt werden (Bonnet et al. 2007; Liu et al. 2013). DCA überwindet zudem die Blut-Hirn-Schranke (Sutendra et al. 2013).

DCA hemmt die Pyruvatdehydrogenasekinase (PDK), wodurch die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase (PDH) gesteigert wird. Dadurch wird vermehrt Pyruvat zu Acetyl-CoA oxidiert (Stacpoole 1989; Bonnet 2007). Acetyl-CoA wird dann über den Citratzyklus und die Atmungskette weiter verstoffwechselt. So kann DCA den Stoffwechsel einer Zelle von anaerober Glykolyse zur oxidativen Phosphorylierung umschalten. In Tumorzellen könnte dieses Umschalten zur vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Stockwin et al. 2010; Shen et al. 2013), zur verminderten extrazellulären Azidifizierung (Bonnet 2007) (Shen et al. 2013) und damit verbundener geringerer Metastasierung (Gatenby und Gillies 2004) (Walenta et al. 2000) sowie erleichterter Apoptoseinduktion führen (Bonnet 2007) (siehe oben).

Über die Wirksamkeit von DCA in hypoxischen Tumorzellen gibt es nur wenige Studien. Aus diesen geht hervor, dass DCA die HIF-1 α -Expression und somit die Stressantwort der Tumorzellen auf Hypoxie senken kann (Sun et al. 2011; Sutendra et al. 2013). Da DCA die anaerobe Glykolyse hemmt, ist davon auszugehen, dass DCA auch über Verminderung der ATP-Produktion hypoxische Zellen schädigen kann. Inwieweit DCA tatsächlich Tumorzellen, über die oben beschriebene erzwungene metabolische Umstellung, gegenüber Hypoxie sensitivieren kann, will diese experimentelle Arbeit untersuchen.

Fragestellung

Tumorhypoxie stellt ein großes Problem in der Antikrebs therapie dar. Derzeit befinden sich vier verschiedene hypoxische "Therapie-Sensitizer", also Chemotherapeutika, die spezifisch die problematischen hypoxischen Areale schwächen, in klinischer Anwendung: Chinon-Antibiotika wie Metamycin C, Apaziquon (E09) und Porfiromycin; Nitroimidazole (Metronidazol und Misonidazol) und aliphatische und heteroaromatische N-Oxide wie Tirapazamin (TPZ). Sie alle werden durch intrazelluläre Reduktasen aktiviert. In aktivierter Form können sie zur Alkylierung der DNS und somit zur Apoptose der Tumorzelle führen (Aigner et al. 2013). Daneben gibt es Substanzen, die direkt an den Mitochondrien angreifen (Oligomycin, Rotenon oder Rhodamin 123) (Grover et al. 2008; Di Monte 2003; Johnson et al. 1981), in den Pentosephosphatweg eingreifen (Oxythiamin) (Pelicano et al. 2006) oder, wie DCA, spezifische Enzyme der Glykolyse hemmen (2- Deoxyglukose oder 3-Bromopyruvat) (Dwarakanath und Jain 2009; Robey et al. 2007).

DCA könnte insbesondere Tumorzellen schädigen, die auf anaerobe Glykolyse angewiesen sind. Entweder, weil sie auch unter Normoxie einen hohen Warburg-Effekt zeigen, oder, weil sie aufgrund von Hypoxie zur anaeroben Glykolyse gezwungen sind.

Diese Studie soll konkret folgende Fragen an zwei unterschiedlichen Tumorlinien mit beschriebenem starkem (HCT116- Kolonkarzinomzellen) bzw. moderatem (MCF-7-Brustkrebszellen (Guppy et al. 2002)) Warburg-Effekt beantworten:

1. Kann DCA in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdrucks den Glukoseverbrauch und die Milchsäureproduktion der Tumorzellen modulieren?
2. Wirkt sich die diese Modulation auf den Energiehaushalt und die Stressantwort der Tumorzellen unter Hypoxie aus?
3. Kann DCA den Zelltod der Tumorzellen unter Hypoxie erhöhen und ihr klonogenes Überleben erniedrigen?

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Zellen

Für sämtliche Versuche wurden adhärent wachsende HCT116 Wildtyp- (humane kolorektale Karzinomzellen) und MCF-7 Wildtyp-Zellen (humane Adenokarzinomzellen der Brust) verwendet. Die HCT116-Tumorzellen stammen aus der Leibniz-Institut DSMZ GmbH Braunschweig und die MCF-7-Tumorzellen sind uns von Prof. Peter Daniel aus Berlin überlassen worden.

3.2 Zellkulturen

Als Medium diente für die HCT116-Zellen McCoy's 5A Medium mit einem Zusatz von 10%igem fötalem Kälberserum (FCS) und 1%iger L-Glutaminbeimengung, für die MCF-7-Zellen RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS-Zusatz (Tabelle 1 im Anhang).

Die Zellen wurden mit 25 ml des entsprechenden Mediums in großen Zellkulturflaschen (175 cm²) unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und bei einer 5%igen Kohlendioxidkonzentration in Brutschränken inkubiert. Alle 4-5 Tage erhielten die Zellen unter sterilen Bedingungen frisches Medium. Zur Passagierung wurden die Zellen mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate-buffered Saline; PBS) gewaschen und mit 6 ml angewärmtem Trypsin für 10 bis 15 Minuten inkubiert. Das Trypsin löst die adhären Zellen vom Boden der Zellkulturflasche und trennt ihre Zellkontakte, sodass sie einzeln und abgerundet vorliegen. Die Reaktion wurde mit 4 °C kaltem Medium (14 ml) abgestoppt. Durch den Proteinanteil im FCS des Mediums wird das Trypsin inaktiviert und eine weitere Proteolyse verhindert. Anschließend wurde den Zellkulturflaschen nach der Passagierung wieder 25 ml frisches Medium zugesetzt.

Nach ca. 30-35 maligem Passagieren der Zelllinien wurde jeweils eine neue Zelllinie aufgetaut, um mögliche Veränderungen der Zellen durch Selektion in der jeweiligen Kultur zu vermeiden. Zum Auftauen wurden die Kryo-Röhrchen

kurz im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, bei 1300 Umdrehungen/min für 5 Minuten abzentrifugiert und dann das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium und 0,5 ml FCS in kleine (25 cm²) Zellkulturflaschen überführt. Nach 2 Tagen Inkubation im Brutschrank erfolgte der erste Mediumwechsel.

Bei sämtlichen Versuchen mit den Zelllinien wurden diese am Vortag in der entsprechenden Zelldichte ausgesät, konnten so am Boden des Kulturgefäßes anwachsen und wurden am nächsten Tag entsprechend der Versuchsbeschreibung behandelt.

3.3 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 100 µl der entsprechenden Zellsuspension mit 100 µl Trypanblaulösung (1:10 mit PBS verdünnt, Tabelle 2 im Anhang) vermischt und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Trypanblau färbt nur tote Zellen blau, da lebende Zellen es nicht aufnehmen. So war es möglich nur die lebenden Zellen zu zählen und die entsprechende Zellzahl zu bestimmen:

Zellzahl pro ml = Zellzahl/ Anzahl ausgezählte Quadrate x Verdünnung x 10⁴

3.4 Glukose- und Laktatmessung

Zur Messung wurden am vorherigen Tag Zellen beider Zelllinien, zu je 1,5 x 10⁶ Zellen pro mittelgroßer Kulturflasche, mit 10 ml des entsprechenden Mediums ausgesät, damit sie über Nacht anwachsen konnten. Am darauffolgenden Tag wurde aus den insgesamt 14 mittelgroßen Zellkulturflaschen pro Zelllinie das Medium entfernt und die Zellen mit jeweils 5 ml PBS steril gespült, und die Zellen mit 0 bis 30 mM Dichloracetat (0,1 Mol Stammlösung in Medium verdünnt, Tabelle 3 im Anhang) in Medium überschichtet. Zwei Zellkulturflaschen wurden mit der gleichen DCA-Konzentration behandelt und eine davon über Nacht in Hypoxie (Gas Pak Systeme: <0,7 % O₂ nach 2,5 Stunden und >10 % CO₂ nach 24 Stunden) gesetzt. Nach 24 Stunden wurde

dann pro Flasche 1 ml des Mediums in ein Eppendorf-Cup überführt und zur Laktat- und Glukosemessung an die Klinische Chemie übergeben oder zur späteren Messung bei -25 °C eingefroren.

3.5 Koloniebildungstest - Bestimmung der Überlebensrate

Die Zellen wurden über Nacht, wie unter `Laktat- und Glukosemessung´ erwähnt, vorbehandelt. Daraufhin wurde jede Zellkulturflasche mit 5 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 3 ml Trypsin abgelöst. Die Ablösereaktion wurde dann mit 8 ml kaltem Medium gestoppt. Das Gemisch aus Zellen, Medium und Trypsin wurde dann in 15 ml Falcon Tubes überführt und daraus die Zellzahl bestimmt. Je nach ausgezählter Zellzahl wurde dementsprechend viel Medium-/Trypsingemisch entnommen und mit reinem Medium vermischt, um eine 10 ml Suspension von 10 000 Zellen/ml zu bekommen. Diese Suspension wurde dann in 2 weiteren Verdünnungsschritten auf eine Konzentration von 100 Zellen/ml verdünnt. Nun wurden zu jeder der ursprünglichen 14 Kulturflaschen 3 kleine Kulturflaschen zu 100 Zellen/Flasche, zu 200 Zellen/Flasche und (ab DCA-Konzentrationen von 15 mM) zu 500 Zellen/Flasche ausgesät und mit 4 ml Medium (bei 100 Zellen/Flasche) beziehungsweise 2 ml (bei den Flaschen mit 200 Zellen) aufgefüllt. Diese kleinen Zellkulturflaschen wurden dann für 2-3 Wochen im Brutschrank inkubiert, bis mit bloßem Auge sichtbare Kolonien gewachsen waren.

3.5.1 Färbung

Nach dem Wachsen sichtbarer Kolonien wurde der Mediumüberstand aus den Kulturflaschen entfernt und verworfen und die Kolonien für 10 min in 5 ml 3,7%iger Formaldehydlösung fixiert, die anschließend ebenfalls verworfen wurde. Danach wurden die Zellen für 10 min mit 5 ml 70%igem Ethanol fixiert, anschließend mit Aqua destillata gespült, und mit 0,05%igem Coomassie (Zusammensetzung siehe Tabelle 4 im Anhang) für 20 min gefärbt . Danach

wurden die Flaschen erneut mit Aqua destillata gespült und luftgetrocknet. Die blau eingefärbten Kolonien waren nun gut sichtbar und konnten bei entsprechender Beleuchtung ausgezählt werden.

3.6 Durchflusszytometrie

3.6.1 Hintergründe zur Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer analysiert das emittierte Licht einzelner Zellen (Partikel), die während ihres Durchflusses durch eine Messkammer einzeln mit Laserlicht angeregt werden (Van Dilla and Marvin A 1985). Analysiert werden das Vorwärtsstreulicht (FSC für Forward scatter), als Maß der Partikelgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC für Side scatter), als Maß der Partikel-Granularität, und Fluoreszenzemissionen. Letztere stammt von Fluorochromen, die als spezifische Marker in die Zellen gebracht werden oder an den Zellen binden.

3.6.2 Durchflusszytometrische Messung der DNS Fragmentierung – Nicoletti-Färbung

Hintergrund der Nicoletti-Färbung (Propidiumiodid-Färbung)

3.6.2.1 Apoptosebestimmung

Bei der Nicoletti-Färbung wird die DNS durch Propidiumiodid angefärbt. Geht die Zelle in die Apoptose, werden Endonukleasen aktiviert, die zu einer Fragmentierung der DNS führen. Die Zellmembran wird bei der Nicoletti-Färbung solubilisiert, sodass das Propidiumiodid direkten Zugang zur DNS des Zellkerns bekommt und diese entsprechend anfärben kann. Die DNS-fragmentierten Zellen erscheinen im Propidiumiodid-

Fluoreszenzintensitätshistogramm dann als Sub-G1-Population (siehe 3.6.2.1) mit verminderter Fluoreszenz im Vergleich zu vitalen Zellen (Abbildung 1).

3.6.2.2 Zellzyklusbestimmung

Neben den Zellen mit fragmentierter DNS lassen sich die Propidiumiodid-gefärbten Zellen in der G₁- bzw. G₀-Zellzyklusphase, sowie die Zellen in der G₂-Phase als distinkte Peaks im Propidiumiodid-Fluoreszenzintensitätshistogramm darstellen. Zwischen diesen distinkten Peaks-Populationen residieren im Histogramm die Zellen in der DNS-Synthese (S)-Phase (Abbildung 1).

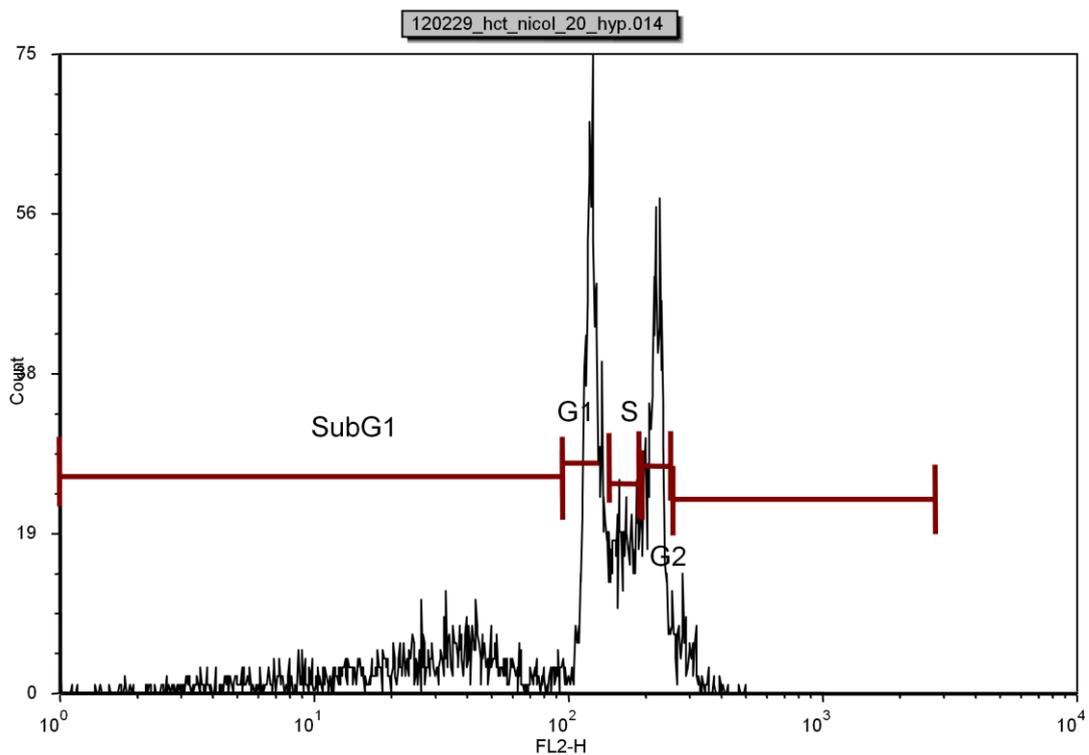


Abbildung 1: Zellzyklusphasen in der Fluoreszenzmessung (sichtbar durch den unterschiedlichen DNS-Gehalt der Zellen)

3.6.2.3 Versuchsablauf der Nicoletti-Messung

Auf einer 6-Well Platte wurden pro Well 500.000 Zellen in 4 ml Medium ausgesät und über Nacht zum Anwachsen im Brutschrank gelagert. Nach 24 h wurden das alte Medium abgesaugt, jedes Well mit 1 ml PBS gewaschen und nach dem Absaugen des PBS mit der entsprechenden DCA-Konzentration (5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM) und/oder Hypoxie behandelt, sodass am Ende von jeder DCA-Konzentration 1 Well mit und 1 Well ohne Hypoxiebehandlung vorlagen. Die nicht mit DCA behandelten Zellen (mit und ohne Hypoxiebehandlung) dienten als Kontrollen.

Nach 24 h in der entsprechenden DCA-Konzentration und in Hypoxie wurde das alte Medium abgesaugt und jedes Well mit 1 ml PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen jedes Wells mit 0,5 ml Trypsin abgelöst. Die Reaktion des Trypsins wurde, nach ca. 10 min, mit 3 ml kaltem Medium abgestoppt und das Gemisch aus Zellen, Medium und Trypsin in ein Facs-Röhrchen überführt. Die Facs-Röhrchen wurden für 5 min bei 1300 Umdrehungen/min zentrifugiert und im Anschluss daran der Überstand aus jedem Röhrchen abgesaugt und verworfen. Die Zellpellets in den Facs-Röhrchen wurden mit 500 µl Nicoletti-Puffer (Tabelle 5 im Anhang) vermischt und für 60 min abgedunkelt bei Raumtemperatur gelagert. Die Facs-Messungen wurden mit dem FACSCalibur (BD Bioscience) im FL2-Detektor analysiert.

3.6.3 Durchflusszytometrische Messung des mitochondrialen Membranpotentials (TMRE-Messung)

3.6.3.1 Hintergrund der TMRE-Färbung

TMRE (Tetramethylrhodaminethylester) ist ein membranpermeabler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der sich in der Membran von Mitochondrien mit intaktem Membranpotential ($\Delta\psi_m$) anreichert. Diese Ansammlung führt zu einem starken Fluoreszenzsignal. In Zellen mit depolarisiertem mitochondrialem

Membranpotential oder in Zellen mit inaktiven Mitochondrien wird der Farbstoff nicht angereichert. Dadurch schwächt sich die Fluoreszenz des Farbstoffes ab. Eine abnehmende TMRE-Fluoreszenz ist somit gleichbedeutend mit dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Abbildung 2 und 3).

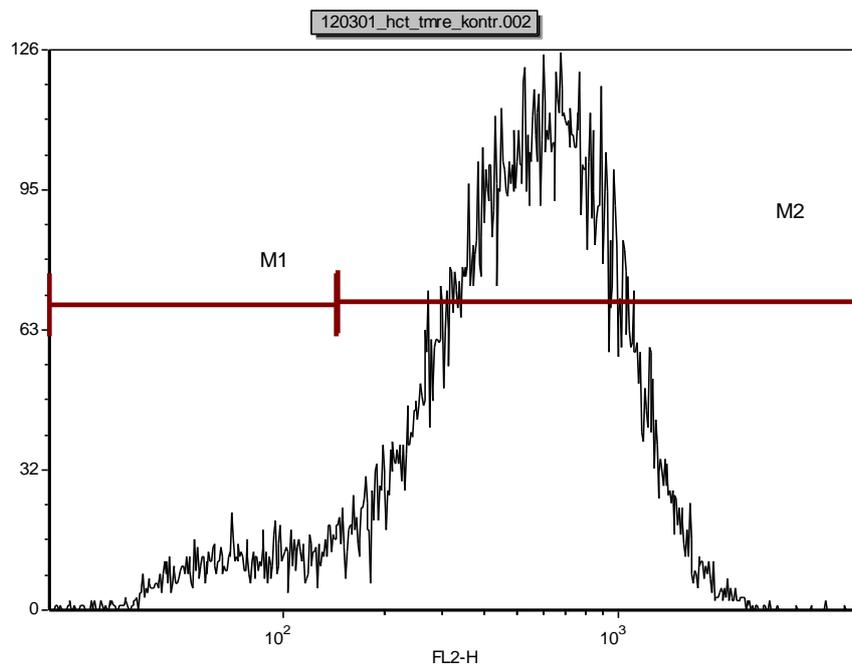


Abbildung 2: TMRE-Fluoreszenzintensitätsverteilung

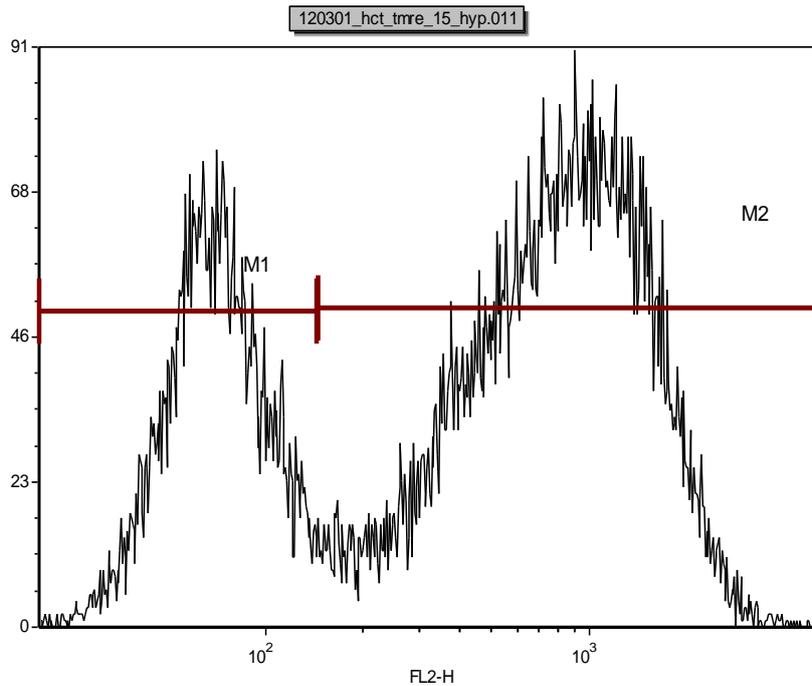


Abbildung 3: Zunahme der TMRE-Fluoreszenz als Kennzeichen des Zusammenbruchs des innermitochondrialem Membranpotentials bei Dichloracetat- und Hypoxieanwendung

3.6.3.2 Versuchsablauf der TMRE-Messung

Vorbereitet wurden die Zellen ebenso wie bei der Nicolettifärbung. Der einzige Unterschied lag darin, dass nur 200 μ l TMRE-Puffer (Tabelle 6 im Anhang) zur Färbung der Zellpellets verwendet wurden und dass ein zusätzliches Pellet un behandelter Zellen mit 200 μ l TMRE – Puffer versetzt wurde, der zusätzlich Carbonylcyanid m-Chlorophenylhydrazon (CCCP, 100 μ M) enthielt. CCCP depolarisiert das mitochondriale Membranpotential vollständig. Somit diente diese Kontrollprobe als Vergleich und zur Quantifizierung der Messungen, bei denen ein Membranpotential sichtbar war. Die Facs-Messungen wurden mit dem FACSCalibur (BD Bioscience) im FL2-Detektor analysiert.

3.6.4 Durchflusszytometrische Messung der Nekrose- und Apoptoseinduktion (Annexin-V- und Propidiumiodid-Färbung)

3.6.4.1 Hintergrund der Annexin-V- und Propidiumiodidfärbung

Während der Apoptose verliert die Zelle die Phospholipidasymmetrie der Plasmamembran. Phosphatidylserin (PS), das normalerweise an der Innenseite der Zellmembran gelegen ist, erscheint auf der Außenseite und wird von Makrophagen als Fresssignal erkannt. Durch die Phagozytose apoptotischer Zellen schützt sich der Körper vor der Freisetzung entzündungsinduzierender zytoplasmatischer Antigene, wie es bei Nekrosen der Fall wäre.

Fluoreszenz-markiertes Annexin-V ist ein calciumabhängiges Protein, das PS bindet und somit als Marker für apoptotische Zellen geeignet ist. Allerdings bindet Annexin-V auch in nekrotischen Zellen an PS, da auch diese Zellen ihre Membranasymmetrie verloren haben und Annexin-V so in der Lage ist auch an das PS zu binden. Zur Unterscheidung apoptotischer von nekrotischen Zellen ist somit eine weitere Färbung nötig. Propidiumiodid (PI) färbt in nicht-permeabilisierten Zellen die Zell-DNS nur, wenn durch Nekrose die Zellmembran rupturiert wurde (Abbildung 4). Nekrotische Zellen lassen sich daher mit Annexin-V und PI, apoptotische Zellen nur mit Annexin-V anfärben (Tabelle 7 im Anhang).

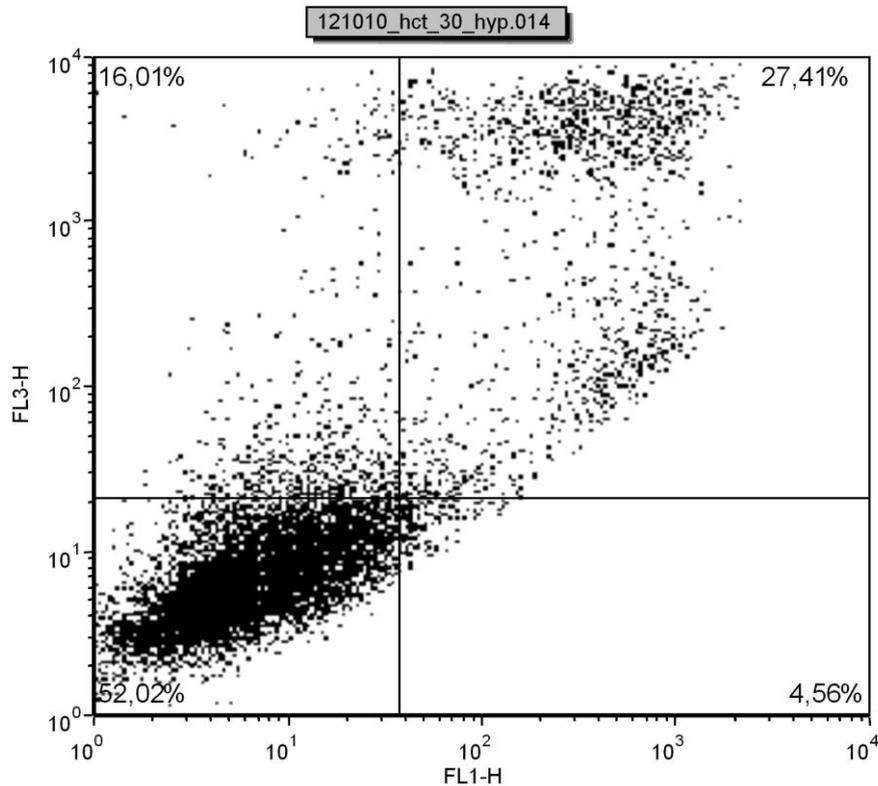


Abbildung 4: Dot-Plot. Die Annexin-V-Bindung (FL1-H) der einzelnen Zellen ist gegen die Propidium-Fluoreszenzintensität (FL3-H) aufgetragen.

3.6.4.2 Versuchsablauf der Annexin-V und Propidiumiodid-Färbung

Die Vorbereitung der Zellen entspricht der Vorbereitung der Nicoletti-Messungen, mit der Ausnahme, dass 200 μ l des Annexin-/PI-Farbstoff (Tabelle 7 im Anhang) zur Färbung benutzt wurden und der Farbstoff insgesamt 20 min abgedunkelt und bei Raumtemperatur auf den Zellen verblieb, bevor die durchflusszytometrischen Messungen im FL1-Detektor stattfanden.

3.7 Western Blot

3.7.1 Aussaat der Zellen

In mittlere Zellkulturflaschen (75 cm²) wurden jeweils 2 Millionen Zellen ausgesät und mit 10 ml Medium für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das alte Medium verworfen, die Zellen pro Flasche mit 5 ml kaltem PBS gewaschen und unter Hypoxie und/oder DCA in einer Konzentration von 15 mM im Zellkulturmedium über 24 h behandelt (Tabelle 8 im Anhang). Danach wurden die Lysate hergestellt.

3.7.2 Lysatherstellung

Nach der unter `Aussaat der Zellen` genannten Vorbehandlung, wurde das alte Medium abgesaugt, verworfen und die Zellen in jeder Flasche mit 3 ml eiskaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde wieder abgesaugt und verworfen. Daraufhin wurden die Zellen in jeder Flasche mit 500 µl Lysepuffer (Tabelle 9 im Anhang) bedeckt und mittels Zellschaber (Tabelle 15 im Anhang) gründlich vom Flaschenboden abgeschabt. Das abgeschabte Puffer-/Zellgemisch wurde in Eppendorf-Cups überführt und für 30 min auf Eis gelagert. Danach wurden die Eppendorf-Cups bei 3 °C und einer Umdrehungszahl von 15 000 x g für 15 min zentrifugiert. Daraufhin wurden aus jedem Eppendorf-Cup 400 µl Überstand in einen neuen Eppendorf-Cup überführt, der ebenfalls auf Eis gelagert wurde. Das Sediment wurde verworfen.

3.7.3 Proteinbestimmung (nach Bradford)

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford bindet der Farbstoff Coomassie-Blau (Bio-Rad 1:5 mit H₂O) an basische Proteinseitenketten (v.a. an Arginyl- und Lysyl-Reste). Bei Bindung ändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm (ungebundene, protonierte Form) zu 595 nm (gebundene, unprotonierte Form). Dies wird sichtbar in einer Farbänderung von Braunrot hin zu einem kräftigen Blau. Da das Ausmaß der Farbänderung abhängig ist von

der Proteinkonzentration, ist es nötig eine Kalibrierung durch ein Standardprotein (BSA -Bovine Serum Albumin (1 mg/ml)) vorzunehmen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der auf Eis gelagerten Überstände wurden pro Well einer 96-Well-Platte jeweils 40 µl des Bio-Rad-Coomassie-Blaus mit 160 µl H₂O vermischt und 1 µl aus jedem Überstand der, unter `Lysatherstellung` erwähnten, Eppendorf-Cups dazugegeben. Zur Kontrolle des Farbumschlags wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA (bestehend aus 0 µl, 2 µl, 4 µl, 6 µl und 8 µl einer 1 mg/ml BSA-Lösung), ebenfalls in 40 µl Coomassie-Blau und 160 µl H₂O, als Standardkurve angelegt. Der Farbumschlag der entstandenen Lösung wurde bei 600 nm im Photometer gemessen. Das Ausmaß des Farbumschlags entsprach der enthaltenen Proteinkonzentration in den Proben. Anhand der Standardkurve konnte so die jeweilige Proteinkonzentration der Einzelproben bestimmt werden.

Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und das arithmetische Mittel der jeweiligen Farbumschläge gebildet. Entsprechend der gemessenen Proteinmenge wurde zu jedem Überstand in den Eppendorf-Cups die entsprechende Menge Lysepuffer (ca. 100 – 600 µl) und 4x SB (Laemmli Sample Buffer) + 1/10 Volumen 1 M DTT in H₂O (ca. 100 – 300 µl) zugegeben (Tabelle 10 im Anhang), sodass sich in jedem Zelllysate die gleiche Menge Protein befand. Das DTT (Dithiothreitol) reduziert die Disulfidbrücken in den Proteinen und zerstört so die Proteinfaltung. Danach wurden die Lysate in den Cups für 10 min bei 90 °C erhitzt um die Proteine zu linearisieren und sie so für die Größenaufftrennung mittels SDS-Page vorzubereiten.

3.7.4 SDS-Page

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteinen anhand ihrer Größe aufgetrennt.

Es wurden 10%ige (für HIF-1α-Bestimmung) und 14%ige (für AMPK- und phosphorylierte AMPK - Bestimmung) SDS-Polyacrylamidgele hergestellt. Vor dem Vermischen der Gelkomponenten wurde die Apparatur zum Gießen der Gele, bestehend aus 2 Glasplatten und einem Abstandstreifen (der den

nötigen Abstand für die Gele zwischen den Platten gewährleistet),
zusammengebaut und mit Wasser auf ihre Abdichtung getestet.

Zuerst wurden alle Zutaten für zwei Trenngele zusammengegeben (Tabellen 11 und 12 im Anhang). Diese Mischung wurde in die vorbereitete Gelkammer pipettiert und zum Ausschluss von Luftsauerstoff mit Isopropanol überschichtet. Nach Festigung des Trenngels (nach ca. 60 min) wurde das Isopropanol abgegossen.

Dann wurden die Zutaten für die Sammelgele (Tabellen 13 und 14 im Anhang) zusammengemischt. Diese Mischung wurde dann oberhalb der gefestigten Trenngele in die Gelkammern pipettiert. Zwischen die Gelkammer-Glasplatten wurde ein Kamm (Tabelle 15 im Anhang) in die Sammelgelmischung eingefügt und bis zur Erhärtung der Gele dort belassen. Wurden die erhärteten Gele nicht sofort verwendet, wurden sie mitsamt Glasplatten, Abstandstreifen und Kamm in feuchte Papiertücher und Frischhaltefolie eingewickelt und in dieser Form bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert.

3.7.5 Elektrophorese

Als Elektrophoresepuffer wurde, wie unter `Proteinbestimmung´ erwähnt, 4x SB und DTT verwendet. Es wurden jeweils 30 µl des Lysats in eine Geltasche pipettiert. Auf jedem Gel wurden 5 µl eines Größenmarkers mitgeführt (Prestained Protein Ladder, Page Ruler). Die angelegte Spannung betrug 60 V (für die Sammelgele) bzw. 160 V (für die Trenngele) und die Dauer der Elektrophorese ca. 100 min (für das 10%ige Gel) und 140 min (für 14%iges Gel (Tabelle 16 im Anhang)). Die Elektrophorese wurde beendet, sobald der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht hatte.

3.7.6 Western Blot-Ablauf

Das Gel wurde in eine Haltungsverrichtung für die Blotkammer eingelegt, bedeckt von einer 12 x 9 cm großen, zuvor mit 70%igem Ethanol benetzten, Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Zuerst wurde ein Schwamm (Tabelle 20 im Anhang) als äußerste Schicht aufgelegt, auf den 3 Filterpapiere geschichtet wurden (12 x 9 cm groß). Auf die Filterpapiere wurden dann das Gel und die Membran platziert. Darüber folgten wiederum 3 Filterpapiere und ein Schwamm als äußerste Schicht. Die so befüllte Halterung wurde in eine, mit kaltem Blottingpuffer (Tabelle 19 im Anhang) gefüllte, Blotkammer eingehängt. Das Gel wurde zur Kathode und die Membran zur Anode ausgerichtet, damit die negative geladenen Proteine vom Gel auf die Membran übertragen wurden. In der Blotkammer wurde die Spannung so eingestellt, dass 800 mA Strom flossen (90 min / 4 °C). Im Anschluss wurde die PVDF-Membran mit den übertragenen Proteinen kurz in TBS-Tween (Tabelle 19 im Anhang) geschwenkt und dann mit 5 % Magermilchpulver/ TBS-Tween für eine Stunde bei Raumtemperatur gewaschen, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Daraufhin wurde die Membran für 3 x 10 min und 2 x 15 min in TBS-Tween gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper, in entsprechender Verdünnung (Tabelle 17 im Anhang), auf dem Schüttler inkubiert. Der zweite Antikörper wurde nach erneutem Waschen in TBS-Tween für eine Stunde, in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 17 im Anhang), bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran erneut für 3 x 10 min und 2 x 15 min in TBS-Tween gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran nach dem Waschen für eine Minute mit einer Peroxidase - Substratlösung (Reagenz 1+2) behandelt und die Lumineszenz des Produktes durch Belichten eines Films (Belichtungszeiten in Tabelle 18 im Anhang) bestimmt. Zur Semi-Quantifizierung der Proteinabundanz wurden die Banden eingescannt und die Pixel-Grauwerte der einzelnen Banden gemittelt.

3.8 ATP- Bestimmung mittels Colorimetric Assay

3.8.1 Hintergründe zur ATP-Bestimmung

Der verwendete ATP-Assay beruht auf der Bestimmung von ATP durch colorimetrische Messungen, statt der bekannten Lumineszenzmessungen mithilfe von Luziferasen. Bei dem colorimetrischen Assay wird die Verstoffwechslung von Glycerin dazu genutzt ein Reaktionsprodukt zu erzeugen, das ein Absorptionsmaximum bei 570 nm hat.

3.8.2 Versuchsablauf der ATP-Bestimmung

Die Zellen wurden, zu je 3 Millionen pro Well in 6-Well-Platten, mit ca. 4 ml des entsprechenden Mediums ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde das alte Medium verworfen, die Zellen mit je 1 ml PBS pro Flasche gewaschen und in frischem Medium \pm DCA , wie in Tabelle 21 aufgeführt, im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 h wurde das alte Medium verworfen, die Zellen mit je 1 ml PBS gewaschen, und mit 0,5 ml Trypsin vom Boden der 6-Well-Platte gelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde mit 3 ml kaltem Medium abgestoppt und das Zell-/Trypsin-/ Mediummisch in ein 15 ml Flacon-Röhrchen überführt und bei 1300 Umdrehungen/ min für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Pellets mit je 300 μ l des im ATP-Kit enthaltenen ATP Assay Buffer lysiert, um die Zellen aufzubrechen und das darin erhaltene ATP für die Messung zugänglich zu machen. Die mit Lyse-Buffer behandelten Zellen wurden mit einem Hochscherhomogenisator (Ultra-Turrax T8) zerkleinert, um eine gründliche Zerkleinerung der Zellen und somit einen besseren ATP-Austritt aus den Zellbestandteilen zu gewährleisten. Daraufhin wurde aus jedem Flacon 1 μ l der Zell-/ATP-Assay-Buffer-Mischung entnommen und eine Proteinbestimmung (vergleiche `Proteinbestimmung (nach Bradford)`) durchgeführt, um später die gemessene ATP-Menge auf μ g-Zellprotein normalisieren zu können. Nun wurde das restliche Gemisch durch einen

Proteinfilter (Amicon Ultra von Millipore) bei 15 000 Umdrehungen/min für ca. 15 min zentrifugiert, aus dem Filtrat je 50 µl entnommen und auf eine 96-Well Platte überführt. Auf der 96-Well-Platte wurde, um die unbekanntes ATP-Konzentrationen der Proben quantifizieren zu können, eine Standardkurve angelegt. Die Standardkurve bestand aus jeweils 0 µl, 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 6 µl des im ATP-Kit enthaltenen ATP-Standards (1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt). Die jeweiligen Wells mit der ATP-Standard-Füllung wurden mit der entsprechenden µl- Menge ATP Assay Buffer aufgefüllt um eine Gesamtmenge von 50 µl pro Well zu bekommen. Sowohl der Inhalt der Wells der Standardkurve, als auch der der Wells mit den ATP-Proben wurden daraufhin mit 50 µl Reaction Mix (Zusammensetzung in Tabelle 22 und 23 im Anhang) vermischt und für 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt. Daraufhin wurde der Farbumschlag in ein kräftiges Pink/Rot bei 600 nm mit dem ELISA-Reader gemessen.

3.9 Statistik

Alle Messungen wurden an verschiedenen, voneinander unabhängigen, Probenansätzen (n) durchgeführt. Sie wurden als arithmetisches Mittel zusammen mit dem Standardfehler angegeben. Alle angegebenen Daten wurden ab n = 3 mit einem ungepaarten zweiseitigen t-Test (bei unterschiedlicher Varianz wurde der Welch-korrigierte t-Test verwendet) bzw. bei Mehrfachvergleichen mit ANOVA und dem Programm INSTAT 3.06 (2003, GraphPad Software, USA) ausgewertet. Wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug, wurde die Daten als signifikant verschieden gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Glukose- und Laktatmessung

Die Glukose- und Laktatkonzentrationen wurden direkt aus dem Nährmedium der einzelnen Zelllinien bestimmt. Setzt man eine DCA-vermittelte Hemmung der anaeroben Glykolyse voraus, so sollte bei den HCT-116-Tumorzellen, unter Norm- und Hypoxie, und bei den oxidativ phosphorylierenden MCF-7-Tumorzellen, unter Hypoxie, bei zunehmender DCA-Konzentration der Glukoseverbrauch zunehmen und die Laktatproduktion abnehmen. Bei beiden Zelllinien konnte kein Effekt von DCA unter Hypoxie und Normoxie auf Glukoseverbrauch und Laktatproduktion beobachtet werden (Abb. 5).

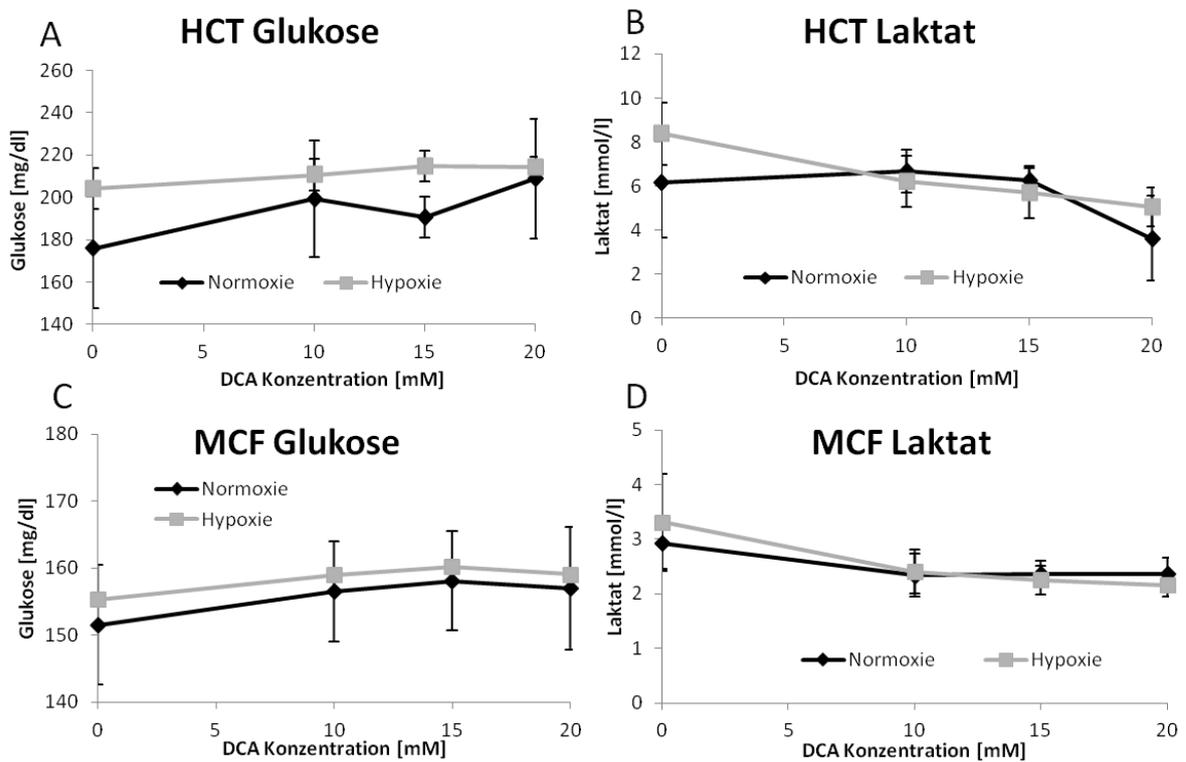


Abbildung 5: Glukose- und Laktatkonzentration im Nährmedium beider Zelllinien. Ursprüngliche Glukosekonzentration der Kontrolle: HCT116-Zellen 175,9 mg/dl und MCF-7-Zellen 151,5 mg/dl; ursprüngliche Laktatkonzentration der Kontrolle: HCT116-Zellen 2,9 mmol/l und MCF-7-Zellen 6,2 mmol/l (n = 4).

4.2 HIF-1 α

Um die Auswirkungen von DCA und Hypoxie auf die Stressantwort der Tumorzelllinien zu beurteilen, wurde zunächst die HIF-1 α -Proteinabundanz, direkt nach der entsprechenden Behandlung mit DCA oder Hypoxie, mittels Western Blot bestimmt.

Wie in Abb. 6 gezeigt, stieg bei beiden Zelllinien unter Hypoxie die HIF-1 α -Proteinabundanz an. Bei beiden Zelllinien entsprach die HIF-1 α -Proteinabundanz bei alleiniger Behandlung mit DCA den Kontrollwerten (Normoxie). Bei beiden Zelllinien sank die HIF-1 α -Abundanz unter Hypoxie bei Behandlung mit DCA auf über die Hälfte des Hypoxie-Wertes ab. Doch erreichten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz.

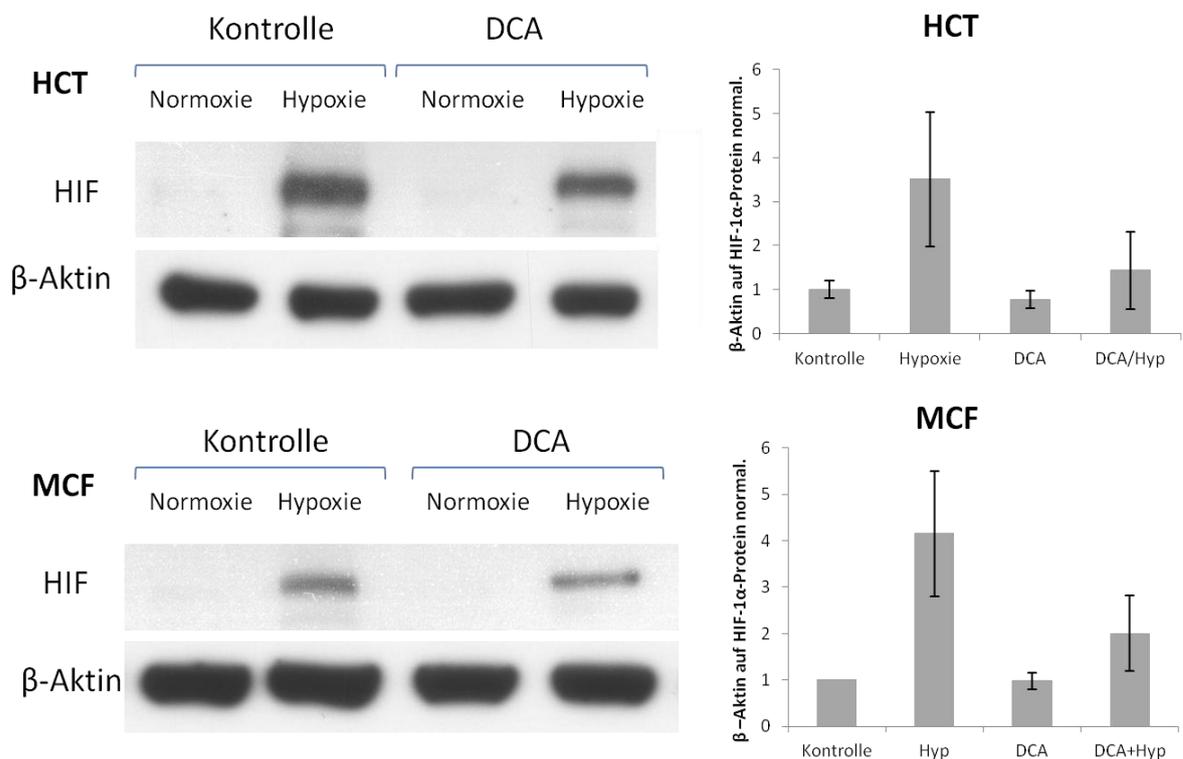


Abbildung 6: Veränderung der HIF-1 α -Proteinabundanz unter DCA-(15 mM)- und/oder Hypoxie-Behandlung. Links: HIF-1 α -Westernblots (oben) mit β -Aktin Ladungskontrolle. Rechts: mittlere semiquantifizierte und β -Aktin-normalisierte HIF-1 α -Proteinmenge in HCT116- (n = 8) und MCF-7-Zellen (n = 4).

4.3 ATP

Um Informationen über den Energiezustand der Tumorzellen zu bekommen, wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt mittels Colorimetric Assay bestimmt. Nach der entsprechenden Behandlung der Zellen mit DCA oder Hypoxie wurde der Farbumschlag der einzelnen Zellmischungen bei 600 nm im ELISA-Reader gemessen.

Abb. 7 zeigt bei den HCT116-Zellen, unter alleiniger Hypoxie-Behandlung, keine Änderung der intrazellulären, auf das Gesamtprotein bezogenen, ATP-Menge im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Behandlung der Zellen mit DCA stieg die ATP-Menge in den Zellen tendenziell an. Bei der kombinierten Behandlung unter Hypoxie und DCA sank der ATP-Wert signifikant um mehr als die Hälfte im Vergleich zur alleinigen DCA-Behandlung (p-Wert im t-Test $\leq 0,05^*$).

Bei den MCF-7-Zellen erhöhte die alleinige DCA-Behandlung, ähnlich wie bei den HCT116-Zellen, die ATP-Menge. Wurden die MCF-7-Zellen mit DCA und Hypoxie behandelt, so konnte man, im Vergleich zu alleinigen DCA-Behandlung, wiederum eine Abnahme der ATP-Menge bis unter das Niveau der Kontrollwerte erkennen. Wegen der hohen Streuung der Werte war diese Abnahme statistisch nicht signifikant.

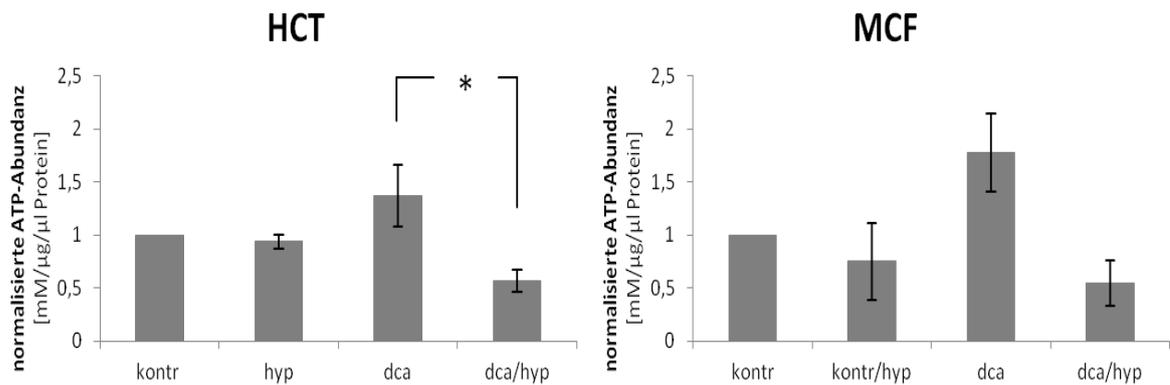


Abbildung 7: Veränderung der kolorimetrisch bestimmten intrazellulären ATP-Menge nach Normalisierung auf die Kontrolle (0 mM DCA, Normoxie). Messung des Farbumschlags mit anschließender Bestimmung der ATP-Menge im Zelllysat, anhand der Eichkurve, unter Berücksichtigung des Proteingehalts der entsprechenden Zellsuspension. (HCT116: n = 6; MCF-7: n = 5)

4.4 pAMP- und AMP-Kinase

Die Zelle reagiert auf ATP-Erniedrigung durch die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) durch Phosphorylierung. Beide Zelllinien wurden mit Normoxie oder Hypoxie und/ bzw. 15 mM DCA behandelt. Anschließend wurde die Proteinabundanz der AMP-Kinase und ihrer aktiven, an Thr172-phosphorylierten, Form (pAMP-Kinase; pAMPK) mittels Western Blot bestimmt (Abb. 8 und 9). Bei beiden Zelllinien kam es zu einem tendenziellen Anstieg der AMP-Kinase-Aktivität unter Hypoxie ausschließlich bei gleichzeitiger DCA-Behandlung. Unter alleiniger Hypoxie- und alleiniger DCA-Behandlung änderte sich die Proteinabundanz der pAMPK nicht (Abb. 8 und 9). Bei beiden Zelllinien war keine Veränderung des Gesamtproteins der AMP-Kinase in Abhängigkeit der vier Behandlungsarme zu beobachten (Abb. 8 und 9).

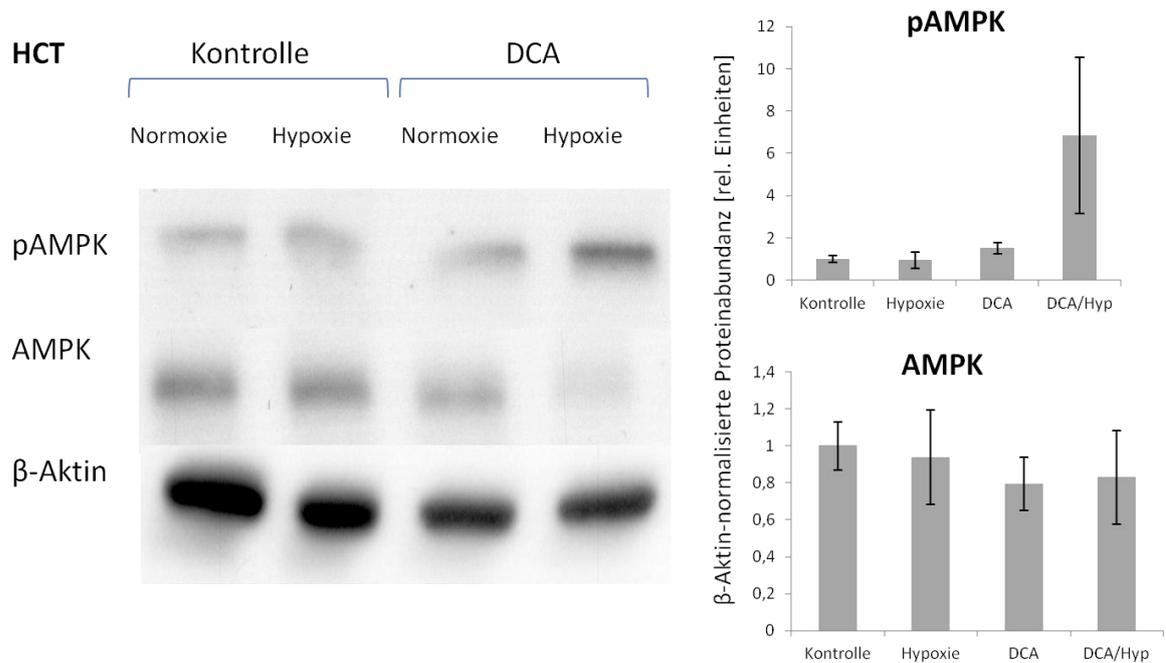


Abbildung 8: pAMPK- und AMPK-Proteinabundanz in HCT116-Zellen. Links: AMPK-Kinase und pAMPK-Kinase Western Blots (oben) mit β-Aktin Ladungskontrolle. Rechts: mittlere semiquantifizierte und β-Aktin-normalisierte AMPK-Kinase und pAMPK-Kinase-Proteinmenge (pAMPK: n = 6, AMPK: n = 9).

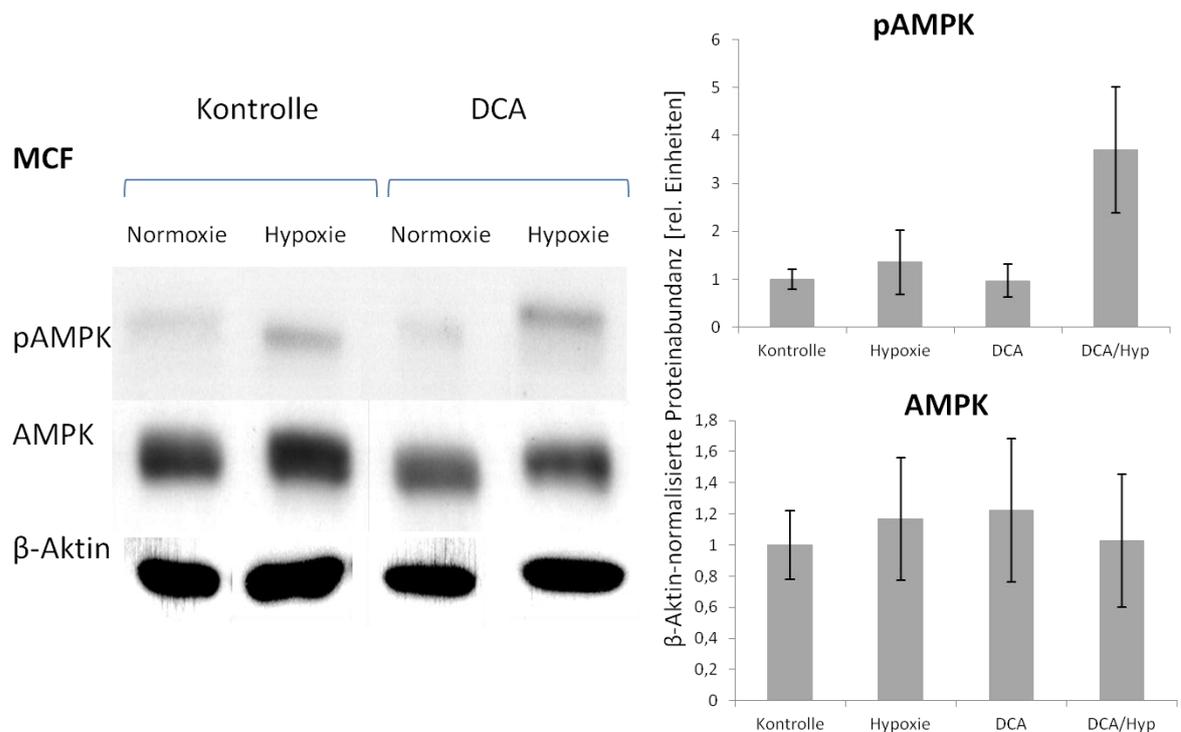


Abbildung 9: pAMPK- und AMPK-Proteinabundanz in MCF-7-Zellen. Links: AMPK-Kinase und pAMPK-Kinase Westernblots (oben) mit β-Aktin Ladungskontrolle. Rechts: mittlere semiquantifizierte und β-Aktin-normalisierte AMPK-Kinase und pAMPK-Kinase-Proteinmenge (pAMPK: n = 6, AMPK: n = 7)

4.5 TMRE

Zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\psi_m$) der einzelnen Tumorzelllinien wurde Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) verwendet. Die Zellen wurden mit Hypoxie/Normoxie und aufsteigenden DCA-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden ihre Fluoreszenzeigenschaften mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Durch TMRE ist eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich, da sich eine Zunahme toter Zellen durch ein Zusammenbrechen des $\Delta\psi_m$ und einer daraus folgenden Abschwächung der Fluoreszenz zeigt (Abb. 10 und 11).

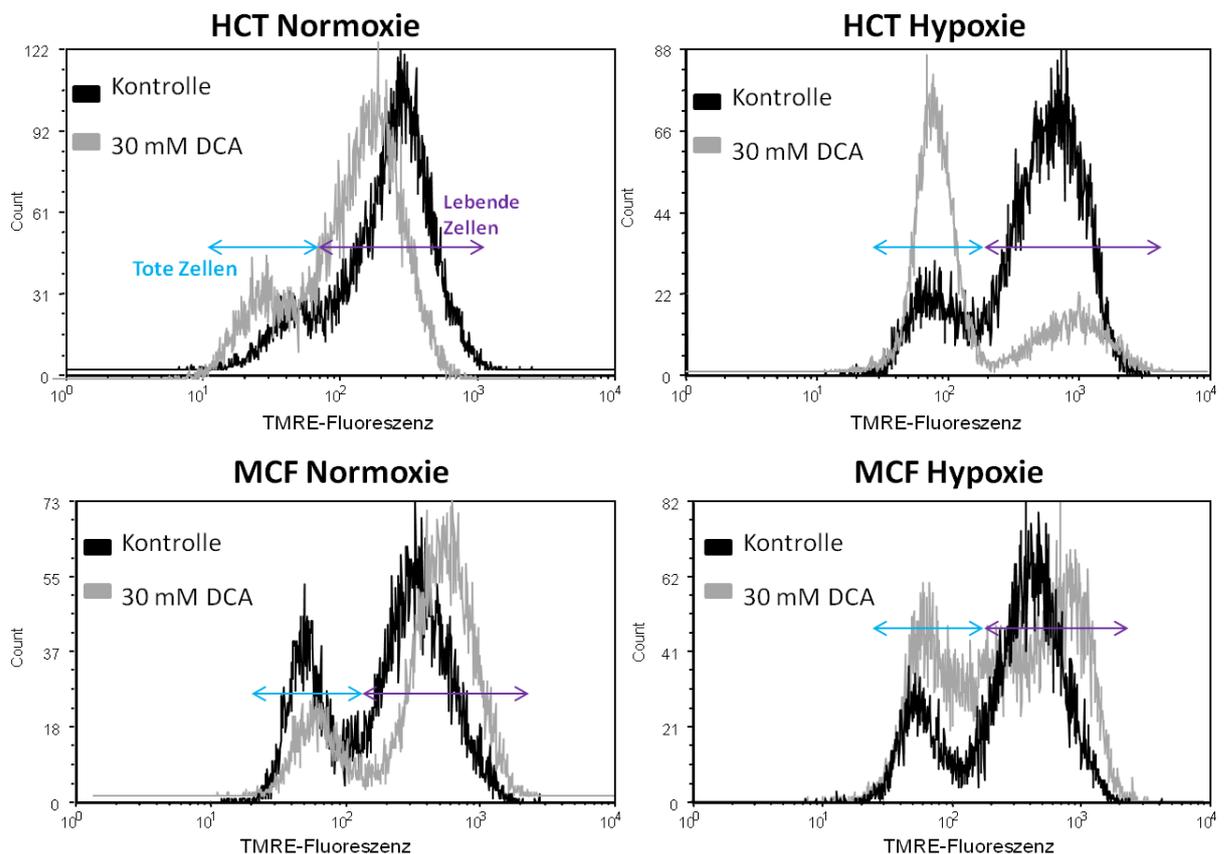


Abbildung 10: Mitochondriales Membranpotential. Repräsentative Durchflusszytometrie-Histogramme der TMRE-Fluoreszenz von HCT116- (oben) und MCF-7-Zellen (unten) aufgenommen unter Normoxie (links) und Hypoxie (rechts) nach Behandlung mit 0 mM (Kontrolle, schwarz) und 30 mM DCA (graue; türkise und violette Pfeile zeigen tote Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\psi_m$ bzw. lebende Zellen mit physiologischem $\Delta\psi_m$ an).

DCA hatte bei den HCT116-Zellen unter Normoxie (graue Linien) keine Auswirkungen auf den Zelltod (Abb. 11A) und das $\Delta\psi_m$ der überlebenden Zellen (Abb. 11B). Bei Hypoxie (schwarze Linien) bewirkte DCA (Konzentration ≥ 20 mM) dagegen ein vermehrtes Absterben. Gleichzeitig hyperpolarisierte DCA das $\Delta\psi_m$ der überlebenden Zellen tendenziell (Abb. 11B).

Steigende DCA-Konzentrationen bewirkten bei den MCF-7-Tumorzellen unter Normoxie (Abb. 11C, graue Linie) tendenziell eine Erniedrigung, unter Hypoxie (schwarze Linie) dagegen eine Erhöhung des Zelltods (zusammengebrochenes $\Delta\psi_m$). DCA hatte, unter Norm- und Hypoxie, keine Auswirkungen auf die $\Delta\psi_m$ -Spannung bei den überlebenden MCF-7-Zellen (Abb. 11D).

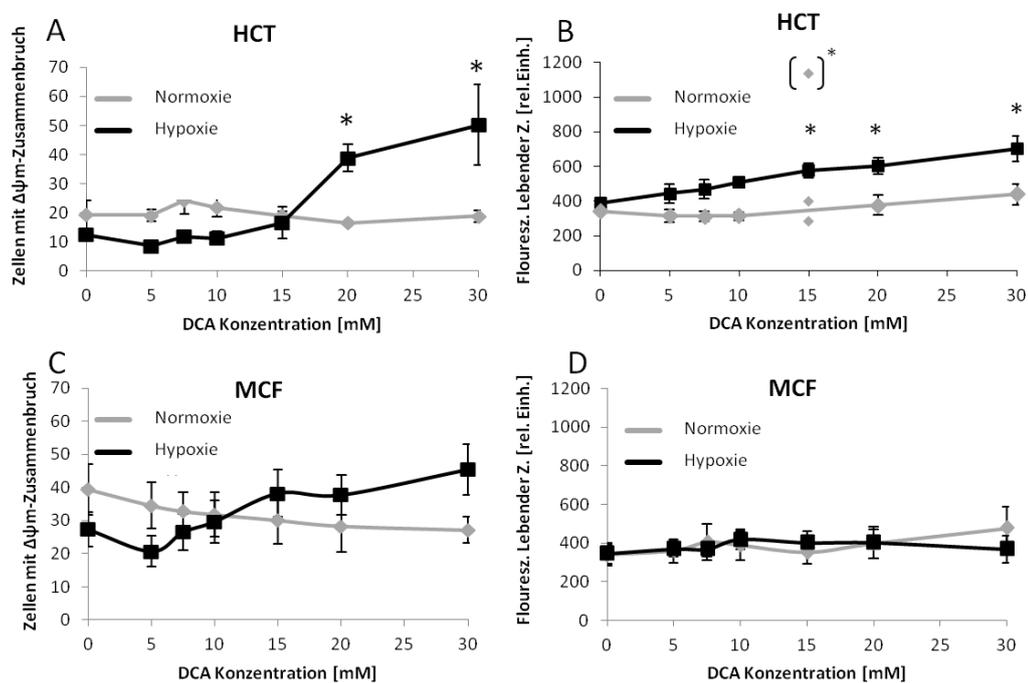


Abbildung 11: Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials beider Zelllinien bei steigender DCA-Konzentration unter Normo- und Hypoxie. A und C: Anzahl der toten Zellen mit zusammengebrochenem $\Delta\psi_m$. B und D: TMRE-Fluoreszenz-Intensität der überlebenden Zellen als Maß der $\Delta\psi_m$ -Spannung.

(HCT116:n = 3; MCF-7: n = 4). *: $p \leq 0.05$, t-Test; []* = hoher Ausreißerwert der nicht berücksichtigt wurde.

4.6 Nicoletti

Mittels Nicolettifärbung wurde der DNS-Gehalt der Zellen und somit ihre Zellzyklusphase, sowie der Anteil der abgestorbenen Zellen (Sub-G1-Population) im Durchflusszytometer bestimmt.

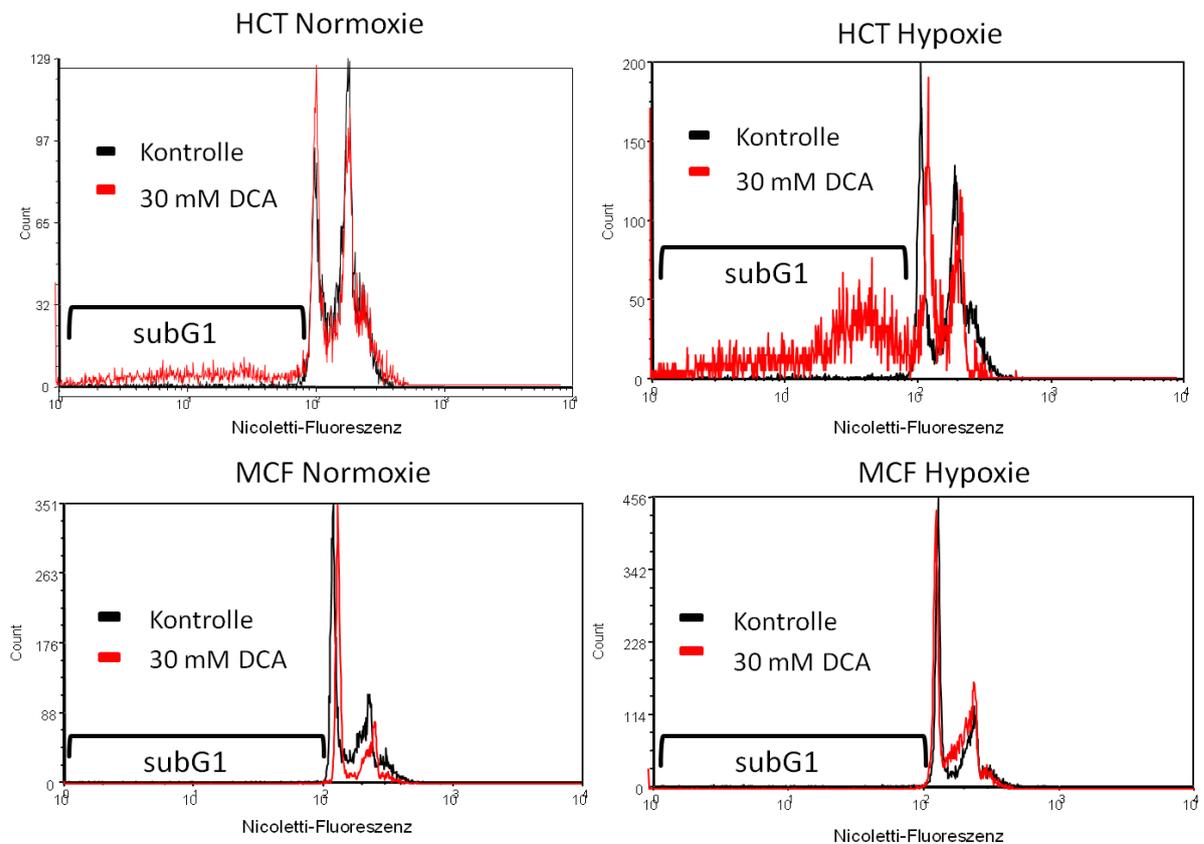


Abbildung 12: Veränderungen im Zellzyklus beider Zelllinien unter Hypoxie und Normoxie und unter DCA-Behandlung. Repräsentative Durchflusszytometrie-Histogramme der Propidiumiodid-Fluoreszenz von HCT116- (oben) und MCF-7-Zellen (unten), aufgenommen unter Normoxie (links) und Hypoxie (rechts) nach Behandlung mit 0 mM (Kontrolle, schwarz) und 30 mM DCA (rot); der Marker zeigt die toten Zellen in der Sub-G1-Population.

Bei den HCT116-Zellen kam es bei steigender DCA- Konzentration, sowohl unter Normoxie als auch in Hypoxie, zu einem tendenziellen Anstieg der Sub-G1-Fraktion (Abb. 12 und 13). Besonders ausgeprägt war dieser Anstieg in Hypoxie, wobei die Anzahl der toten Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, fast um das 30-fache anstieg.

Bei den apoptose-resistenten MCF-7-Tumorzellen war - wie zu erwarten - in der Sub-G1-Fraktion, weder unter Hypoxie- noch unter alleiniger DCA-Behandlung, ein signifikanter Anstieg zu erkennen (Abb. 13).

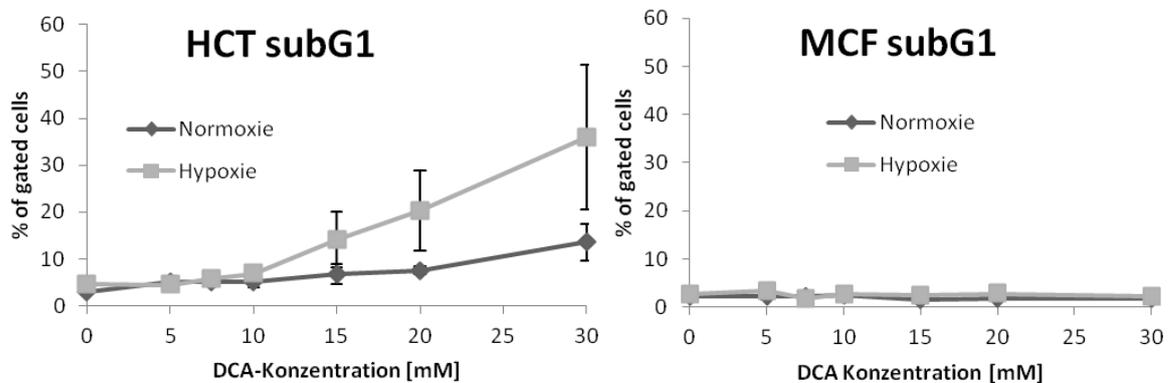


Abbildung 13: Veränderung der Sub-G1-Fraktion bei steigender DCA-Konzentration unter Normoxie und Hypoxie bei beiden Zelllinien. Abgebildet ist die Anzahl der Zellen in der Sub-G1-Phase als %-Satz der insgesamt gemessenen Zellen. (HCT116: n = 3; MCF-7: n = 5)

Die Zellzyklusanalysen ergaben, dass sich die HCT116-Zellen unter Normoxie zu etwa 40 % in G1- und S-Phase und 40 % in der G2-Phase befanden (Abb. 14A), wie es bei sehr stark proliferierenden Zellen zu beobachten ist. Unter Hypoxie erniedrigte bzw. erhöhte sich die G1- bzw. G2-Population, was auf einen hypoxieinduzierten G1-Arrest hindeutet (Abb. 14B). Steigende DCA-Konzentrationen induzierten keine signifikanten Änderungen im Verhältnis der einzelnen Zellzyklusphasen.

Bei der MCF-7-Zelllinie waren die meisten Zellen in der G1-Phase. Hypoxie und DCA änderten wenig am Verhältnis der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen (Abb. 14C und D). Einzig die S-Phasenpopulation erniedrigte sich bei hohen DCA-Konzentrationen unter Normoxie (Abb. 14C), während sie sich unter Hypoxie erhöhte (Abb. 14D). Dies deutet auf einen DCA-vermittelten G1-Arrest unter Normoxie und S-Arrest unter Hypoxie hin.

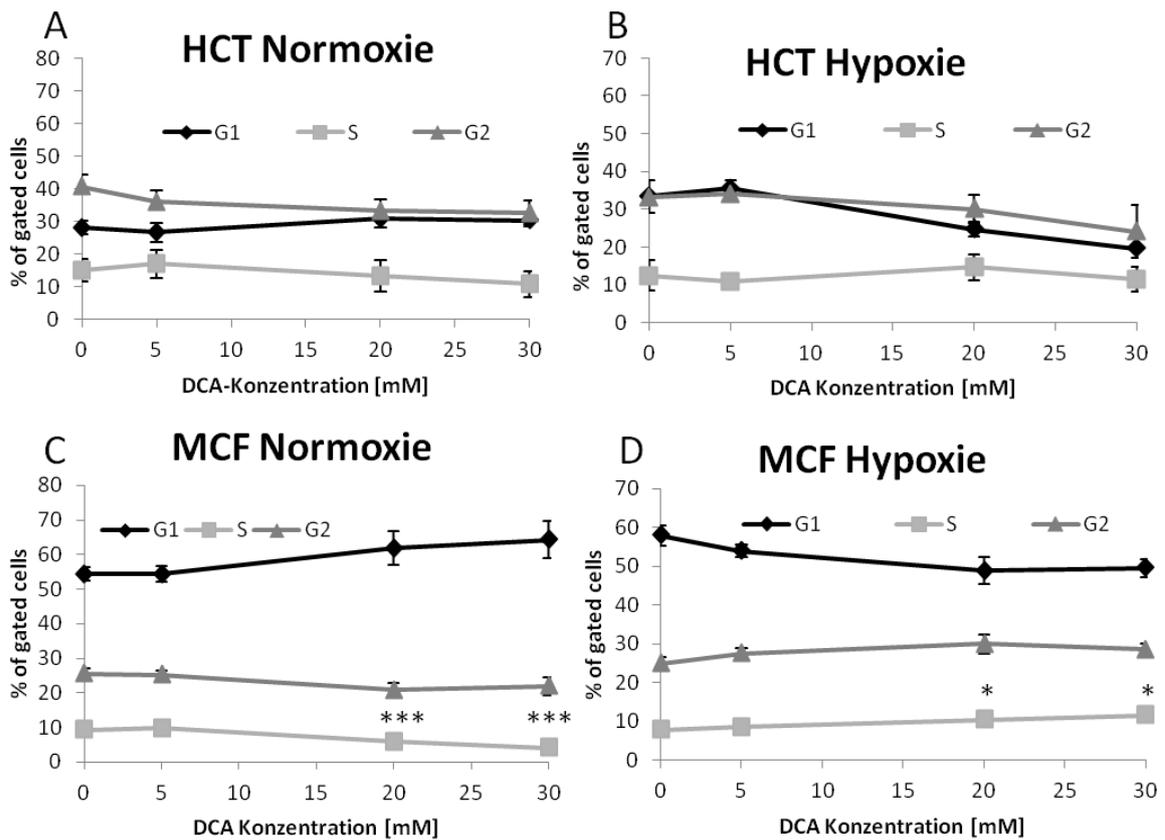


Abbildung 14: Veränderungen im Zellzyklus unter DCA- und Hypoxiebehandlung. Abgebildet ist die Anzahl der Zellen in den einzelnen Zellphasen als %-Satz der insgesamt gemessenen Zellen (HCT116: n = 3; MCF-7: n = 6; ***p ≤ 0,01, * p ≤ 0,05; t-Test).

4.7 Annexin- und Propidiumiodidmessung

Durch die durchflusszytometrische Messung der Bindung von Phosphatidylserin (PS) durch Annexin-V und durch die Bestimmung der Zellmembrandurchlässigkeit mit Propidiumiodid, ist es möglich, apoptotische von nekrotischen Zellen zu unterscheiden und ihre Anzahl festzustellen (Abb. 15). Die Zellen wurden unter Hypoxie mit aufsteigenden DCA-Konzentrationen behandelt; anschließend wurde die Anzahl der apoptotischen und nekrotischen Zellen mittels Durchflusszytometer bestimmt.

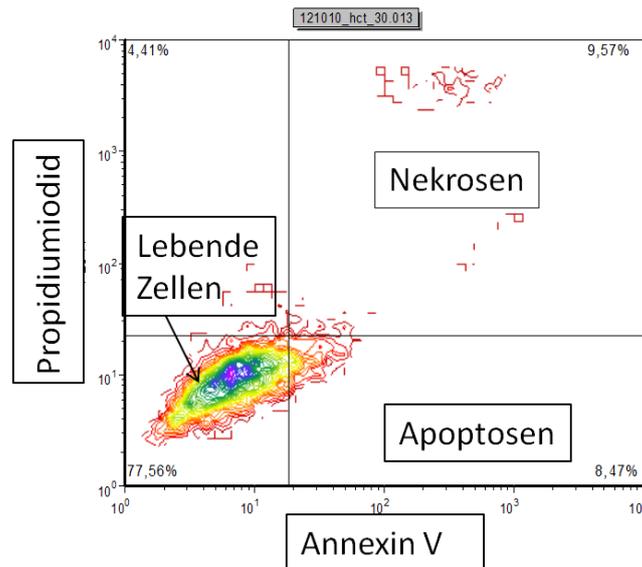


Abbildung 15: Darstellung der fluoreszenzbasierten Einteilung der einzelnen Zellzustände. Nekrotische Zellen kommen im rechten oberen Quadranten zur Darstellung und sind dementsprechend Annexin- und Propidiumiodid-positiv, während apoptotische Zellen nur Annexin-positiv sind und im rechten unteren Quadranten abgebildet werden. Die lebenden Zellen (Annexin- und Propidiumiodid-negativ) werden im linken unteren Quadranten sichtbar.

DCA induzierte in HCT116-Zellen bei Hypoxie, nicht aber bei Normoxie signifikant mehr Nekrosen (Abb. 16A, schwarze Linie) und Apoptosen (Abb. 16B, schwarze Linie). Ebenfalls unter Hypoxie bewirkte DCA mit steigender Konzentration einen signifikanten Anstieg der apoptotischen HCT116-Zellen (Abb. 16B, schwarze Linie).

Unter Normoxie bewirkten steigende DCA-Konzentrationen bei den Apoptose-resistenten MCF-7-Zellen eine signifikante Abnahme der Zellnekrosen, die in diesen Experimenten schon unter Kontrollbedingungen auffallend hoch waren (Abb. 16C, graue Linie).

Auch unter Hypoxie, bei der, bezogen auf Normoxie, basal nur etwa halb so viele Zellnekrosen auftraten, bewirkte DCA nur in niedrigen Konzentrationen eine weitere signifikante Verminderung der Zellnekrosen. DCA hatte weder unter Normoxie noch unter Hypoxie Auswirkung auf den Anteil der apoptotischen MCF-7 Zellen (Abb. 16D). In den Kontrollen vorliegende

Nekrosen sanken bis zur DCA-Konzentration von 15 mM signifikant ab (t-Test: p-Werte $\leq 0,05$ *), wobei allerdings die Anzahl der Nekrosen in Hypoxie von 0 mM bis zu einer Konzentration von 15 mM signifikant kleiner war als unter Normoxie (p-Werte im t-Test $\leq 0,01$ ***) (Abb. 16C).

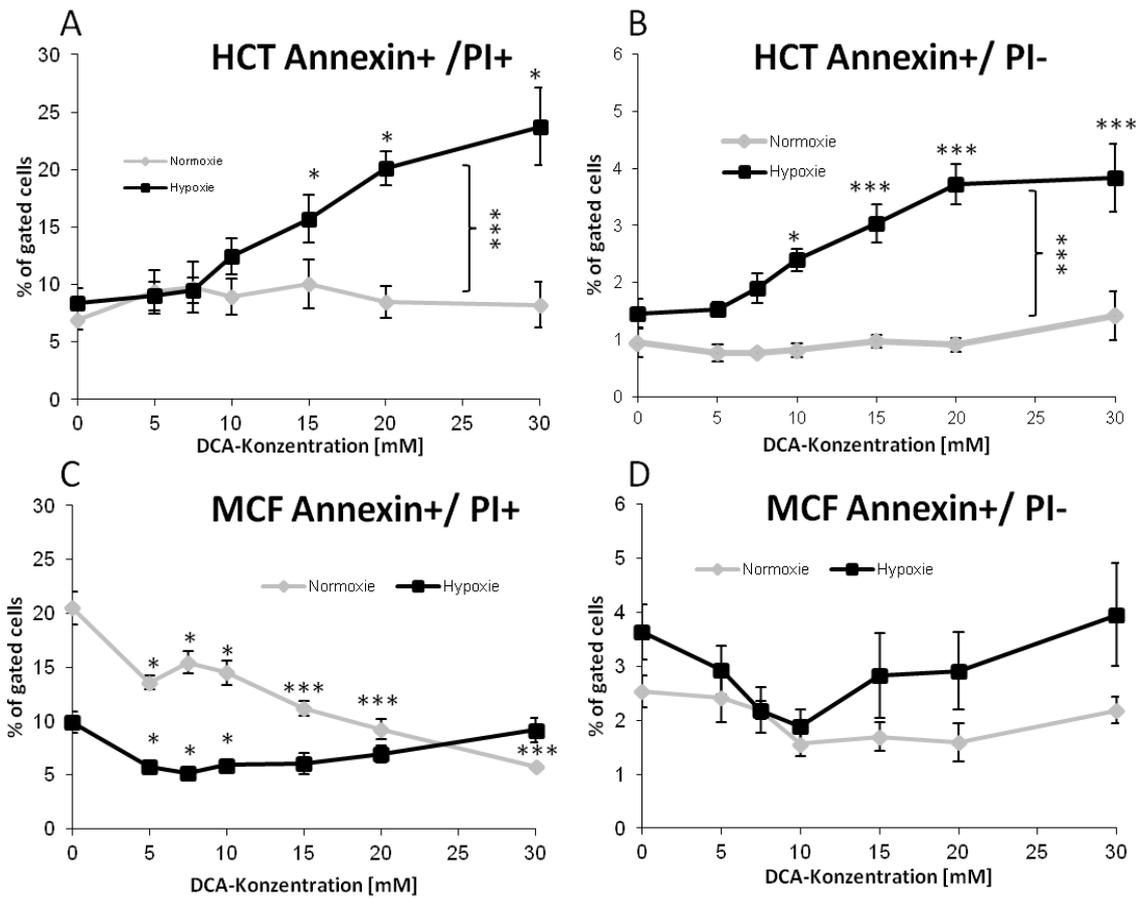


Abbildung 16 : Veränderungen im Annexin- und Propidiumiodidfärbeverhalten beider Tumorzelllinien. Abgebildet ist die Anzahl der Zellen in den einzelnen Zellphasen als %-Satz der insgesamt gemessenen Zellen. (HCT116: n = 6; MCF-7: n = 4 * p $\leq 0,05$ ***p $\leq 0,01$, t-Test)

4.8 Koloniebildungstests

Zuletzt wurde die Auswirkung der DCA- und Hypoxie-Behandlung auf das klonogene Überleben der Tumorzellen mithilfe des Koloniebildungstests bestimmt. Bei beiden Zelllinien ergab sich unter Normoxie bei steigender DCA-Konzentration keine signifikante Veränderung der Survival Fraktion (SF). Erst durch die Kombination von DCA unter Hypoxie sank die SF signifikant ab (Abbildung 17).

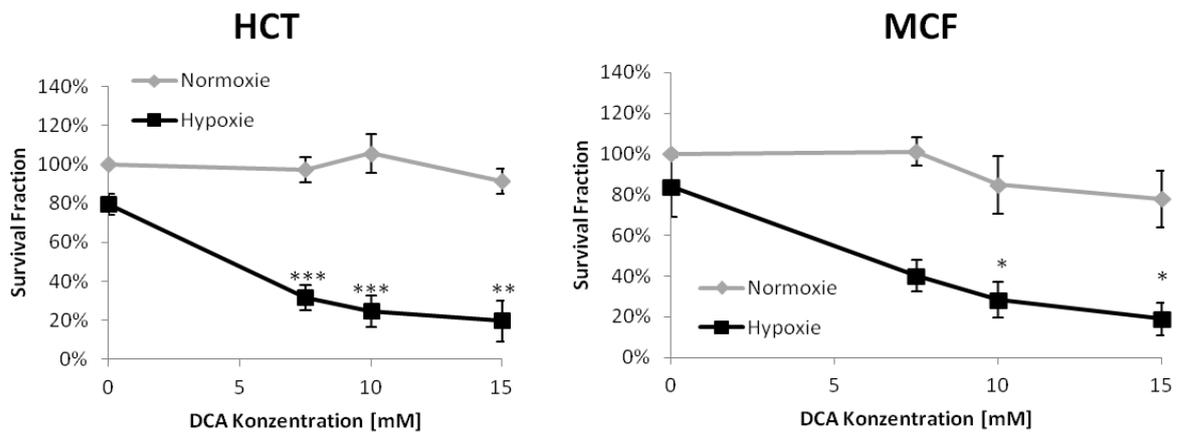


Abbildung 17: Darstellung der prozentuellen Anzahl der Koloniebildung bei beiden Zelllinien bezogen auf die Kontrollen mit 100 % Survival Fraction. (n = 3, *p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,02; * p ≤ 0,01; t-Test)**

5. Diskussion

Tumorzellen bevorzugen die Glykolyse zur ATP-Produktion und haben so den Vorteil eines anaeroben Stoffwechsels, der ihnen Proliferation auch ohne optimale Sauerstoffversorgung ermöglicht. Auch unter Normoxie weisen viele Tumorzellen einen glykolytischen Phänotyp auf (Warburg-Effekt) und zeigen damit verbunden einen erhöhten Glukoseverbrauch (Semenza et al. 2001) zum Ausgleich der geringen ATP-Produktion durch die anaerobe Glykolyse (Warburg 1956) und eine vermehrte Laktatproduktion im Vergleich zu Nicht-Tumorzellen (Brizel et al. 2001). Damit verbunden ist eine vermehrte Glukoseaufnahme (Michelakis et al. 2008), die unter Hypoxie noch gesteigert wird (Sanford und Westfall 1969).

DCA kann beschriebenermaßen in diesen tumorzelltypischen Stoffwechsel durch die Hemmung der Pyruvatdehydrogenasekinase (PDK) (Stacpoole 1989) dahingehend eingreifen, dass es die Tumorzellen in die oxidative Phosphorylierung zwingt (Bonnet et al. 2007; Shen et al. 2013).

Die hier untersuchten Tumorzellen zeigten, entgegen dieser Erwartungen, unter DCA-Behandlung keine signifikante Abnahme im Glukoseverbrauch und der Laktatproduktion. Eine mögliche Ursache dieser unerwarteten Ergebnisse könnte sein, dass die verwendete Messmethode zu unsensitiv war. Studien, die alternative Glukose-Bestimmungsmethoden (Oxidase Assay Kit (Hur et al. 2013)) oder PET (Michelakis et al. 2008) verwendeten, konnten, im Gegensatz zu der vorliegenden Doktorarbeit, Effekte von DCA auf den Glukoseverbrauch zeigen. Leider konnten diese Messmethoden hier nicht angewendet werden. Eine weitere Arbeit an SutEMT6-Zellen (Mamma-Karzinom der Maus), konnte unter Verwendung eines Standard-Kits (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) und unter Nutzung der Glukose-Oxidase-Reaktion, ebenfalls keine DCA-induzierte Änderung der Glukose-Aufnahme unter Hypoxie zeigen (Shrieve et al. 1983).

Daraus ergibt sich, dass sich der DCA-Effekt möglicherweise stark zwischen den einzelnen Zelllinien unterscheidet oder die Effekte so gering sind, dass sie nur mit sensitiveren Methoden nachgewiesen werden können.

Bei beiden untersuchten Zelllinien war unter der DCA-Behandlung unter Normoxie nur tendenziell ein Absinken des Mediumlaktatgehaltes erkennbar. Frühere Studien konnten dagegen deutlich zeigen, dass DCA unter Normoxie die Laktatproduktion in Tumorzellen hemmt: Auch hier könnte die Diskrepanz zu den publizierten Daten Folge der fehlenden Messsensitivität sein. Zudem streuten die individuellen Proben sehr stark.

Zusammenfassend konnte in dieser Doktorarbeit durch die Behandlung mit DCA, auch in hoher Konzentration, kein Effekt auf den Tumorstoffwechsel nachgewiesen werden

Ein weiterer Überlebensvorteil der Tumorzellen ist, neben der Umstellung auf einen anaeroben glykolytischen Phänotyp, die Überexpression von HIF-1 α . Und das auch schon unter Normoxie (Aebersold et al. 2001; Semenza et al. 2002). Hierdurch werden die Tumorzellen an eine hypoxische Umgebung präadaptiert. Hypoxie wiederum kann zu Therapie- (Aebersold et al. 2001; Semenza et al. 2002) und Apoptoseresistenz (Harris 2002) (wie in der Einleitung detailliert beschrieben) führen.

In der vorliegenden Arbeit interessierte die Auswirkung der DCA-Therapie auf die HIF-1 α Expression der Tumorzellen, da durch die Reduktion von HIF-1 α , speziell unter Hypoxie, den Tumorzellen ein wichtiger Anpassungsfaktor an den Sauerstoffmangel genommen wird. DCA bewirkte dabei unter Hypoxie ein nicht signifikantes Absinken von HIF-1 α in beiden Zelllinien. Ebenfalls bei beiden Zelllinien zeigte sich ein, aufgrund der hohen Streuung, nicht-signifikanter Anstieg der HIF-1 α -Abundanz unter Hypoxie, der bei gleichzeitiger DCA-Gabe wieder absank. Allerdings erreichte er nie das niedrige Niveau der Kontrollwerte. In früheren Studien wurde die Reduktion der HIF-1 α -Abundanz durch DCA auch unter Normoxie in vitro (Sun et al. 2011) und in vivo (Michelakis et al. 2010; Sutendra et al. 2013) nachgewiesen. Auch wenn in dieser Doktorarbeit DCA die HIF-1 α -Abundanz unter Hypoxie nicht signifikant

gesenkt hat, so lässt sich doch aus den Tendenzen in beiden Linien spekulieren, dass DCA einen Einfluss auf die HIF-1 α -Stabilität in HCT116- und MCF-7-Zellen haben könnte. Generell wäre dann eine Destabilisierung von HIF-1 α durch DCA in diesen Tumoren, die ab einer bestimmten Größe hypoxische Areale aufweisen, ein Überlebensnachteil, dadurch bedingt, dass HIF-1 α in Tumorzellen die VEGF-Expression steigert und somit die Angiogenese des Tumors fördern kann. Auch kann HIF-1 α zu einem Anstieg glykolytischer Enzyme führen (z.B. der PDK) und so die anaerobe Glykolyse in der Tumorzelle unterstützen (Michelakis 2010; Duan et al. 2013). Dies ermöglicht der Tumorzelle eine sauerstoffunabhängige ATP-Produktion.

Doch wie wirkt DCA in Hypoxie auf den Energiehaushalt der Tumorzellen? Hier zeigte sich, in der vorliegenden Doktorarbeit, bei beiden Zelllinien kein Absinken der ATP-Konzentration durch Hypoxie. Daraus lässt sich schließen, dass beide Zelllinien entweder schon anaerobe Glykolyse bereits unter Normoxie betreiben oder sehr gut auf die anaerobe Glykolyse umschalten können.

In beiden Zelllinien erhöhte DCA tendenziell die ATP-Konzentration in den Tumorzellen. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Studien, bei denen, ebenfalls unter der Therapie mit DCA, die ATP-Konzentration der Tumorzellen deutlich anstieg (Sun et al. 2011; Shen et al. 2013). Dies weist auf eine höhere Energieausbeute bei DCA-erzwungener oxidativer Phosphorylierung hin (Sun et al. 2011).

Wurden in dieser Doktorarbeit die Tumorzellen gleichzeitig mit DCA und Hypoxie behandelt, sank bei den HCT116-Zellen die ATP-Menge signifikant, bei den MCF 7-Zellen zumindest tendenziell ab. In HCT116-Zellen war dabei die ATP-Konzentrationen unter DCA und Hypoxie in der Tendenz niedriger als bei Hypoxie alleine (Abb. 7). Eine frühere Arbeit (Anderson et al. 2009) konnte an HeLa- und PANC-1- Zellen eine deutliche Absenkung der ATP-Konzentrationen unter Hypoxie durch DCA feststellen, wodurch in dieser früheren Arbeit auf eine

DCA-vermittelte Hemmung der anaeroben Glykolyse geschlossen werden konnte.

Mit einer zweiten, indirekten Methode, konnte in der vorliegenden Doktorarbeit die Wirkung von DCA auf den Energiehaushalt der Zelle weiter verdeutlicht werden. Energiemangel führt zu einem Anstieg von Adenosinmonophosphat (AMP) (Hardie et al. 1998). AMP aktiviert die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), die ATP-verbrauchende Prozesse innerhalb der Zelle stoppt und die ATP-Produktion anregt (Corton et al. 1994; Hardie et al. 1998). Die aktivierte AMPK, also die phosphorylierte AMPK (pAMPK), stimuliert die Fettsäureoxidation und die Glukoseaufnahme in Muskelzellen (Merrill et al. 1997; Bergeron et al. 1999). Auch reduziert sie die Glukosesynthese in Leberzellen (Woods et al. 2000). In der vorliegenden Doktorarbeit steigerte DCA unter Hypoxie die Aktivität der AMP-Kinase (auch hier war der Anstieg des phosphorylierten, aktiven Proteins wegen der hohen Streuung zwischen den biologischen Replikaten nicht signifikant). In Kombination mit den ATP-Messungen könnte somit DCA unter Hypoxie die Tumorzellen in die Energiekrise führen.

Für Tumorzellen wurde, im Vergleich zu normalen Zellen, ein hyperpolarisiertes mitochondriales Membranpotential ($\Delta\psi_m$) beschrieben (Bonnet et al. 2007). Dies kann möglicherweise zu einer Apoptoseresistenz der Tumorzellen führen, indem die Öffnungsschwelle des Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPT) angehoben wird (Zamzami und Kroemer 2001). DCA kann den Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ induzieren (Stockwin et al. 2010) (Bonnet et al. 2007) (Zamzami und Kroemer 2001) und somit Apoptose initiieren. In der vorliegenden Doktorarbeit konnte bei den HCT116- und MCF-7-Tumorzellen ein signifikanter bzw. tendenzieller DCA-vermittelter $\Delta\psi_m$ -Zusammenbruch (und damit Zelltod) unter Hypoxie beobachtet werden. Gleichzeitig hyperpolarisierte in HCT116-Zellen DCA das $\Delta\psi_m$ der überlebenden Zellen, wodurch auf einen vermehrten Elektronentransport der Atmungskette geschlossen werden kann.

Ein weiterer Marker des Zelltodes, die SubG1-Population Propidiumiodid-gefärbter Zellen, wurde in der HCT116-Linie unter Hypoxie durch DCA erhöht. In den Apoptose-defizienten MCF-7-Zellen war - wie zu erwarten (Stockwin et al. 2010) - keine DCA-vermittelte Erhöhung der SubG1-Population messbar. Aus den $\Delta\psi_m$ - und SubG1-Daten lässt sich folglich schließen, dass DCA unter Hypoxie die HCT116-, nicht aber die Apoptose-resistenten MCF-7-, Tumorzellen abtöten kann.

Gleichzeitig wurde über die Propidiumiodidfärbung der Zellzyklus der Zellen bestimmt. Neben einem hypoxieinduzierten G1-Arrest in HCT116-Zellen konnten dabei keine starken Änderungen in den Zellzyklusphasen durch DCA beobachtet werden, außer ein leichter DCA-vermittelter G1-Arrest bei MCF-7-Zellen unter Normoxie und S-Arrest unter Hypoxie. Dies deutet auf einen geringen Einfluss von DCA-induzierten Prozessen auf die Zellzyklusregulation hin. Im Gegensatz dazu zeigten mehrere frühere Studien einen DCA-vermittelten Zellzyklusarrest in verschiedenen Tumormodellen (Wong et al. 2008; Sanchez 2013; Madhok 2010), wobei je nach p53-Status G1- oder G2-Arreste auftraten.

Auch bei der Apoptose- und Nekroseinduktion zeigte sich, in der vorliegenden Doktorarbeit, wie aus den $\Delta\psi_m$ - und SubG1-Daten zu erwarten, unter Normoxie kein Effekt von DCA auf HCT116-Zellen. Die fehlende Apoptoseinduktion von DCA wurde bereits an HCT116-Zellen anderer Linien beschrieben (Stockwin et al. 2010). Allerdings konnte eine der initiiierenden DCA-Studien (Bonnet et al., 2007) Apoptoseinduktion durch DCA unter Normoxie zeigen. In MCF-7-Zellen bewirkte DCA in der vorliegenden Doktorarbeit eine Abnahme der nekrotischen Zellen, was derzeit nicht interpretiert werden kann.

DCA induzierte bei HCT116 - nicht aber MCF-7-Zellen - unter Hypoxie Nekrosen und Apoptosen, wobei zahlenmäßig die nekrotischen Zellen überwogen. Ein vorrangiges Absterben durch Nekrose nach DCA-Behandlung konnte auch in anderen Modellen gezeigt werden (Liu et al. 2012; Bull et al. 1990). Wiederum erniedrigte in der vorliegenden Doktorarbeit DCA (bei

Konzentrationen bis 10 mM) auch unter Hypoxie die Anzahl nekrotischer MCF-7-Zellen.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die MCF-7-Zellen auf die DCA-Behandlung eher mit einem Proliferationsstop (der aus dem beobachteten Zellzyklusarrest resultierte) reagieren. Auch frühere Studien zeigten einen Proliferationsstop der MCF-7 Zellen (allerdings unter Normoxie) ohne Apoptose-/Nekroseinduktion bei DCA-Therapie (Stockwin et al. 2010; Krohn et al. 1999).

In der Tumorbiologie ist der für die Klinik entscheidende Messparameter das klonogene Überleben. Beide Zelllinien zeigten, in der vorliegenden Doktorarbeit, nach DCA-Behandlung keine reduzierte Survival Fraction (SF) unter Normoxie. Somit verringerte DCA nicht die Klonogenizität, also die Fähigkeit der Tumorzellen neue Tumoren zu initiieren. Erst unter Hypoxie sank die SF bei beiden Zelllinien signifikant nach DCA-Gabe ab.

Die Daten lassen sich derart zusammenfassen, dass DCA bei den beiden untersuchten Tumorzelllinien unter Normoxie keine Effekte erzielte. Selbst in extrem hohen - und damit pharmakologisch irrelevanten - Konzentrationen (es werden in Studien am Patienten maximale freie Plasmakonzentrationen von 500 μmol erreicht (Michelakis et al. 2010)). Dies steht im Widerspruch zu früheren Studien, in denen auch geringere Konzentrationen Effekte an Tumorzellen unter Normoxie hatten (Bonnet et al. 2007; Duan et al. 2013; Kluza et al. 2012; Ishiguro et al. 2012).

Unter Hypoxie hatte DCA in der vorliegenden Doktorarbeit einen Anti-Tumoreffekt, allerdings wiederum bei einer pharmakologisch irrelevant hohen Konzentration. Eine einzige weitere Arbeit, die den Effekt von DCA unter Hypoxie in vitro untersucht hat, zeigte, im vollkommenen Gegensatz, sogar eine DCA-vermittelte Proliferationssteigerung (Anderson et al. 2009). So deuten die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit nicht auf einen Nutzen von DCA für die (hypoxische) Antitumor-Therapie.

6. Zusammenfassung

Dichloracetat (DCA) hemmt die Pyruvatdehydrogenasekinase und zwingt Zellen somit die oxidative Phosphorylierung von z.B. Glukose auf. Viele Tumorzellen zeigen auch unter Normoxie anaerobe Glykolyse (Warburg-Effekt), wodurch die Zellen möglicherweise Selektionsvorteile in einem, für solide Tumore typischen, intermittierend hypoxischen Mikromilieu erlangen.

Tumorhemmende Wirkungen von DCA wurden beschrieben. Die vorliegende Arbeit erweiterte diese Studien, indem sie die Hypoxie-spezifischen Effekte von DCA auf anaeroben Stoffwechsel, Energiestatus, Hypoxie-Stressantwort, Zellzyklus, apoptotischen und nekrotischen Zelltod, und das klonogene Überleben von humanen Kolonkarzinom- und Brustkrebszellen zeigt.

Unter Normoxie hatte DCA auch bei therapeutisch irrelevant hohen Konzentrationen kaum Effekte auf Stoffwechsel, Zellzyklus oder Überleben der Tumorzellen. Unter Hypoxie erniedrigte DCA zumindest tendenziell die Stabilisierung von HIF-1 α , erhöhte die Aktivität der AMP-Kinase, die Zellpopulationen mit zusammengebrochenem innermitochondrialem Membranpotential und degradierter DNS und erniedrigte das klonogene Überleben.

Diese Effekte galten für beide Tumorlinien und wurden allerdings nur mit sehr hohen DCA-Konzentrationen erreicht, sodass sich aus Sicht dieser Arbeit DCA nicht als Chemotherapeutikum empfiehlt.

7. Literaturverzeichnis

- Aebersold, D. M.; Burri, P.; Beer, K. T.; Laissue, J.; Djonov, V.; Greiner, R. H.; Semenza, G. L. (2001): Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. In: *Cancer Res.* 61 (7), S. 2911–2916.
- Aigner, K. R.; Stephens, F. O.; Vogl, T. J.; Padberg, W. (2013): Regionale Therapie maligner Tumoren: Springer-Verlag, Berlin, S.57–58.
- Anderson, K. M.; Jajeh, J.; GUINAN, P.; RUBENSTEIN, M. (2009): In vitro effects of dichloroacetate and CO₂ on hypoxic HeLa cells. In: *Anticancer Res.* 29 (11), S. 4579–4588.
- Bergeron, R.; Russell, R. R.; Young, L. H.; Ren, J. M.; Marcucci, M.; Lee, A.; Shulman, G. I. (1999): Effect of AMPK activation on muscle glucose metabolism in conscious rats. In: *Am. J. Physiol.* 276 (5 Pt 1), S. E938-44.
- Bonnet, Sébastien; Archer, Stephen L.; Allalunis-Turner, Joan; Haromy, Alois; Beaulieu, Christian; Thompson, Richard et al. (2007): A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. In: *Cancer Cell* 11 (1), S. 37–51. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.10.020.
- Brand, K. A.; Hermfisse, U. (1997): Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. In: *FASEB J.* 11 (5), S. 388–395.
- Brizel, D. M.; Schroeder, T.; Scher, R. L.; Walenta, S.; Clough, R. W.; Dewhirst, M. W.; Mueller-Klieser, W. (2001): Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. In: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 51 (2), S. 349–353.
- Bull, R. J.; Sanchez, I. M.; Nelson, M. A.; Larson, J. L.; Lansing, A. J. (1990): Liver tumor induction in B6C3F1 mice by dichloroacetate and trichloroacetate. In: *Toxicology* 63 (3), S. 341–359.
- Chen, Yijun; Cairns, Rob; Papandreou, Ioanna; Koong, Albert; Denko, Nicholas C. (2009): Oxygen consumption can regulate the growth of tumors, a new perspective on the Warburg effect. In: *PLoS ONE* 4 (9), S. e7033. DOI: 10.1371/journal.pone.0007033.
- Corton, Julia M.; Gillespie, John G.; Hardie, D.Grahame (1994): Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. In: *Current Biology* 4 (4), S. 315–324. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)00070-1.
- Di Monte DA (2003). The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol* 2(9):531-538.
- Duan, Yu; Zhao, Xin; Ren, Wei; Wang, Xin; Yu, Ke-Fu; Li, Dan et al. (2013): Antitumor activity of dichloroacetate on C6 glioma cell: in vitro and in vivo evaluation. In: *Onco Targets Ther* 6, S. 189–198. DOI: 10.2147/OTT.S40992.

- Gatenby, Robert A.; Gillies, Robert J. (2004): Why do cancers have high aerobic glycolysis? In: *Nat. Rev. Cancer* 4 (11), S. 891–899. DOI: 10.1038/nrc1478.
- Grover GJ, Marone PA, Koetzner L, Seto-Young D (2008). Energetic signalling in the control of mitochondrial F1F0 ATP synthase activity in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 40(12):2698-2701.
- Guppy, Michael; Leedman, Peter; Zu, XinLin; Russell, Victoria (2002): Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. In: *Biochem. J.* 364 (Pt 1), S. 309–315.
- Hardie, D. G.; Carling, D.; Carlson, M. (1998): The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? In: *Annu. Rev. Biochem.* 67, S. 821–855. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.821.
- Harris, Adrian L. (2002): Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. In: *Nat. Rev. Cancer* 2 (1), S. 38–47. DOI: 10.1038/nrc704.
- Huber, Stephan M.; Butz, Lena; Stegen, Benjamin; Klumpp, Dominik; Braun, Norbert; Ruth, Peter; Eckert, Franziska (2013): Ionizing radiation, ion transports, and radioresistance of cancer cells. In: *Front Physiol* 4. DOI: 10.3389/fphys.2013.00212.
- Hur, Hoon; Xuan, Yi; Kim, Young Bae; Lee, Gwang; Shim, Wooyoung; Yun, Jisoo et al. (2013): Expression of pyruvate dehydrogenase kinase-1 in gastric cancer as a potential therapeutic target. In: *Int. J. Oncol.* 42 (1), S. 44–54. DOI: 10.3892/ijo.2012.1687.
- Ishiguro, Tatsuaki; Ishiguro, Miyu; Ishiguro, Ryumei; Iwai, Sayuri (2012): Cotreatment with dichloroacetate and omeprazole exhibits a synergistic antiproliferative effect on malignant tumors. In: *Oncol Lett* 3 (3), S. 726–728. DOI: 10.3892/ol.2012.552.
- Johnson LV, Walsh ML, Bockus BJ, Chen LB (1981). Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 88(3):526-535.
- Kim, Jung-whan; Tchernyshyov, Irina; Semenza, Gregg L.; Dang, Chi V. (2006): HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. In: *Cell Metabolism* 3 (3), S. 177–185. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.02.002.
- Kluza, Jérôme; Corazao-Rozas, Paola; Touil, Yasmine; Jendoubi, Manel; Maire, Cyril; Guerreschi, Pierre et al. (2012): Inactivation of the HIF-1 α /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants. In: *Cancer Res.* 72 (19), S. 5035–5047. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0979.
- Krohn, A. J.; Wahlbrink, T.; Prehn, J. H. (1999): Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis. In: *J. Neurosci.* 19 (17), S. 7394–7404.

- Liu, Daxing; Liu, Shi; Jing, Xiabin; Li, Xiaoyuan; Li, Wenliang; Huang, Yubin (2012): Necrosis of cervical carcinoma by dichloroacetate released from electrospun polylactide mats. In: *Biomaterials* 33 (17), S. 4362–4369. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.062.
- Liu, Daxing; Wang, Feifei; Yue, Jun; Jing, Xiabin; Huang, Yubin (2013): Metabolism targeting therapy of dichloroacetate-loaded electrospun mats on colorectal cancer. In: *Drug Deliv.* DOI: 10.3109/10717544.2013.870258.
- Madhok, B. M.; Yeluri, S.; Perry, S. L.; Hughes, T. A.; Jayne, D. G. (2010): Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. In: *Br. J. Cancer* 102 (12), S. 1746–1752. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605701.
- Merrill, G. F.; Kurth, E. J.; Hardie, D. G.; Winder, W. W. (1997): AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. In: *Am. J. Physiol.* 273 (6 Pt 1), S. E1107-12.
- Michelakis, E. D.; Sutendra, G.; Dromparis, P.; Webster, L.; Haromy, A.; Niven, E. et al. (2010): Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. In: *Sci Transl Med* 2 (31), S. 31ra34. DOI: 10.1126/scitranslmed.3000677.
- Michelakis, E. D.; Webster, L.; Mackey, J. R. (2008): Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. In: *Br. J. Cancer* 99 (7), S. 989–994. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604554.
- Pedersen, P. L. (1978): Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. In: *Prog Exp Tumor Res* 22, S. 190–274.
- Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25(34):4633-4646.
- Robey RB HRZL (2007). Effects of the anti-tumor agent 3-bromopyruvate (3-BrPA) on glycolytic energy metabolism. *FASEB J*(21):890-896.
- Sanchez, W. Y.; McGee, S. L.; Connor, T.; Mottram, B.; Wilkinson, A.; Whitehead, J. P. et al. (2013): Dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis in multiple myeloma cells and increases sensitivity to bortezomib. In: *Br. J. Cancer* 108 (8), S. 1624–1633. DOI: 10.1038/bjc.2013.120.
- Sanford, K. K.; Westfall, B. B. (1969): Growth and glucose metabolism of high and low tumor-producing clones under aerobic and anaerobic conditions in vitro. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 42 (6), S. 953–959.
- Semenza, G. L.; Artemov, D.; Bedi, A.; Bhujwala, Z.; Chiles, K.; Feldser, D. et al. (2001): 'The metabolism of tumours': 70 years later. In: *Novartis Found. Symp.* 240, S. 251-60; discussion 260-4.
- Semenza, Gregg L. (2002): HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. In: *Trends Mol Med* 8 (4 Suppl), S. S62-7.
- Shen, Y-C; Ou, D-L; Hsu, C.; Lin, K-L; Chang, C-Y; Lin, C-Y et al. (2013): Activating oxidative phosphorylation by a pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma. In: *Br. J. Cancer* 108 (1), S. 72–81. DOI: 10.1038/bjc.2012.559.

- Shrieve, D. C.; Deen, D. F.; Harris, J. W. (1983): Effects of extreme hypoxia on the growth and viability of EMT6/SF mouse tumor cells in vitro. In: *Cancer Res.* 43 (8), S. 3521–3527.
- Stacpoole, P. W.; Henderson, G. N.; Yan, Z.; James, M. O. (1998): Clinical pharmacology and toxicology of dichloroacetate. In: *Environ Health Perspect* 106 (Suppl 4), S. 989–994.
- Stacpoole, P. W. (1989): The pharmacology of dichloroacetate. In: *Metab. Clin. Exp.* 38 (11), S. 1124–1144.
- Stockwin, Luke H.; Yu, Sherry X.; Borgel, Suzanne; Hancock, Chad; Wolfe, Tracy L.; Phillips, Lawrence R. et al. (2010): Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. In: *Int. J. Cancer* 127 (11), S. 2510–2519. DOI: 10.1002/ijc.25499.
- Sun, Ramon C.; Board, Philip G.; Blackburn, Anneke C. (2011): Targeting metabolism with arsenic trioxide and dichloroacetate in breast cancer cells. In: *Mol. Cancer* 10, S. 142. DOI: 10.1186/1476-4598-10-142.
- Sutendra, G.; Dromparis, P.; Kinnaird, A.; Stenson, T. H.; Haromy, A.; Parker, J M R et al. (2013): Mitochondrial activation by inhibition of PDKII suppresses HIF1a signaling and angiogenesis in cancer. In: *Oncogene* 32 (13), S. 1638–1650. DOI: 10.1038/onc.2012.198.
- Sutendra, Gopinath; Michelakis, Evangelos D. (2013): Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. In: *Front Oncol* 3, S. 38. DOI: 10.3389/fonc.2013.00038.
- Van Dilla, Marvin A (1985): Flow cytometry. Instrumentation and data analysis. London, Orlando: Academic Press (Analytical cytology series).
- Walenta, S.; Wetterling, M.; Lehrke, M.; Schwickert, G.; Sundfør, K.; Rofstad, E. K.; Mueller-Klieser, W. (2000): High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. In: *Cancer Res.* 60 (4), S. 916–921.
- Warburg, O. (1956): On the Origin of Cancer Cells. In: *Science* 123 (3191), S. 309–314. DOI: 10.1126/science.123.3191.309.
- Wong, Jason Y Y; Huggins, Gordon S.; Debidda, Marcella; Munshi, Nikhil C.; Vivo, Immaculata de (2008): Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. In: *Gynecol. Oncol.* 109 (3), S. 394–402. DOI: 10.1016/j.ygyno.2008.01.038.
- Woods, A.; Azzout-Marniche, D.; Foretz, M.; Stein, S. C.; Lemarchand, P.; Ferré, P. et al. (2000): Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. In: *Mol. Cell. Biol.* 20 (18), S. 6704–6711.
- Zamzami, N.; Kroemer, G. (2001): The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (1), S. 67–71. DOI: 10.1038/35048073

8. Anhang

Tabelle 1:

Kulturmedium McCoy`s 5A	PAA Laboratories GmbH; Pasching Österreich
Kulturmedium RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH; Pasching Österreich
FCS	Biochrom AG; Berlin
PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4)	
8 g NaCl	AppliChem GmbH; Darmstadt
0,2 g Kcl	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe
1,15 g Na₂HPO₄	Sigma Aldrich; St.Louis/ Steinheim
0,2 g KH₂PO₄	Sigma Aldrich; St.Louis/ Steinheim
1000 ml Aqua dest.	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe
Trypsin/ EDTA	PAA Laboratories GmbH; Pasching Österreich
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg
kleine Kulturflasche (25cm ²)	
mittlere Kulturflasche (75cm ²)	
große Kulturflasche (175cm ²)	
Kryo-Röhrchen	Eppendorf; Hamburg

Pipet Boy	Integra Biosciences AG; Zizers ; Schweiz
Brutschrank	Hera cell 240 Heraeus; Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH; Sonnenbühl-Genkingen

Tabelle 2:

Trypan blue solution (0,4 %)	Sigma Aldrich; St. Louis/ Steinheim
Mikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Neubauer Zählkammer `C-Chip´	Neubauer Improved, Korea
Pipetten	Eppendorf; Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf; Hamburg
50 ml Falcon Tubes	Becton Dickinson , NJ/ Heidelberg
Zentrifuge	Eppendorf; Hamburg

Tabelle 3:

DCA	Sodium Dichloractat; Sigma Aldrich; Steinheim/ St. Louis
Hypoxie Pack	GasPak EZ Pouch System Sachets; BD, Franklin Lakes, NJ USA
Eppendorf-Cup	Sarstedt, Nürnberg

Tabelle 7:

Annexin-/PI-Farbstoff (für 200 µl)	
196 µl Ringerlösung	Braun; Melsungen
2 µl Annexin-V-Fluos	Roche; Mannheim
2 µl Propidiumiodid (1 mg/ml Stammlösung)	Sigma Aldrich; St. Louis/ Steinheim

Tabelle 8:

Behandlung der Zellen	Kontrolle
	Kontrolle + Hypoxie
	15%iges DCA-/ Mediumgemisch
	15%iges DCA -/ Mediumgemisch + Hypoxie

Tabelle 9:

Lysepufferinhalt			
	Endkonzentration	Volumen 10ml	Firma
HEPES, pH 7,4	50mM	500µl	PAA
Triton X-100	1%	1ml	Roth
NaCl	150mM	1ml	AppliChem
NaPP	10mM	500µl	Sigma
NaF	10mM	100µl	Sigma
EDTA	1mM	10µl	Sigma
Na ₃ VO ₄	2mM	20µl	Sigma
H ₂ O		6,7ml	Roth
Aprotinin	5µg/ml	25µl	Roth
Leupeptin	5µg/ml	20µl	Roth
Pepstatin	3µg/ml	12µl	Roth
PMSF	1mM	100µl	Sigma

Tabelle 10:

Bio Rad		Bio Rad Laboratories, München
BSA		
96-Well Platte		Becton Dickinson , NJ/ Heidelberg
DTT		Sigma Aldrich; St. Louis/ Steinheim
4x SB (Laemmli Buffer)		
10 ml	20 % SDS	Merck; Darmstadt
10 ml	1 M Tris, pH 6,8	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe
10 ml	Glycerol	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe
17,5 ml	Aqua destillata	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe
2,5 ml	0,1% Bromophenol Blue	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe
		Sigma Aldrich; St. Louis/ Steinheim

Tabelle 11:

2 Trenngele	10%ig	14%ig	
Trenngelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	
Wasser destillata	12,5 ml	8,5 ml	Roth
Gel 30	10 ml	14 ml	Roth
APS	150 µl	150 µl	Roth
Temed	15 µl	15 µl	Sigma
20%SDS	150 µl	150 µl	Merck

Tabelle 12:

Trenngelpuffer (pH 8,8; für 100ml)		
18, 17g	Tris Base	Roth
4ml	SDS 10% (10g SDS + 100ml Aqua destillata)	Merck

Tabelle 13:

Sammelgelpuffer (pH 6,8; für 100ml)		
6 g	Tris Base	Roth
4 ml	SDS 10% (10g SDS + 100ml Aqua destillata)	Merck

Tabelle 14:

2 Sammelgele	
Sammelgelpuffer	1,75 ml
Aqua destillata	3,75 ml
Gel 30	1,5 ml
APS	70 µl
Temed	7 µl

Tabelle 15:

Glasplatte	Biometra GmbH; Göttingen
Abstandsstreifen	Biometra GmbH; Göttingen
Kämme	Biometra GmbH; Göttingen
Zellschaber	Sarsted Inc., Newton

Tabelle 16:

Laufapparatur	Biometra GmbH; Göttingen
Laufpuffer (Rotiphorese 10x SDS Page 1:10 mit Aqua destillata vermischt)	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe
Antriebsgerät	Biometra Standard Power Pack P25; Biometra GmbH; Göttingen
Protein Ladder	Page Ruler; Thermo Fisher; Fermentas Int. Inc; Maryland
Isopropanol	VWR Prolabo, Darmstadt

Tabelle 17:

	1. Antikörper	2. Antikörper
HIF-1α- Bestimmung	1:1000 HIF-1α - Antikörper (Active Motif; Carlsbad USA) + 5 ml 5 % Milchpulver/ TBS-Tween	1:2000 Horseradish peroxidase- conjugated Antimouse IgG +5 ml 5 % Milchpulver/ TBS-Tween
Pampk/ Ampk- Bestimmung	1:1000 PAMPK/ AMPK - Antikörper (Cell Signaling Technology, Inc.; Danvers USA) + 5 ml 5 % Milchpulver/ TBS-Tween	1:2000 Horseradish peroxidase- conjugated Antirabbit IgG + 5 ml 5 % Milchpulver/ TBS-Tween
β-Aktin-Bestimmung	1:20 000 β-Aktin - Antikörper (Sigma Aldrich; St. Louis/ Steinheim) + 5 ml 5 % BSA/ TBS- Tween	1:2000 horseradish peroxidase- conjugated Antimouse IgG + 5 ml 5 % BSA/ TBS- Tween

Tabelle 18:

Belichtungszeiten	
AMPK/ PAMPK	100 – 150 min
HIF-1 α	60 – 120 min
β -Aktin	20 – 60 sec

Tabelle 19:

TBS Tween (pH 8)		
1,57 g	Tris-HCl 10 mM	Sigma Aldrich; St. Louis/ Steinheim
8,76 g	NaCl 150 mM	AppliChem GmbH; Darmstadt
1 ml	Tween 20	AppliChem GmbH; Darmstadt
Blotpuffer		
15,15 g	Trizma Base	Sigma Aldrich; St. Louis/ Steinheim
72 g	Glycin	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe
1000 ml	Isopropanol	VWR Prolabo, Darmstadt
4000 ml	Aqua destillata	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe

Tabelle 20:

Haltevorrichtung	Bio Rad Laboratories, München
Schwämme	Bio Rad Laboratories, München
Filterpapier	Bio Rad Laboratories, München
Polyvinylidenfluorid-Membran	Millipore Corporation; Billerica USA
Blotkammer	Bio Rad Trans Blot Cell; Bio Rad Laboratories, München
Antriebsgerät	Bio Rad Power Pax 200: Bio Rad Laboratories, München
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co KG; Karlsruhe
Schüttler	Biometra
Reagenz 1 und 2	GE Healthcare UK Ltd. Buckinghamshire, UK

Autoradiographie Kassette	Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare UK Ltd. Buckinghamshire, UK
Entwickler	Curix 60 AGFA; Agfa HealthCare Corporation, Greenville USA
Entwicklerpapier	Amersham Hyperfilm ECL; GE Healthcare UK Ltd. Buckinghamshire, UK
Scanner	Hewlett Packard Scan Jet; Hewlett-Packard GmbH, Böblingen

Tabelle 21:

	Behandlung
Kontrolle	4 ml des entsprechenden Mediums
Kontrolle + Hypoxie	4 ml des entsprechenden Mediums + in Hypoxie-Pack
DCA-Behandlung	4 ml einer 15%igen DCA -Konzentration (0,6 ml DCA : 3,4 ml Medium)
DCA-Behandlung+ Hypoxie	4ml einer 15%igen DCA -Konzentration (0,6 ml DCA : 3,4 ml Medium) + in Hypoxie-Pack

Tabelle 22:

	Reaction Mix (pro 50 µl)
ATP Assay Buffer	44 µl
ATP Probe	2 µl
ATP Converter	2 µl
Developer Mix	2 µl

Tabelle 23:

ATP Assay Kit (Colorimetric)	Abnova, Taiwan
Protein Filter Amicon Ultra 0,5ml 3k Membran	Millipore Corporation, Bedford USA
Homogenisierer Ultra-Turrax T8	IKA Labortechnik, Staufen

9. Erklärung zum Eigenanteil

Ich, Elisa Gerhard, habe, im Rahmen meiner Tätigkeit in der Radioonkologie Tübingen, maßgeblich an der Konzeption, Durchführung und Veröffentlichung dieser Studie mitgewirkt.

Ich entwarf zusammen mit Dr. med. Adrian Staab die Studienexperimente. Eigenständig führte ich Pilotstudien durch, arbeitete mich, mithilfe von Heidrun Faltin und Ilka Müller, in die verwendeten Labormethoden ein und verfeinerte diese. Die Experimente, sowie die Datenerhebung, führte ich selbstständig durch. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Unterstützung von Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 09. Februar 2015

10. Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Stephan Huber für die Bereitstellung des Themas, für die geduldige Betreuung und für das Vertrauen, das er in mich gesetzt hat. Ich bedanke mich bei meinem Betreuer Dr. med. Adrian Staab für die Unterstützung beim Erstellen und Durchführen der Versuche.

Weiterhin gilt mein Dank dem Laborteam der AG Huber, insbesondere Heidi Faltin und Ilka Müller für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Dank euch fiel es mir leichter auch kleinere Katastrophen beim Experimentieren zu überstehen.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben und jederzeit hinter mir gestanden haben. Meinem Freund Marco danke ich dafür, dass er immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte.