

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Department) Tübingen
Abteilung I
(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Sauerstoffverbrauchsmessungen an humanen Neuroblastomzellen
und an isolierten Mitochondrien**

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

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

vorgelegt von

Marena Rebekka Niewisch

aus

Hamburg

2010

Dekan:

Professor Dr. med. Ingo B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Bruchelt

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Wolburg

Abkürzungsverzeichnis

2DG	2-deoxy-D-Glukose
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin 5' Diphosphat
AG	Arbeitsgruppe
ATP	Adenosin 5' Triphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin (Fötales Kälberserum)
c	Konzentration
Ca	Calcium
Cl	Chlor
Cu	Kupfer
°C	Temperatur in Grad Celsius
DCA	Dichloracetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dPBS	Dulbecco's Phosphat Buffered Saline
E	Extinktion
ER	Endoplasmatische Retikulum
Evtl.	eventuell
f.c.	Final concentration
FCS	Foetales Kälberserum
FdG	Fluor-desoxy-Glukose
G	gauge
GC	Gaschromatographie
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
g	Gramm
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
G-6-P	D-Glukose-6-Phosphat
G6P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Glu	Glukose
H ⁺	Kation des Wasserstoffs
h	Stunde
HIF	Hypoxia inducible factor
H ₂ O	Wasser
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
INSS	International Neuroblastoma Staging System

K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
L	Liter
LDH	Laktat Dehydrogenase
Lsg.	Lösung
M	Molar
Mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
Mg	Magnesium
Min	Minute
ml	Milliliter
MM	Mitochondriale Matrix
mM	millimolar
Mm	Millimeter
mmol	Millimol
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NaCl	Natrium Chlorid
NAD^+	Nikotinsäure Amid Dinukleotid
NADH	Reduziertes Nikotinsäure Amid Dinukleotid
NADPH	Reduziertes Nikotinsäure Amid Dinukleotid Phosphat
NADP^+	Nikotinsäure Amid Dinukleotid Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
n	Anzahl der Versuchsdurchführungen
nm	Nanometer
OH	Hydroxyl-Gruppe
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
O_2	Sauerstoff
P/S	Penicillin / Streptomycin
pA	PicoAmpere
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)

PBS ⁺⁺	Phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) + Magnesium + Calcium
PDH	Pyruvat Dehydrogenase
PET	Positron Emissions Tomogramm
pH	Negative dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PO ₄ ³⁻	Phosphat
PPP	Pentose Phosphat Pathway (Pentosephosphatweg)
Q	Ubichinon
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffverbindungen)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institut (Zellmedium)
RPMI 1640*	Roswell Park Memorial Institut (Zellmedium) mit L-Glutamin 2 mmol/l, Penicillin/Streptomycin 100 IU/ml=100mg/ml und Fötales Kälberserum 10%
s.u.	siehe unten
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
SO ₄	Sulfat
Tab.	Tabelle
TrisHCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydrochloride
u.	und
u.a.	unter anderem
U	units
UV	ultraviolett
V	Volumen
v	Probevolumen
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Neuroblastom	1
1.2.	Neuroblastom und das myc-Onkogen	5
1.3.	Mitochondrien	6
1.4.	Glykolyse	7
1.5.	Citratzyklus	10
1.6.	Oxidative Phosphorylierung	12
1.7.	Zellulärer Glukosestoffwechsel	14
1.8.	Warburg Effekt	16
1.9.	Aufgabenstellung	22
2.	Materialien und Methoden	23
2.1.	Materialien	23
2.1.1.	Chemikalien	23
2.1.2.	Medien, Lösungen und Testsysteme	24
2.1.3.	Gebrauchsartikel	26
2.1.4.	Geräte	27
2.1.5.	Verwendete Zelllinien	28
2.2.	Methoden	29
2.2.1.	Zellkultivierung	29
2.2.2.	Zellpassage	29
2.2.3.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
2.2.4.	Zellzahlbestimmung und Zellzahleinstellung	30
2.2.5.	Zellvolumenbestimmung	31
2.2.6.	Mitochondrienisolation von Neuroblastomzellen	32
2.2.7.	Proteinbestimmung nach Lowry	35
2.2.8.	Photometrische Glukosebestimmung	38
2.2.9.	Photometrische Laktatbestimmung	41
2.2.10.	Sauerstoffverbrauchsmessung	44
2.2.11.	Elektronenmikroskopie	65

2.2.12.	Statistik	66
2.2.13.	Zusatz	66
3.	Ergebnisse	67
3.1.	Proteingehalt und Zellvolumen von Neuroblastomzellen	68
3.2.	Zusammenhang der Zellzahl bzw. Zellproteinmenge und der zellulären Respirationsrate	70
3.3.	Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen	74
3.3.1.	Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von Kelly-Zellen	74
3.3.2.	Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von SK-N-SH-Zellen	78
3.3.3.	Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von LS-Zellen	81
3.4.	Sauerstoffverbrauch von Neuroblastomzellen im normalen Zellkulturmedium RPMI 1640*	84
3.4.1.	Sauerstoffverbrauch von Kelly-Zellen in RPMI 1640*	84
3.4.2.	Sauerstoffverbrauch von SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640*	86
3.5.	Einfluss der Gegenwart von 2-deoxy-D-Glukose auf die Respirationsrate von Neuroblastomzellen	87
3.5.1.	Einfluss der Gegenwart von 2-deoxy-D-Glukose auf die Respirationsrate von Kelly-Zellen	87
3.5.2.	Einfluss der Gegenwart von 2-deoxy-D-Glukose auf die Respirationsrate von SK-N-SH-Zellen	88
3.6.	Einfluss von Dichloracetat auf Neuroblastomzellen	88
3.6.1.	Entwicklung des Zellwachstums unter Dichloracetat-Einfluss	90
3.6.2.	Einfluss von Dichloracetat auf die Respirationsrate, den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion von Kelly-Zellen	92
3.6.3.	Einfluss von Dichloracetat auf die Respirationsrate, den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion von SK-N-SH-Zellen	94
3.6.4.	Einfluss von Dichloracetat auf die Respirationsrate, den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion von LS-Zellen	96
3.6.5.	Zusammenfassender Vergleich des Sauerstoff- und Glukoseverbrauchs sowie der Laktatproduktion von Neuroblastomzellen in Gegenwart und Abwesenheit von Dichloracetat	98

3.7.	Sauerstoffverbrauch von Neuroblastommitochondrien	99
3.8.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrienisolationen	103
4.	Diskussion	108
4.1.	Zusammenhang zwischen Zellzahl bzw. Zellproteinmenge und der zellulären Respirationsrate	109
4.2.	Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen	111
4.2.1.	Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von Kelly-Zellen	111
4.2.2.	Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von SK-N-SH-Zellen	113
4.2.3.	Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von LS-Zellen	114
4.2.4.	Der Energiestoffwechsel von Kelly, SK-N-SH- und LS-Zellen im Vergleich	115
4.3.	Sauerstoffverbrauch von Neuroblastomzellen in normalem Zellkulturmedium RPMI 1640*	117
4.4.	Einfluss der Gegenwart von 2-deoxy-D-Glukose auf die Respirationsrate von Neuroblastomzellen	118
4.5.	Einfluss von Dichloracetat auf Neuroblastomzellen	121
4.6.	Sauerstoffverbrauch von Neuroblastommitochondrien	125
4.7.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrienisolationen	128
5.	Zusammenfassung	130
6.	Anhang	133
7.	Literaturverzeichnis	142

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zur Sauerstoffverbrauchsmessung mit Hilfe der Clark-Elektrode an Neuroblastomzellen und ihren Mitochondrien etabliert und der Einfluss von Glukose auf die Zellatmung untersucht. Da im Rahmen der Atmungskette/oxidativen Phosphorylierung molekularer Sauerstoff verbraucht wird, erlauben zelluläre Respirationsraten Rückschlüsse auf die Aktivität der Atmungskette. Mittels der mitochondrialen Respirationsrate kann die mitochondriale Funktion überprüft werden, in dem festgestellt wird, welcher Anteil des verbrauchten Sauerstoffs zur ATP-Synthese verwendet wird. Zur Untersuchung der Mitochondrien wurden elektronenmikroskopischen Aufnahmen angefertigt, um Informationen über ihre Morphologie zu erlangen. Zunächst wird das Krankheitsbild des Neuroblastoms zusammenfassend dargestellt, sowie die Rolle des N-myc-Onkogens in Neuroblastomzellen beschrieben, da diesem eine Rolle im Glukosemetabolismus zugeschrieben wird. Anschließend folgt eine Beschreibung der mitochondrialen Morphologie in Hinblick auf die später in der Arbeit dargestellten elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Ebenfalls werden die wichtigsten zellulären Vorgänge des Glukosemetabolismus (Glykolyse, Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung) und ihre Zusammenhänge beschrieben. Viele Tumorzellen weisen einen speziellen Glukosemetabolismus auf: Sie haben eine Neigung zur Laktatproduktion auch in Gegenwart von Sauerstoff. Dieser spezielle Glukosemetabolismus wird aerobe Glykolyse oder nach dem Erstbeschreiber Warburg Effekt genannt. Da der Warburg Effekt eine Besonderheit des Glukosemetabolismus von Tumorzellen darstellt, wird hierauf in der Einleitung ausführlich eingegangen.

1.1. Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor des autonomen Nervensystems, der vom sympathischen neuronalen Gewebe des Nebennierenmarkes, dem sympathischen Grenzstrang oder sonstigen sympathischen Ganglien ausgeht. Es ist der häufigste extracraniale, solide Tumor bei Kindern und die am häufigsten diagnostizierte

Neoplasie bei Neugeborenen (Berthold, 2006; Brodeur und Maris, 2006). Das Neuroblastom gehört zu einer Gruppe neuroblastischer Tumoren, zu der ebenfalls das Ganglioneurom sowie das Ganglioneurinom gehört (Shimada et al., 1999). Die neuroblastischen Tumoren werden in Abhängigkeit ihres Differenzierungsgrades und ihrem Schwann-Zell-Anteil histologisch klassifiziert (siehe Tab. 1).

Tabelle 1 : Morphologische Subtypen neuroblastischer Tumoren (International Neuroblastoma Pathology Classification System; Shimada et al., 1999)

Neuroblastom	Prognose
<p>< 1,5 Jahre :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Niedrig differenziert oder differenziert und niedriger oder mittlerer Mitose-Karyorrhexis-Index • Undifferenziert • Hoher Mitose-Karyorrhexis-Index 	<p style="text-align: center;">günstig</p> <p style="text-align: center;">günstig ungünstig</p>
<p>1,5 – 5 Jahre:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Differenziert und niedriger Mitose-Karyorrhexis-Index • Undifferenziert oder gering differenziert • Mittlerer oder hoher Mitose-Karyorrhexis-Index 	<p style="text-align: center;">günstig</p> <p style="text-align: center;">ungünstig ungünstig</p>
<p>≥ 5 Jahre : Alle Tumoren</p>	<p style="text-align: center;">ungünstig</p>
<p>Ganglioneuroblastom, intermixed (Schwann-Zell-Stroma-reich)</p>	<p style="text-align: center;">günstig</p>
<p>Ganglioneurom (Schwann-Zell-Stroma-dominant)</p>	<p style="text-align: center;">günstig</p>
<p>Ganglioneuroblastom, nodulär (Kombination Schwann-Zell-Stroma-reich/-dominant und –arm)</p>	<p style="text-align: center;">ungünstig</p>

Das Neuroblastom ist eine klinisch facettenreiche Erkrankung, die überall im Sympathischen Nervensystem auftreten kann (Maris et al., 2007). Die meisten Erstmanifestationen (65%) treten im Abdomen auf (Maris et al., 2007). Andere typische Lokalisationen sind Nacken, Brust und Becken (Brodeur und Maris, 2006). Unspezifische Symptome der Erkrankung sind Schmerzen, Fieber und unzureichende Gewichtszunahme. Seltene, aber typische Symptome sind therapieresistenter Durchfall (durch Bildung von vaso-intestinales Peptid in reiferen Tumorzellen), Ataxie-opsomyoklonus Syndrom, Horner Syndrom (cervicale Tumorlage) oder Querschnittssymptomatik (Paraspinal Tumoren). Bei metastasiertem Neuroblastom ist ein Brillenhämatom durch retrobulbäre Infiltration charakteristisch.

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach INSS (International Neuroblastome Staging System) und Brodeur et al., 1993

Stadium	Beschreibung
1	Lokalisierte Tumor mit makroskopisch kompletter operativer Entfernung mit oder ohne in situ belassenen mikroskopischen Resttumor, unmittelbar anhängende Lymphknoten können Tumorenfiltriert sein.
2a	Unilateraler Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung ipsi und kontralateral; keine Lymphknoteninfiltration.
2b	Unilateraler Tumor mit makroskopisch kompletter operativer Entfernung mit oder ohne in situ belassenem Resttumor, ipsilaterale Lymphknoten infiltriert, kontralaterale Lymphknoten frei.
3	Tumorenfiltration über die Mittellinie mit oder ohne Metastasierung in regionale Lymphknoten oder unilateraler Tumor mit Metastasierung in kontralaterale Lymphknoten oder Mittellinien Tumor mit beidseitigem Befall von Lymphknoten.
4	Fernmetastasen
4S	Kinder < 1 Jahr mit lokalisiertem Primärtumor wie in Stadium 1 oder 2 beschrieben, mit Fernmetastasen in Leber, Haut und/oder Knochenmark ohne Knochenbefall

Unreife Neuroblastome zeichnen sich histologisch durch unreife, kleine, runde, basophile Zellen aus, die sich zu Pseudorosetten zusammenlagern und bei denen sich elektronenmikroskopisch katecholaminhaltige Granula nachweisen lassen. Neuroblastome können zu Ganglioneuromen ausreifen. Es sind bisher mehrere molekulargenetische Veränderungen bei Neuroblastomen festgestellt worden (Maris et al., 2007). Bei der N-myc-Amplifikation (20% aller Neuroblastome) und der 1p-Deletion (30% der Neuroblastome) ist ein Einfluss auf die Prognose festgestellt worden. Bei Neuroblastomzellen kann eine DNA-Ploidie vorliegen, die ein prognostischer Marker bei Patienten < 2 Jahren mit metastasierter Erkrankung ist.

Die Diagnose gilt als gesichert bei zweifelsfreier histologischer Diagnose oder Nachweis von zytologischen oder immunzytologisch charakteristischen Tumorzellnestern im Knochenmark und Katecholaminmetaboliten im Urin und Serum. Die klinische Diagnose kann gestellt werden, wenn ein Tumor mit typischer Lokalisation und Struktur vorliegt, der eindeutige Anreicherungen von [¹²³I]mIBG[SPECT] (Meta-Jod-Benzylguanidin) aufweist und gleichzeitig eindeutige Katecholaminerhöhung im Serum/Urin auftreten (Berthold, 2006).

Die Prognose ist abhängig vom Kindesalter bei Manifestation, dem Stadium (siehe Tab. 2) und den molekularen Eigenschaften der Tumorzellen. Eine günstige Prognose liegt bei lokalisiertem Neuroblastom oder Manifestation im Säuglings oder frühen Kindesalter vor, oder wenn molekulargenetisch keine Deletion 1p oder N-myc-Amplifikation nachgewiesen werden kann. Eine Tumormanifestation im Klein- und Schulkindalter mit metastasierter Erkrankung, ein lokalisierter Tumor Stadium 3 oder eine nachgewiesene 1p Deletion, N-myc-Amplifikation oder euploide DNS gehen mit einer schlechten Prognose einher. Eine Spontanregression bis zum 2. Lebensjahr kann im Stadium 4S auftreten.

Die Therapie erfolgt nach Einteilung in die in Tab. 3 aufgeführten Risikogruppen. Sie besteht je nach Risikogruppe in Operation und/oder Chemotherapie (Cisplatin, Etoposid, Vincristin, Dacarbazin, Ifosfamid, Doxorubicin) und/oder Bestrahlung (nur bei Hochrisikopatienten) (Bernhard, 2006; Maris et al., 2007).

Tabelle 3: Risikogruppen bei Neuroblastom (Berthold und Hero, 2000)

	Alter	Charakteristika
Beobachtungsgruppe	Säuglinge	N-myc-negativ und Stadium 1-3 oder Stadium 4S ohne bedrohliche Symptomatik
	> 1 Jahr	N-myc-negativ und Stadium 1 oder 2 nach Operation
Standardrisikogruppe	Säuglinge	N-myc-negativ und bedrohliche Symptomatik
	> 1 Jahr	N-myc-negativ und Stadium 2 oder 3 nach Operation
		Beobachtungspatienten mit Progression
Hochrisikogruppe	Jedes Alter	N-myc-positiv und/oder Stadium 4

1.2. Neuroblastom und das myc-Onkogen

Gene der myc-Familie kodieren für Proteine mit einer Helix-Loop-Helix-Leucinzipper Domäne. Myc-Proteine formen in vivo Heterodimere mit Max Proteinen und binden an das E-box Motiv CACGTG, um die Targetgentranskription zu starten (Blackwood et al., 1992). Myc-Gene spielen in der Zellzyklus Kontrolle, Differenzierung, Apoptose und Proliferationsrate eine wichtige Rolle (Dang, 1999). Veränderte Gene der myc-Familie (c-myc, N-myc und L-myc) sind als Onkogene mit der Genese vieler Tumoren in Verbindung gebracht worden (Adhikary und Eilers, 2005). Es ist vermutet worden, dass c-myc und N-myc überlappende Funktionen aufweisen (Malynn et al., 2000). C-myc wird in vielen Geweben und Tumoren exprimiert, die N-myc Expression ist vor allem in Tumoren von neuroektodermalem Ursprung ausgeprägt (Schwab et al., 1983). Der genaue Mechanismus des N-myc Transkriptionsfaktors im Rahmen der Tumorgenese ist noch unklar. Es ist allerdings gezeigt worden, dass Genamplifikation oder Proteinstabilisation eher eine Rolle spielen als Mutation des kodierenden Genabschnitts (Ibson und Rabbitts, 1988). Ungefähr 20% aller Neuroblastome weisen

eine N-myc-Amplifikation auf, die korreliert worden ist mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium, aggressivem Tumorstadium und schlechter Prognose (Brodeur et al., 1984). Allerdings scheint die hohe N-myc- Expression in Neuroblastomen, die keine N-myc-Amplifikation aufweisen, einen positiven Einfluss auf die Prognose zu haben (Tang et al., 2006) und der Effekt der N-myc-Expression in Neuroblastomen von Kindern verschiedener Altersstufen und Tumorstadien ist unterschiedlich (Bordow et al., 1998; Cohn et al., 2000). N-myc erhöht u.a. die Genexpression von Enzymen der Ribosomen und Proteinsynthese sowie der Glykolyse (Boon et al., 2001). Die myc-Onkogene sollen zu einer vermehrten mitochondrialen Biogenese führen (Li et al., 2005).

1.3. Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, die, mit Ausnahme der Erythrozyten, Bestandteil aller eukaryontischer Zellen sind. In den Mitochondrien finden wichtige Vorgänge des zellulären Energiestoffwechsels statt: Der Citratzyklus, die Fettsäureoxidation und die oxidative Phosphorylierung (Voet et al., 2008). Sie werden daher auch als die „Kraftwerke“ der Zelle bezeichnet. Neben dem Energiemetabolismus haben Mitochondrien eine Reihe weiterer Aufgaben. Sie enthalten z.B. Enzyme des Aminosäurestoffwechsels, der Steroidsynthese und des Harnstoffzyklus (Löffler und Petrides, 2003). Außerdem spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle in den Signalwegen zur Apoptose und Nekrose (Green und Reed, 1998). Mitochondrien haben keine feste Größe, ihre Länge variiert zwischen 1-5µm, ihr Durchmesser liegt ungefähr bei 1µm (Voet et al., 2008; Scheffler, 2008). Auch ihre Form ist nicht einheitlich, sie kann kugel, stab, fadenförmig oder verzweigt sein. Die Morphologie sowie die Anzahl von Mitochondrien sind abhängig von Zelltyp, Gewebe und dem metabolischen Stadium (Voet et al., 2008; Scheffler, 2008). Gemeinsam ist allen Mitochondrien eine gleiche Grundstruktur (Abb. 1). Sie weisen eine glatte, äußere Membran und ein in sogenannte Cristae gefaltete innere Membran auf. Somit wird das Innere eines Mitochondriums in zwei Kompartimente aufgeteilt: Der Intermembranraum (zwischen der äußeren und inneren Membran) und die mitochondriale Matrix (Abb.1). Die äußere

mitochondriale Membran enthält Porine, also Proteine, die die freie Diffusion von Molekülen bis zu 10kD zulassen (Voet et al., 2008). Der Intermembranraum ist daher äquivalent dem Zytosol in Hinsicht der Konzentration seiner Metaboliten und Ionen. Die innere Membran lässt nur O₂, CO₂ und H₂O durch und enthält viele Transportproteine, die die Passage von ATP, ADP, Pyruvat, Ca²⁺ und Phosphat kontrollieren. Diese Impermeabilität der inneren Mitochondrienmembran erlaubt die Ausbildung von Ionengradienten über die innere Membran, die für den Prozess der oxidativen Phosphorylierung und somit der ATP-Synthese wichtig ist.

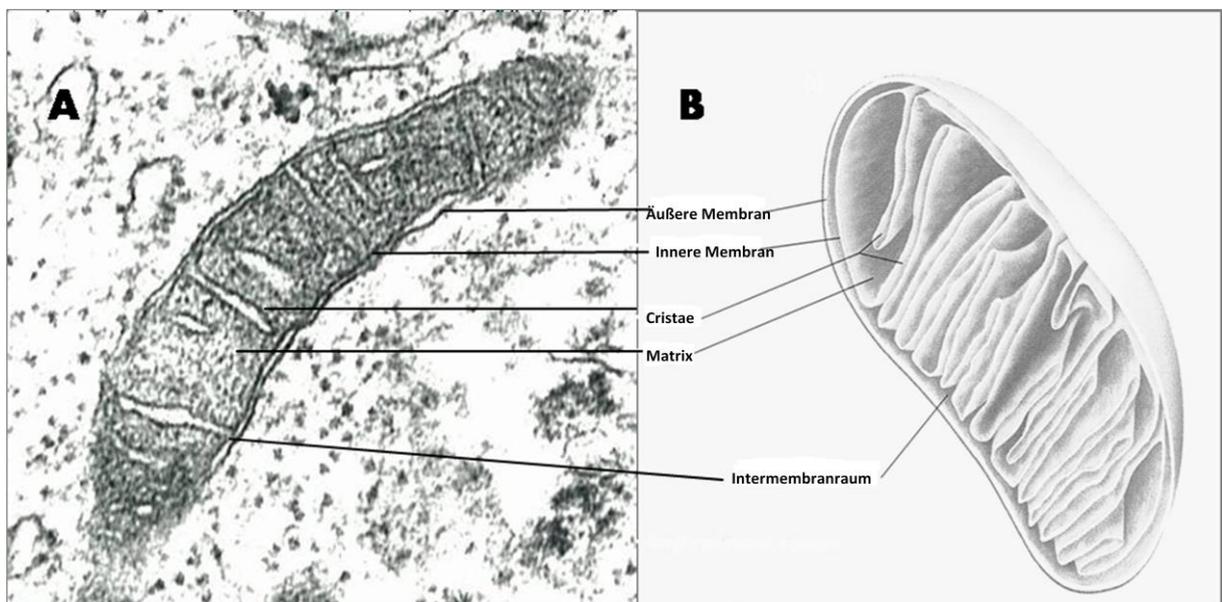


Abb. 1: Elektronenmikroskopische (A) und schematische (B) Darstellung der mitochondrialen Struktur. (A) wurde von Prof. Wolburg, Pathologisches Institut, Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. (B) aus Voet, Voet u. Pratt: *Principles of Biochemistry*. 3. Auflage (2008), Wiley and Sons, New Jersey: S. 598.

1.4. Glykolyse

Die zwei wesentlichen Stoffwechselwege zum Glukoseabbau sind die Glykolyse (siehe Abb. 2) und der Pentosephosphatweg (PPP). Nach der Aufnahme in die Zelle wird Glukose in einer von der Hexokinase katalysierten Reaktion zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Glukose-6-Phosphat kann in dem PPP zu CO₂ und NADPH abgebaut werden. NADPH wird zur Lipidsynthese und zum Schutz vor Radikalen Sauerstoff

Spezies (ROS) benötigt, das in dem PPP entstehende Ribose-5-Phosphat wird zur Nucleinsäurebiosynthese verwendet. Der Glukoseabbau über die Glykolyse findet bei eukaryonten Zellen im Cytosol statt und baut Glukose zu Pyruvat (\rightarrow Citratzyklus \rightarrow Atmungskette; siehe Abb. 3 und 5) oder Laktat (anaerobe Glykolyse) ab. Abb. 2 zeigt die einzelnen Reaktionsschritte der Glykolyse. Zwischen der Glykolyse und dem PPP gibt es über Transketolasen/Transaldolasen katalysierte verbindende Reaktionen, wodurch auch Zwischenstufen der Glykolyse in die Nucleinsäurebiosynthese einfließen können (Abb. 5).

Bei intrazellulärem Sauerstoffmangel sammelt sich durch die Glykolyse im Cytosol immer mehr NADH/H⁺, das in anaerober Stoffwechsellage nicht mehr durch die Atmungskette (Abb. 4a und b) zu NAD⁺ regeneriert werden kann. Da ohne NAD⁺ die Reaktion von Glyceral-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat nicht mehr erfolgen kann, käme die Glykolyse bei Hypoxie zum Stillstand. In diesem Fall wählt die Zelle den Weg über die anaerobe Glykolyse, bei der Pyruvat zu Laktat reduziert und gleichzeitig NADH/H⁺ zu NAD⁺ oxidiert wird. Bei der anaeroben Glykolyse werden 1 mol Glukose zu 2 mol Laktat unter Phosphorylierung von 2 mol ADP zu 2 mol ATP umgesetzt. Die unter aeroben Bedingungen weiterführende vollständige Oxidation der Glukose zu CO₂ und H₂O über die oxidative Phosphorylierung liefert hingegen über 30 mol ATP pro mol Glukose. Hierfür wird das in der Glykolyse entstehende Pyruvat über eine Pyruvat/H⁺-Pumpe aus dem cytosolischen Kompartiment in die mitochondriale Matrix transportiert und hier in den Citratzyklus eingeschleust (Abb. 3).

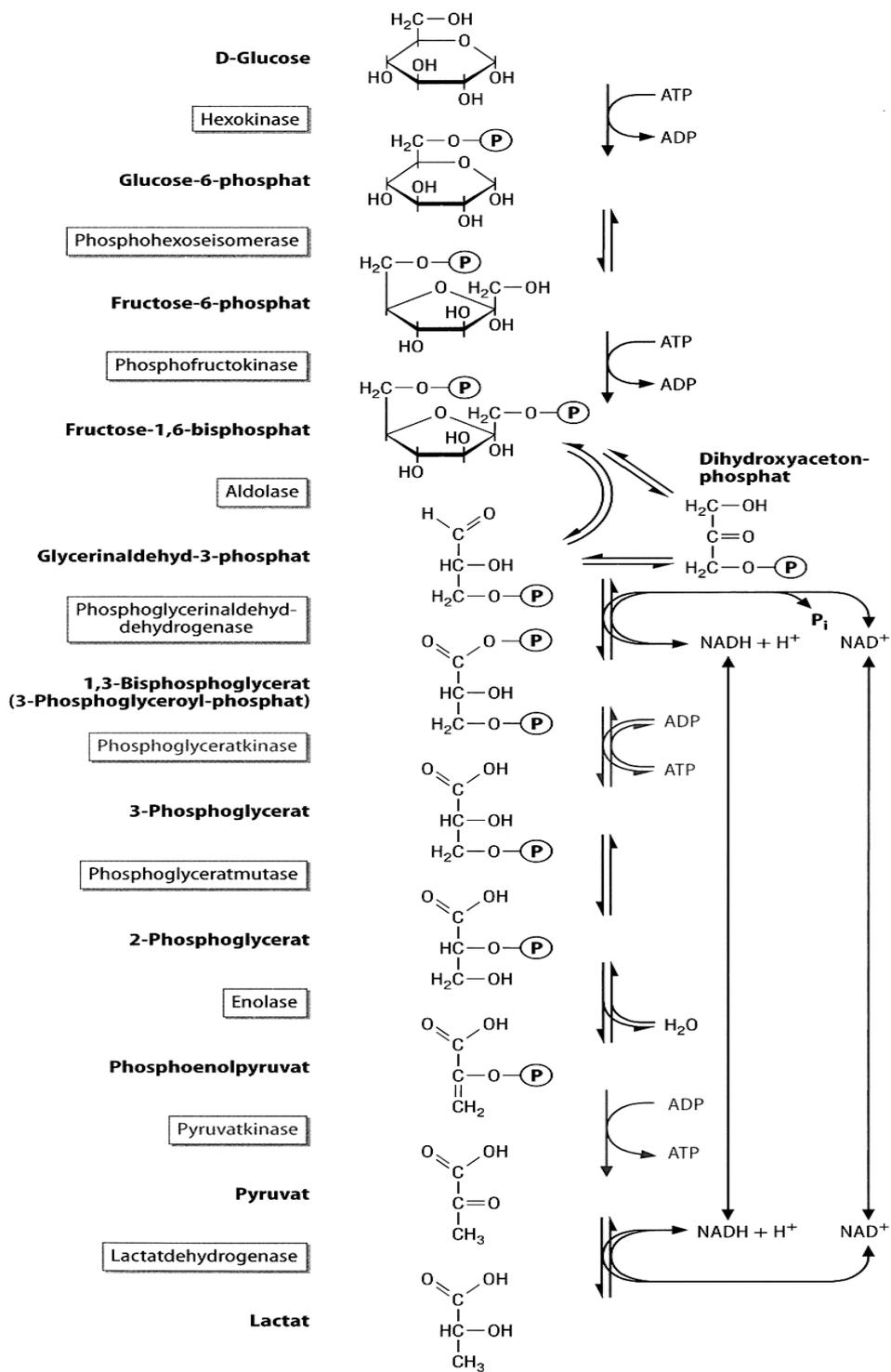


Abb. 2: Reaktionsfolge der Glykolyse (aus Löffler und Petrides: Biochemie und Pathobiochemie, 7. Auflage (2003). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: S. 397).

1.5. Citratzyklus

Pyruvat aus der Glykolyse wird zunächst über einen Pyruvat/ H^+ Cotransporter in die mitochondriale Matrix transportiert, wo sich die Enzyme des Citratzyklus befinden. Dort wird Pyruvat durch den Pyruvatdehydrogenasekomplex in Acetyl-CoA umgewandelt, wobei ein Molekül CO_2 entsteht. Im Citratzyklus wird Acetyl-CoA oxidiert und decarboxyliert. Hierbei entstehen 2 Moleküle CO_2 und 8 H^+ Atome.

Der Citratzyklus umfasst folgende Abschnitte (Reaktionsschritte siehe Abb. 3):

- (1) Acetyl-CoA wird unter Abspaltung von CoA-SH auf Oxalacetat übertragen, hierbei entsteht Citrat.
- (2) Citrat wird zu Isocitrat umgewandelt und danach zweimal oxidiert und decarboxyliert. Es entsteht Succinyl-CoA.
- (3) Von Succinyl-CoA (Thioesterbindung) wird der Coenzym-A Rest abgespalten, wobei die freiwerdende Energie zur Bildung von GTP aus GDP verwendet wird. Aus GTP kann durch eine Phosphatgruppentransferreaktion ATP erzeugt werden. Anschließend entsteht durch zweimalige Oxidation aus Succinat wieder Oxalacetat.

Die Energieausbeute des Citratzyklus beträgt insgesamt 12 ATP pro oxidierten Acetylrest. Das aus einer von Glutaminase katalysierten Reaktion aus Glutamin entstehende Glutamat (Glutaminolyse) kann über Umwandlung in α -Ketoglutarat ebenfalls in den Citratzyklus einmünden (Abb. 5). Die Regulation des Citratzyklus wird vom zellulären Energiehaushalt bestimmt. NADH und ATP hemmen den Citratzyklus, da beide einen Überschuss an energiereichen Verbindungen in der Zelle signalisieren. ADP und Calcium sind Aktivatoren des Citratzyklus, zudem wird die Pyruvatdehydrogenase als wichtigstes Acetyl-CoA lieferndes Enzym (und damit geschwindigkeitsbestimmend für den Citratzyklus) durch reversible Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert. Bei einem Überschuss von Citrat wird dieses ins Cytosol transportiert und dort durch die ATP-Citrat-Lyase in Acetyl-CoA umgewandelt, welches als Substrat in die Lipidsynthese einfließt.

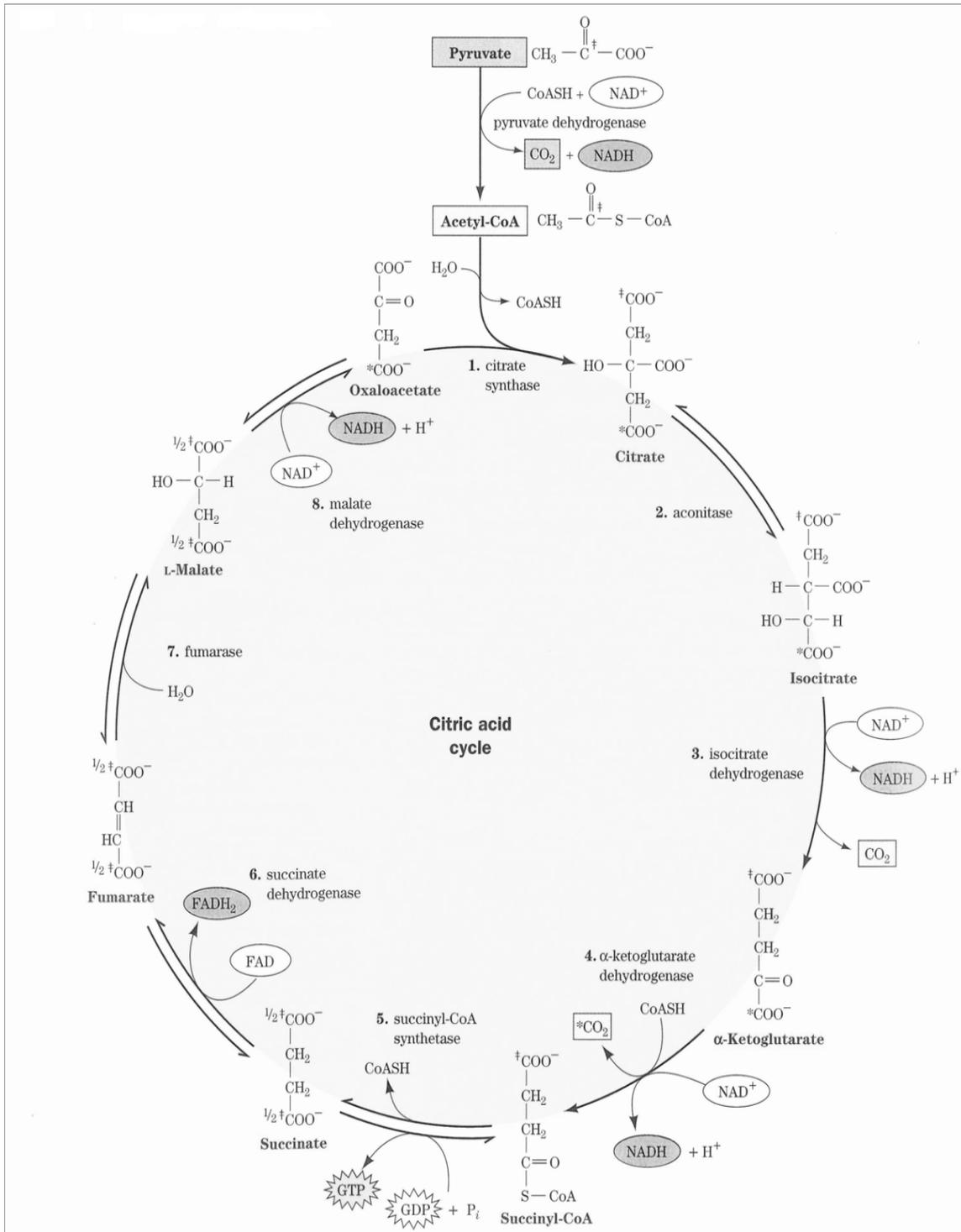


Abb. 3: Reaktionsfolge des Citratzyklus (aus Voet, Voet u. Pratt: Principles of Biochemistry, 3.Auflage (2008). Wiley and Sons, New Jersey: S. 568).

1.6. Oxidative Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) findet bei eukaryonten Zellen in den Mitochondrien statt und dient der ATP-Synthese. Alle an der Atmungskette beteiligten Enzymkomplexe (Komplex I-IV) sowie die ATP-Synthase sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert.

Bei der OXPHOS werden die bei der Glykolyse, Pyruvatdehydrogenasereaktion, Citratzyklus und der β -Oxidation (u.a.) entstandenen NADH und FADH₂ durch eine Kette von Redoxreaktionen oxidiert. Die dabei entstehende Redoxenergie wird von den 4 Enzymkomplexen der Atmungskette durch schrittweise Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff zum Aufbau eines elektrochemischen H⁺-Gradient über die innere Mitochondrienmembran genutzt. Dieser Protonengradient wird von den den Atmungskettenkomplexen nachgeschalteten ATP-Synthase zur ATP-Synthese aus ADP und anorganischen Phosphat verwendet. ADP, anorganisches Phosphat und ATP werden mittels mitochondrialer Carrier, Reduktionsäquivalente durch Shuttle Mechanismen über die innere Mitochondrienmembran transportiert. An der Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff sind vier Multiproteinkomplexe (Komplex I-IV) beteiligt, die über das Coenzym Ubichinon (Q) und Cytochrom c miteinander verbunden sind (Abb. 4a). In den Komplexen sind Flavine, Eisen-Schwefel-Zentren und Cytochrome mit Kupferzentren an der Elektronenübertragung beteiligt. Im Komplex I (NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase) werden Elektronen von NADH auf das Coenzym Q übertragen, wobei Ubihydrochinon entsteht. Die dabei entstehende Redoxenergie wird zur Übertragung von 4 Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum genutzt. Komplex II (Succinat:Ubichinon-Oxidoreduktase) besteht aus 4 Untereinheiten, von denen 2 der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus entsprechen (siehe Abb. 3). Das bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat entstehende FADH₂ überträgt innerhalb des Enzymkomplexes (Komplex II) seine Elektronen auf Ubichinon und es entsteht Ubihydrochinon. Es werden hierbei keine Protonen über die innere mitochondriale Membran gepumpt. Der Komplex III (Ubihydrochinon: Cytochrom c – Oxidoreduktase) katalysiert die Elektronenübertragung von Ubihydrochinon auf das oxidierte Cytochrom c und es werden 2 Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert. Der Mechanismus des Protonentransportes im Komplex III verläuft über den sogenannten

Ubichinon- oder Q-Zyklus. Komplex IV überträgt die Elektronen von Cytochrom c auf Sauerstoff. Je Sauerstoff werden 2 Protonen über die Membran transportiert. Die Oxidation von NADH führt zum Transport von 10 Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum (siehe Abb. 4a). Bei der Oxidation von FAD-abhängigen Substraten sind es nur 6 Protonen, da diese über den Komplex II in die OXPHOS eingeschleust werden. Die ATP-Synthase nutzt den in der Atmungskette entstandenen Protonengradienten, um ADP zu ATP zu phosphorylieren. Die ATP-Synthase besteht aus einem F₀ und F₁-Teil (siehe Abb. 4b). Bei der ATP-Synthese wird im F₀-Teil durch den Rückstrom der Protonen aus dem Intermembranraum in die mitochondriale Matrix eine Drehbewegung erzeugt, die eine Konformationsänderung im F₁-Teil bewirkt und somit ATP freisetzt. Der Phosphat-Sauerstoff Quotient für NADH beträgt maximal 2,5 und für Succinat (FAD-anhängig) maximal 1,5 ATP pro reduziertem Sauerstoff. Aus einem NADH werden also für ein Sauerstoffmolekül 2,5 Phosphate in ADP eingebaut, für FADH₂ nur 1,5. Insgesamt kann man von einer „Ausbeute“ von ATP aus einem Glukosemolekül nach Glykolyse → Citratzyklus → OXPHOS von mehr als 30 mol ausgehen. Bei der OXPHOS können durch Nebenreaktionen Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) entstehen, die Biomoleküle schädigen können. ROS können von der Superoxid Dismutase, Katalase und Gluthationperoxidase neutralisiert werden.

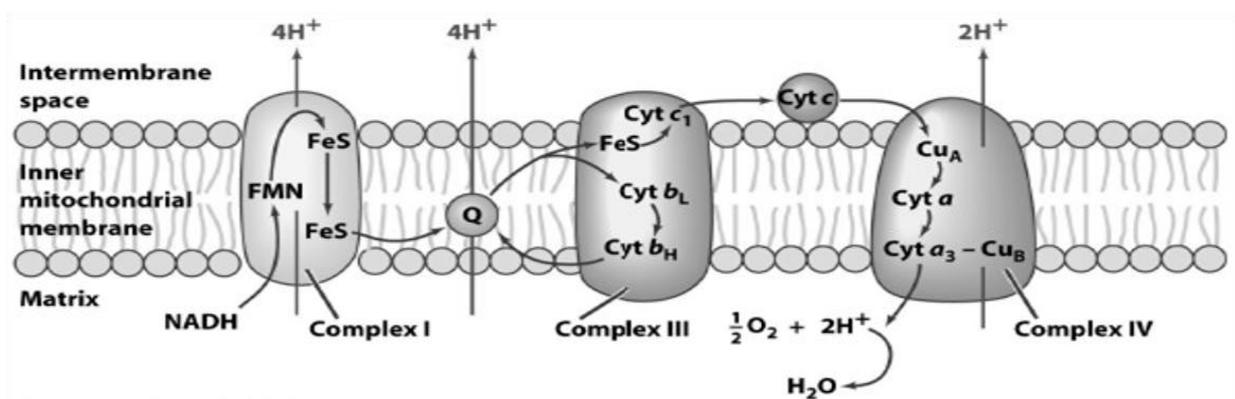


Abb. 4a: Komplexe I, III und IV der Oxidativen Phosphorylierung (Voet, Voet u. Pratt: *Principles of Biochemistry*, 3. Auflage (2008). Wiley and Sons, New Jersey: S. 605). Der Elektronentransport zwischen Komplex I und III erfolgt durch das Coenzym Ubichinon (Q) und zwischen Komplex III und IV durch Cytochrom c (Cyt c). Komplex II (nicht gezeigt) transferiert Elektronen von Succinat zum Coenzym Ubichinon.

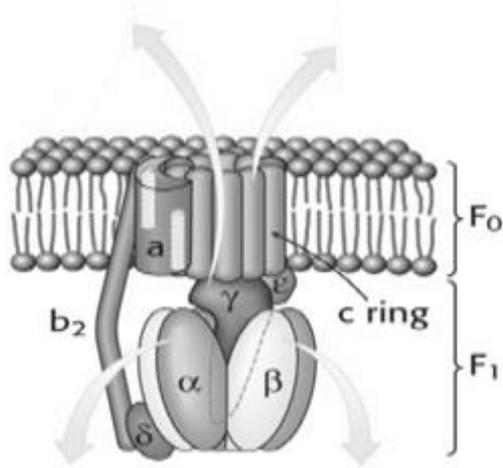


Abb. 4b: Struktur der ATP-Synthase. Modifiziert Abbildung aus Berg, Tymoczko u. Stryer. 6. Auflage (2007). Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: S.522.

1.7. Zellulärer Glukosestoffwechsel

In Abb.5 ist eine Übersicht des zellulären Energiestoffwechsels der Glukose und der damit verbundenen Stoffwechselforgänge schematisch dargestellt. Glukose bzw. die im Glukoseabbau entstehenden Stoffwechselprodukte sind wichtige Substrate für zelluläre Syntheseprozesse wie Aminosäure-, Nukleinsäure- und Lipidsynthese. In Gegenwart von Sauerstoff verstoffwechseln Normalzellen Glukose über die Glykolyse zu Pyruvat, welches in den Citratzyklus eingeschleust wird und schliesslich zu Energiegewinnung in Form von ATP im Rahmen der OXPHOS führt. Hierbei wird im letzten Schritt der OXPHOS (siehe Abb. 4a) molekularer Sauerstoff verbraucht. Ein Teil der Glukose wird über den Pentosephosphatweg abgebaut, der Substrate zur Nukleinsäuresynthese sowie NADPH zur Lipidsynthese bereitstellt. Solange keine Hypoxie besteht bauen Zellen im Normalfall Glukose nicht zu Laktat ab, da über diesen Weg weniger ATP zur Verfügung gestellt werden kann. Eine Ausnahme bilden die Erythrozyten, da sie keine Mitochondrien besitzen und Tumorzellen, die den Warburg Effekt aufweisen (siehe 1.8.).

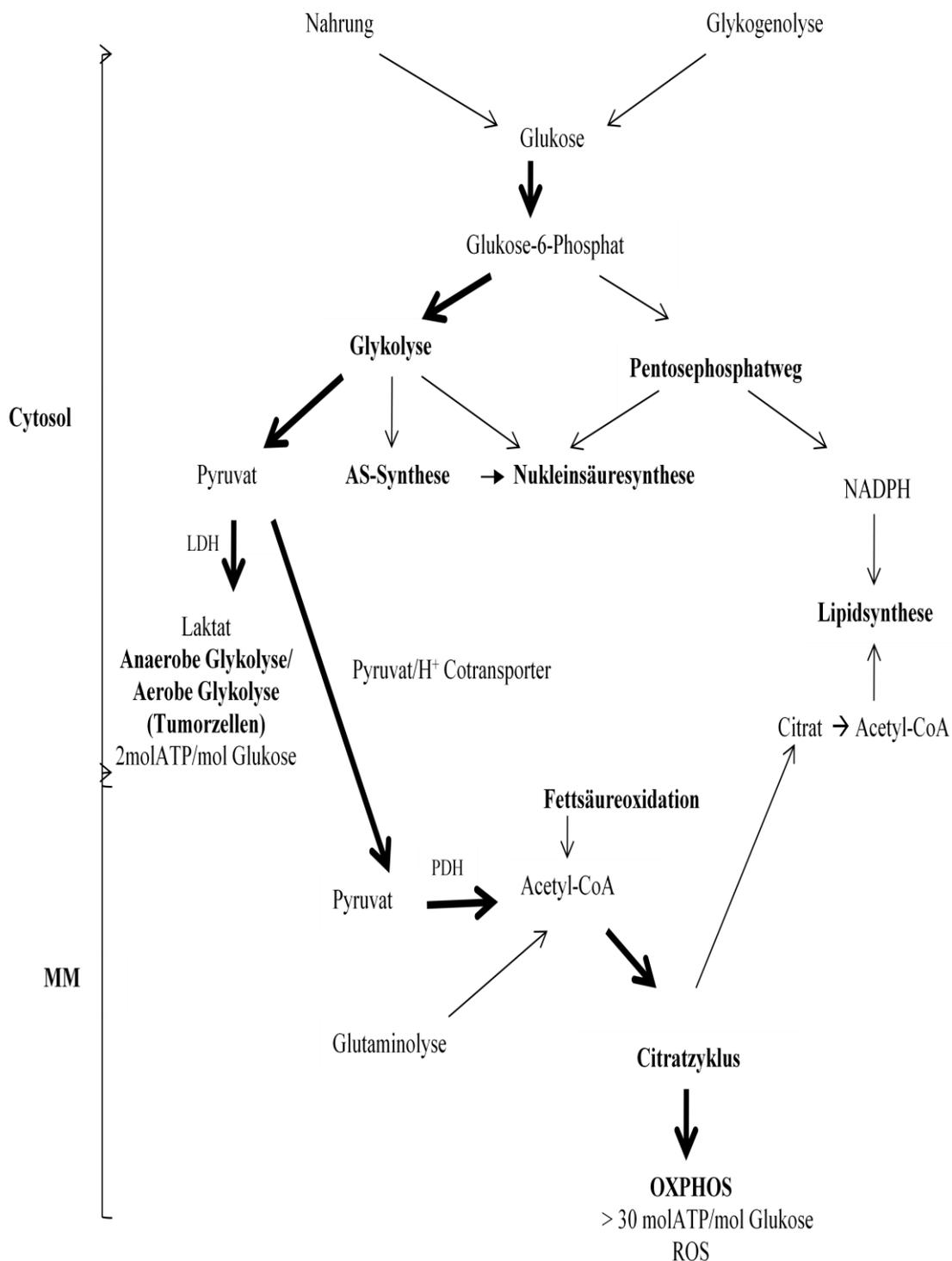


Abb. 5: Übersicht über den zellulären Glukosestoffwechsel. AS = Aminosäure; MM = Mitochondriale Matrix; LDH = Laktatdehydrogenase; PDH = Pyruvat Dehydrogenase Komplex; ROS = Reaktive Sauerstoff Spezies. Die für diese Arbeit besonders relevanten Stoffwechselvorgänge sind hervorgehoben.

1.8. Warburg Effekt

Wie oben beschrieben verstoffwechseln Zellen in der Gegenwart von Sauerstoff Glukose über die Glykolyse zu Pyruvat. Pyruvat wiederum wird anschließend im Citratzyklus zu CO_2 und H_2O oxidiert, wobei NADH und FADH_2 produziert und schließlich in der OXPHOS zur ATP-Produktion verwendet werden. Insgesamt entsteht so aus 1 mol Glukose > 30 mol ATP, 6 mol CO_2 und 6 mol H_2O . Dabei werden 6 mol O_2 verbraucht (\rightarrow Reaktionsgleichung: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2 \rightarrow 6 \text{H}_2\text{O} + 6 \text{CO}_2$) (Löffler und Petrides, 2003; Voet et al., 2008). Da für die OXPHOS Sauerstoff als Elektronenakzeptor benötigt wird, ist O_2 für den beschriebenen Ablauf des Zellstoffwechsels essentiell. Unter anaeroben Bedingungen können Zellen Pyruvat über die anaerobe Glykolyse zu Laktat verstoffwechseln, wobei pro 1 mol Glukose 2 mol ATP entstehen. Anders als bei Normalzellen findet in den meisten Tumorzellen eine hohe Laktatproduktion auch in Gegenwart von O_2 statt. Dieser spezielle Zellmetabolismus wird aerobe Glykolyse genannt und wurde 1924 von Otto Warburg zum ersten Mal beschrieben (Warburg et al., 1924) – aus diesem Grund wird die aerobe Glykolyse als Warburg Effekt bezeichnet. Bei Zellen, die den Warburg Effekt aufweisen, spricht man von einem glykolytischen Phänotyp. Otto Warburg machte die Beobachtung, dass Normalgewebe ungefähr 10% seines ATP-Bedarfs über die Glykolyse und die restlichen 90% über die OXPHOS deckt, hingegen Tumorzellen bis zu 50% ihrer ATP-Produktion über die Glykolyse beziehen (Warburg, 1956b). Die Grundaussage von Warburg war, dass Tumorzellen ihre Energie aus Glykolyse gewannen und daher nicht unbedingt auf Sauerstoff angewiesen seien. Er stellte die Hypothese auf, dass bei allen Tumorzellen eine durch Sauerstoff bedingte irreversible Schädigung der Mitochondrien vorläge, die eine verminderte Respiration und somit erhöhte Laktatproduktion zur Folge habe (Warburg, 1956b). Er sah in diesem veränderten Glukosemetabolismus die Ursache der Karzinogenese (Warburg, 1956a). Später konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht nur Tumorzellen die aerobe Glykolyse aufweisen, sondern auch proliferierende Lymphozyten (Brand und Hermfisse, 1997; Wang et al., 1976). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass aerobe Glykolyse nur bei Tumorzellen auftritt, andere Studien zeigten zudem, dass viele Tumorzellen eine intakte OXPHOS aufweisen (Moreno-Sánchez et al., 2007).

Ein erhöhter Glukoseumsatz und eine aerobe Glykolyse ist in vielen Tumorzellen nachgewiesen worden (Kim und Dang, 2006). Reitzer et al., 1979 haben gezeigt, dass bei ausreichendem Angebot von Glukose und Sauerstoff, HeLa Tumorzellen nur ungefähr 5 % ihres Glukoseumsatzes oxidativ verstoffwechseln und ca. 80% zu Laktat abbauen. Eine hohe Prävalenz von aeroben Glukoseverbrauch konnte in metastatischen Tumoren, sowie in Sarkomen und Gliomen beobachtet werden (Czernin und Phelps, 2002; Griguer et al., 2005; Rajendran et al., 2004). Zudem korreliert der glykolytische Phänotyp, bzw. die erhöhte Glukoseaufnahme in Zellen, mit der schlechten Prognose und Aggressivität von Tumoren (Kunkel et al., 2003; Mochiki et al., 2004), z.B. beim Kleinzelligen Bronchial Carcinom, Lymphom, Gliom und bei Gastrointestinalen Tumoren (Ahuja et al., 1998; Alavi et al., 1988; Buchmann et al., 2001; Kawamura et al., 2001). Es wird außerdem ein Zusammenhang zwischen Tumorinvasivität und der Ausprägung des glykolytischen Phänotyps angenommen (Gatenby und Gillies, 2004; He et al., 2004).

Der vermehrte Glukoseverbrauch von Tumorzellen wird zur Diagnostik mittels der Fluorodeoxyglukose Positron Emissions Tomographie (FDG-PET) genutzt, die sich mittlerweile als wichtiger Bestandteil des Stagings bei vielen soliden Tumoren etabliert hat (Czernin und Phelps, 2002; Gambhir, 2002). Beim FDG-PET wird ein Glukosederivat (^{18}F -Fluordesoxyglucose = FDG) als Marker eingesetzt. FDG wird von Zellen genauso aufgenommen wie Glukose. Da nach der Phosphorylierung von FDG zu FDG-6-Phosphat dieses nicht weiter verstoffwechselt wird, findet eine Anreicherung in Zellen mit erhöhter Glukoseaufnahme und Hexokinaseaktivität statt. Man hat nachgewiesen, dass bei Tumorzellen des glykolytischen Phänotyps die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT2 (Macheda et al., 2005), sowie, u.a., die Hexokinase I und II (Bos et al., 2002; Mathupala et al., 1997) hochreguliert sind. Da der Glukoseabbau über die oxidative Phosphorylierung mehr Energieäquivalente als der Glukoseabbau zu Laktat liefert und da bei der aeroben Glykolyse toxische Nebenprodukte wie H^+ anfallen (Bhujwalla et al., 2002; Schornack und Gillies, 2003), wird in der Literatur immer wieder diskutiert, welche Vorteile die aerobe Glykolyse für Tumorzellen bietet.

Auf Grund des schnellen Zellwachstums sind einige Tumorregionen zeitweise weit entfernt von den versorgenden Blutgefäßen (Gatenby und Gillies, 2004). In diesem Fall

wurde gezeigt, dass die Glukosekonzentration im Gewebe langsamer absinkt als der pO_2 (Helmlinger et al., 1997). Zellen, die den glykolytischen Phänotyp aufweisen, sind weniger vom Sauerstoffangebot abhängig als Normalzellen. Bei Normalzellen führt eine länger andauernde Hypoxie letztendlich zur Einleitung von Apoptose oder Nekrose (Papandreou et al., 2005). Gatenby und Gillies, 2004 stellten die Hypothese auf, dass der glykolytische Phänotyp bei Tumorzellen eine Adaption des Zellmetabolismus an intermittierende Hypoxie in präkanzerösen Läsionen sei, die durch die schnelle Zellproliferation mit späterer Gewebsvaskularisation entsteht (Gatenby und Gillies, 2004). Dies erklärt allerdings nicht, warum der glykolytische Phänotyp bei vaskularisierten Karzinomen bestehen bleibt.

Es ist unterschiedlich, wie viel ihres ATP-Bedarfs Tumorzellen über die Glykolyse decken. So stellte Guppy et al., 2002 fest, dass bei der Brustkrebszelllinie MCF-7 nur ein kleiner Anteil ($< 30\%$) der ATP Produktion durch die Glykolyse erfolgt. Busk et al., 2008 wies in vielen Tumorzelllinien nach, dass bis zu 63% des ATP-Bedarfs durch die aerobe Glykolyse gedeckt wird. Es konnte gezeigt werden, dass proliferierende Zellen des glykolytischen Phänotyps bei ausreichendem Substratangebot hohe Quotienten von ATP/ADP und NADH/NAD⁺ aufweisen (Christofk et al., 2008; DeBerardinis et al., 2008). Somit scheinen Tumorzellen ihren ATP-Bedarf bei ausreichendem Glukoseangebot über die Glykolyse decken zu können, aber eventuell ist die aerobe Glykolyse aus anderen Gründen als denen der ATP-Produktion von Vorteil für Tumorzellen:

Da proliferierende Zellen für die Mitose alle ihre zellulären Bestandteile verdoppeln müssen, haben sie einen höheren Bedarf an Nukleinsäuren, Aminosäuren, Lipiden etc. als Normalzellen. NADPH und Acetyl-CoA sind die Hauptkomponenten für die Lipidsynthese (Vander Heiden et al., 2009). Ribose-5-Phosphat aus dem Pentosephosphatweg, bzw. der Transketolase/Transaldolase-Reaktionen dient der Nukleinsäuresynthese (siehe Abb. 5). Zudem wird NADPH zur Bekämpfung von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) benötigt. Diese entstehen als Nebenprodukte der OXPHOS an Komplex III (Denko, 2008), zudem soll Reoxygenierung nach Hypoxie mit einer erhöhten ROS-Produktion assoziiert sein (Gillies und Gatenby, 2007; Li et al., 2002). Vander Heiden et al., 2009 haben betont, dass für Syntheseprozesse mehr Moleküle Acetyl-CoA und NADPH benötigt werden als Moleküle ATP. Sie

vermuteten, dass durch die aerobe Glykolyse sowie die Glutaminolyse bei Tumorzellen mehr und schneller NADPH und Acetyl-CoA bereitgestellt werden können, als wenn der Weg über die OXPHOS gegangen wird. Zu dieser Vermutung passt, dass überschüssiges Citrat in Zellen mit hohem Glukoseumsatz oder verminderter Mitochondrienfunktion über die ATP-Citrat-Lyase in Acetyl-CoA umgewandelt und damit in die glukoseabhängige cytosolische Lipidsynthese eingeschleust werden kann (Bauer et al., 2005) (siehe auch Abb. 5). Ein Hinweis für die vermehrte Aktivität von ATP-Citrat-Lyase in Tumorzellen ist, dass ihre Inhibierung zu vermindertem Tumorwachstum führt (Hatzivassiliou et al., 2005).

Die Umstellung des Zellmetabolismus auf die aerobe Glykolyse und die damit verbundene hohe Laktat- sowie H^+ -Produktion hat das Absinken des extrazellulären pH zur Folge (Gillies und Gatenby, 2007): Die Produktion von Laktat und H^+ durch Glykolyse verursacht eine Azidifizierung des Extrazellulärtraumes, die in Zelltoxizität münden kann (Schornack und Gillis, 2003; Bhujwalla et al., 2002). Gillis et al., 2002 wiesen nach, dass solide Tumoren azider sind als Normalgewebe. Die Tumorzellen selbst könnten sich gegen die azide Umgebung möglicherweise durch Hochregulierung von Membrantransportern schützen, die den intrazellulären pH konstant halten (Martinez-Zaguilan et al., 1993; McLean et al., 2000). Gillies und Gatenby, 2007 haben vorgeschlagen, dass Tumorzellen sich durch die Schaffung eines aziden Milieus die Voraussetzungen für invasives Wachstum schaffen.

Es werden zwei grundlegende Mechanismen zur Entstehung des Warburg Effektes vermutet: Die vermehrte Expression von glykolytischen Enzymen und eine verminderte mitochondriale Funktion. In Tumorzellen ist eine vermehrte Expression glykolytischer Enzyme festgestellt worden (Kim und Dang, 2005). So ist besonders die Hexokinaseaktivität in Tumorzellen erhöht (Bos et al., 2002; Mathupala et al., 1997). Fantin et al., 2006 stellten fest, dass eine LDH-Inhibition zu einer Hemmung des Tumorwachstums führt. Zusätzlich zu den metabolischen Vorteilen von erhöhter aerober Glykolyse können die nicht-glykolytischen Funktionen von Enzymen der Glykolyse zur Tumorgenese beitragen: Hexokinase II weist antiapoptotische Effekte auf, LDH und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase zeigen eine Zellzyklus-abhängige transkriptionale Regulation und Glukose Phosphat Isomerase ist mit einer erhöhten Zellmotilität assoziiert (Kim und Dang, 2005).

In der Literatur sind mehrere Mechanismen für eine verminderte mitochondriale Funktion identifiziert worden: Inaktivierung von PDH, verminderte Biogenese von Mitochondrien und veränderte Aktivität der Cytochrom c Oxidase (Denko, 2008). Die beschriebenen Mechanismen sind in Verbindung mit dem Hypoxia inducible Faktor HIF 1 α gebracht worden (siehe unten). Eine verminderte mitochondriale Funktion resultiert in einer herabgesetzten OXPHOS. Dies könnte in so fern von Vorteil für Tumorzellen sein, als dass weniger ROS anfallen würden, die toxisch auf Zellen wirken können (Collins et al., 2005). Außerdem spielen Signalwege der OXPHOS bei Normalzellen eine Rolle in der Apoptoseinduktion (Santamaria et al., 2006). Für eine herabgesetzte OXPHOS bei Tumorzellen spricht, dass ein Verschiebung des Zellmetabolismus hin zur OXPHOS zu Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion bei Tumorzellen führen kann (Bonnet et al., 2007; Schulz et al., 2006).

HIF ist ein Transkriptionsfaktor, der als pathophysiologische Antwort der Zellen auf Hypoxie stabilisiert wird und die Expression fast aller glykolytischen Enzyme steigert (Kim und Dang, 2005). Es ist nachgewiesen worden, dass HIF als Folge von Onkogenaktivierung bei Tumorzellen auch unter Normoxie erhöht sein kann (Kim und Dang, 2006; Semenza, 2003). HIF fördert zum einen den Glukoseumsatz (Lum et al., 2007; Selak et al., 2005) zum anderen hemmt es die mitochondriale Funktion (Papandreou et al., 2006). Somit nimmt HIF eine zentrale Rolle im Zusammenhang mit dem Warburg Effekt ein (DeBerardinis et al., 2008; Denko, 2008; Kim und Dang, 2006).

In den letzten Jahren ist vermehrt die Aktivierung von Onkogenen mit dem Warburg Effektes assoziiert worden (Ramanathan et al., 2005). In diesem Zusammenhang werden in der Literatur u.a. die Onkogene Akt, myc und ras (Kim und Dang, 2006) sowie der Verlust der Tumorsuppressorgenen p53 (Bensaad et al., 2006), VHL (Kaelin, 2002), PTEN (Bárdos und Ashcroft, 2005), Succinat Dehydrogenase und Fumarat Hydratase (siehe Abb. 3) (Selak et al., 2005) diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass einige molekularen Mechanismen in Verbindung miteinander zum Warburg Effekt beitragen (Huang, 2008; Janardhanan et al., 2009; Kim und Dang, 2006). Zusammenfassend kann man sagen, dass die auslösenden Mechanismen sowie die Vorteile des Warburg Effektes bei Tumorzellen vielfältig sind. Offensichtlich gibt es keinen einheitlichen Mechanismus zur Entstehung des Warburg Effektes in allen

Tumorzellen. Eher kann man davon ausgehen, dass jede glykolytische Tumorzelllinie einen speziellen Mechanismus vorweist, der zur Ausprägung des glykolytischen Phänotyps führt.

In der vorliegenden Arbeit wurde schwerpunktmäßig der Sauerstoffverbrauch bei Neuroblastomzellen in Abhängigkeit vom Glukoseangebot untersucht, wobei der Warburg Effekt und die Frage, in wie weit er bei den hier untersuchten Zelllinien vorliegt, eine der Fragestellungen darstellte. Bei Neuroblastomzellen ist ein erhöhter Glukoseumsatz bekannt, der auch in der FDG-PET-Diagnostik ausgenutzt wird (Kushner et al., 2001). Zudem wurde festgestellt, dass Hypoglykämie bei Neuroblastomzellen zum Zelltod führt, Hypoxie jedoch nicht (Kögel et al., 2006). Li et al., 2009 stellten bei Neuroblastomzellen fest, dass eine Inhibierung des Akt-Onkogens die Effektivität von Gold(III) Porphyrin 1a in der Neuroblastomtherapie verstärkt. Dies lässt vermuten, dass der Akt-Signalweg eine Bedeutung für Neuroblastomzellen besitzt. Akt kodiert für eine Seronin/Threoninkinase und gehört zu den Onkogenen, die das Zellüberleben unterstützen (Dudek et al., 1997). Unter anderem ist Akt assoziiert mit Glykolyseinduktion (DeBerardinis et al., 2008; Elstrom et al., 2004). Bei Neuroblastomzellen ist allerdings besonders das myc-Onkogen von Bedeutung. Wie schon erwähnt, ist beim Neuroblastom das Auftreten einer N-myc-Amplifikation mit aggressivem Tumorwachstum korreliert (Brodeur et al., 1984). Boon et al., 2001 stellten fest, dass N-myc u.a. die Expression von Genen der Glykolyse erhöht. Zudem bindet der myc Transkriptionsfaktor an mehrere glykolytische Gene (Kim und Dang, 2005; Osthus et al., 2000). Allerdings löst die Aktivierung von myc in humanen P493-6 B-Lymphozyten (Burkitt-Lymphom-Zellreihe) einen erhöhten Sauerstoffverbrauch sowie mitochondriale Biogenese aus (Li et al., 2005). Insgesamt ist die Rolle des myc-Onkogens in der Entstehung des Warburg Effektes noch nicht vollständig aufgeklärt und manche Befunde müssen weiter charakterisiert werden. So soll z.B. das myc-Onkogen in Verbindung mit HIF (Hypoxia inducible factor) die aerobe Glykolyse unterstützen (Huang, 2008), aber auch die mitochondriale Biosynthese und damit die OXPHOS fördern (Li et al., 2005).

1.9. Aufgabenstellung

Der Warburg Effekt ist bei vielen Tumorzellen nachgewiesen worden. In dieser Arbeit wurden bei den humanen Neuroblastomzelllinien Kelly, SK-N-SH und LS sowie ihren isolierten Mitochondrien Sauerstoffverbrauchsmessungen durchgeführt. Dabei standen folgende Untersuchungen im Vordergrund:

1. Etablierung der Methodik zur Sauerstoffverbrauchsmessung.
2. Untersuchung der zellulären Respirationsrate bei Kelly-, SK-N-SH- und LS-Zellen unter verschiedenen Versuchsbedingungen, sowie exemplarische Glukose und Laktatbestimmungen zur Charakterisierung des Glukosemetabolismus.
3. Untersuchung zum Effekt von induzierter Glykolyseinhibition oder Zellstoffwechselferschiebung (von der Glykolyse hin zur OXPHOS) durch 2-deoxy-D-Glukose und Dichloracetat.
4. Untersuchung der respiratorischen Kapazitäten sowie der morphologischen Unterschiede von Neuroblastommitochondrien.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Substanz	Firma
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dichloressigsäure 99+ % (GC), $C_2H_2Cl_2O_2$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS ⁺⁺): (dPBS) + Magnesium ($MgCl_2$) + Calcium ($CaCl_2$)	GIBCO [®] 14040 invitrogen [™] Auckland, NC; Paisley/UK
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat ($C_4H_4K-NaO_6 \times 4$ H_2O)	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat ($CuSO_4 \times 5 H_2O$)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck-Schuchhardt, Hohenbrunn
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumsulfit Wasserfrei (Na_2SO_3)	Universitätsapotheke Tübingen

Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Saccharose (LD+)	Roth, Karlsruhe
Succinat Dinatrium Salz Hexahydrat Minimum 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TrisHCl = Tris(hydroxymethyl) – Aminomethan - Hydrochlorid (C ₄ H ₁₁ NO ₃ × HCl)	Roth, Karlsruhe

2.1.2. Medien, Lösungen und Testsysteme

Substanz	Firma
Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Borat-Sulfit Lösung (1000 ml) <ul style="list-style-type: none"> • Di-Natrium-Tetraborat Decahydrat (Na₂B₄O₇ × 10 H₂O): 3,81g • Natriumsulfit wasserfrei (Na₂SO₃): 20g 	Universitätsapotheke Tübingen
Cacodylatpuffer 0,1 mol/l (pH 7,2)	Pathologisches Institut, AG Wolburg, Universität Tübingen
D-Glucose UV-Test	R-Biopharm AG., Darmstadt
Einfriermedium: <ul style="list-style-type: none"> • Roswell Park Memorial Institut (RPMI) 1640 70% • FCS 20% • Dimethylsulfoxid (DMSO) 10% 	Biochrom AG, Berlin Biochrom AG, Berlin Merck, Darmstadt
Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutaraldehyd 2,5 %, gepuffert in 0,1 mol/l Cacodylatpuffer (pH 7,4)	Pathologisches Institut, AG Wolburg, Universität Tübingen

Kalium-Phosphatpuffer 0,1 mol/l, pH 7,4
(Messpuffer B) :

- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) 0,1 mol/l Merck, Darmstadt
- Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) 0,1 mol/l Merck, Darmstadt

L-Glutamin 200 mmol/l Biochrom AG, Berlin

L-Milchsäure UV-Test R-Biopharm AG, Darmstadt

Natriumchlorid (NaCl) Isotone Fresenius Kabi, Bad Homburg
Kochsalzlösung 0,9%

Penicillin/Streptomycin 10000 U/10000 $\mu\text{g/ml}$ Biochrom AG, Berlin

QproteomTM Mitochondria Isolation Kit Qiagen[®] GmbH Deutschland, Hilden

RPMI 1640* = RPMI 1640-Medium mit 2 g/l NaHCO_3 : Biochrom AG, Berlin

- L-Glutamin 2 mmol/l Biochrom AG, Berlin
- Penicillin/Streptomycin 100 IU/ml = 100 mg/ml Biochrom AG, Berlin
- Foetales Kälberserum (FCS) 10 % Biochrom AG, Berlin

Trypsin/EDTA Lösung 0,05% / 0,02% in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} Biochrom AG, Berlin

Trypan Blau-Lösung 0,4% Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tris-HCl-Puffer 20 mmol/l, pH 7,4 Roth, Karlsruhe
(Messpuffer A):

- Kaliumchlorid (KCl) 20 mmol/l Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Kalium-Phosphatpuffer 10 mmol/l, pH 7,4 Merck, Darmstadt
- Magnesiumchlorid (MgCl_2) 5 mmol/l Merck-Schuchhardt, Hohenbrunn
- Saccharose (LD+) 0,225 mol/l Roth, Karlsruhe

2.1.3. Gebrauchsartikel

Artikel	Firma
BD Plastipak 1 ml Spritze	Becton Dickinson S.A., Madrid, Spain
BD Plastipak 2 ml Spritze	Becton Dickinson S.A., Madrid, Spain
Deckgläser 20x26 mm	Menzel GmbH & Co KG., Braunschweig
Einfrierröhrchen	Greiner
Eppendorfhütchen	Eppendorf
Hämatokritröhrchen: Kapillarküvetten für Bilimeter II Art. Nr. 105000	PFAFF Medizin & Technik, Neuburg a.d. Donau
Kanülen BD Microlance™ 3 20 G x 1 ½ - Nr.1 0.9 mm x 40 mm	Becton Dickinson S.A., Fraga(Huesca), Spanien
Kanülen BD Microlance™ 3 26G×½” 0.455×13 mm	BD, Drogheda, Ireland
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Neubauer Zählkammern 0.1 mm Tiefe, 0.0025 mm ²	BRIGHT-UNE
Parafilm ‘M’®	Pechiney Plastic Packaging Chicago, Il. 60631
Pasteur Kapillarpipetten 230 mm	WU, Mainz
Polypropylene Conical Tube 15 ml	Falcon® Becton, Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Polypropylene Conical Tube 30 x 115 mm style 50 ml	Falcon® Becton, Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturflasche 162 cm ² mit geradem Hals, ohne Filterdeckel	Costar, NY, USA
Zellkulturflasche 75 cm ² mit Filterdeckel	Costar, NY, USA

2.1.4. Geräte

Geräte	Firma
Brutschrank HERA cell (Brutschrank für Zellkulturen)	Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart/Fellbach
End-over-end-shaker (Test-tube-rotator 34528)	Snijders, Tilburg, Holland
Eppendorfpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Hämatokritzentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Laborkühlschrank	Bosch, BRD
Magnetrührer	Janke & Kunke GmbH & Co KG, Ika Labortechnik, Staufen i.Br.
Micro-haematocrit reader	Hawksley, England
Mikroskop Olympus (X40 CL7200) (Phasenkontrastmikroskop zur Zellzählung)	Olympus Optical Co, LTD Japan
Mikroskop Wilovert [®]	Will, Wetzlar
Mikrowaage	Sartorius AG Mechatronik, Göttingen
Mikrozentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
pH-Meter Microprocessor pH-Meter WTW pH535 MultiCal [®]	Wissenschaftliche Technische Werkstätten, Weilheim i. OB.
Schüttelgerät Typ REAX 1 Nr. 54111	Heidolph GmbH & Co. KG, Schwabach
Spectrophotometer Typ DU 640	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Sterile Werkbank	Heraeus Instruments, Wangen
Waage Modell E 400 D	OHAUS, Flocham Park, NJ, USA
Wasserbad	Memmert GmbH & Co, Schwabach
Zentrifuge ROTIXA 50 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Zubehör zum 928 6-Channel Dissolved Oxygen System
(Sauerstoffverbrauchsmessungen):

1302 Service Kit Part NO. SI 020 for use with the 1302 Oxygen Electrode	Strathkelvin Instruments LTD, Glasgow, UK/ Novodirect, Kehl, Germany
928 Software (Software zur Versuchsauswertung)	Strathkelvin Instruments LTD, Glasgow, UK/ Novodirect, Kehl, Germany
SI Strathkelvin Instruments Oxygen interface model 928	Strathkelvin Instruments LTD, Glasgow, UK/ Novodirect, Kehl, Germany
Strathkelvin Electrolyte Lösung	Strathkelvin Instruments LTD, Glasgow, UK/ Novodirect, Kehl, Germany
Wasserbad (für Strathkelvin Instruments Oxygen interface model 928)	Haake, Berlin Karlsruhe, Germany

2.1.5. Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Charakteristika	Herkunft	Literatur
Kelly	Neuroblastom, human	DSMZ, Braunschweig	Kuçi et al., 2002
LS	Neuroblastom, human	Dr. Handgretinger, Univ. Kinderklinik, Tübingen	Rudolph et al., 1991
SK-N-SH	Neuroblastom, human	American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, USA	Biedler et al., 1973

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultivierung

Alle drei verwendeten Neuroblastomzelllinien (Kelly, SK-N-SH und LS) wachsen adhären. Sie wurden liegend in 750 ml Zellkulturflaschen in RPMI 1640* (RPMI 1640-Medium mit 2 g/l NaHCO₃ + L-Glutamin 2 mmol/l, Penicillin/Streptomycin 100 IU/ml = 100 mg/ml, Foetales Kälberserum (FCS) 10 %) im Brutschrank bei 37°C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre bei 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dabei wurden die Zellkulturflaschen nie ganz verschlossen, um die Zirkulation von Sauerstoff und CO₂ zu gewährleisten. Das Wachstum der Zellen wurde jeden Tag mikroskopisch beurteilt und das Medium auf Verunreinigungen kontrolliert. Wurde bei der Kontrolle einer Verlagerung des pH-Wertes im Medium in den sauren Bereich festgestellt (Farbumschlag des Mediums von rot nach orange) wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Bildung eines Zellrasens (1 – 7 Tage, Zeitraum abhängig von Zelllinie und Passage) wurden die Zellen passagiert.

2.2.2. Zellpassage

Das Zellkulturmedium wurde unter sterilen Bedingungen vollständig entfernt. Die Zellen wurden dann mit 2.5 ml 0,05 % Trypsinlösung (Inkubationszeit 60s, 37°C) abgelöst und dann die Trypsinwirkung durch die Zugabe von RPMI 1640* neutralisiert. Anschließend wurde die Zellsuspension entweder zur weiteren Zellzüchtung auf Zellkulturflaschen verteilt oder für nachfolgende Versuchsreihen aufbereitet (s.u.). Der zeitliche Abstand der Zellpassage war abhängig von der Zelllinie, da die verwendeten Zelllinien (siehe Material, 2.1.5.) unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten aufweisen (Bei LS-Zellen erfolgte die Zellpassage alle 1-2 Tage, bei Kelly-Zellen alle 2-3 Tage und bei SK-N-SH-Zellen alle 3-4 Tage).

2.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden wie in 2.2.2. beschrieben abgelöst, in 15 ml Röhren versetzt und zentrifugiert (5 min, 380g, 18°C). Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und das Zellpellet mit 2 ml Einfriermedium resuspendiert. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde auf ein Kryoröhrchen verteilt, dieses steril verschlossen und die Zellen bei -80°C bis zu 6 Monate aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die Zellen auf 37°C erwärmt, in 10 ml RPMI 1640* resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 380g, 18°C). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in RPMI 1640* resuspendiert und in Zellkulturflaschen zur Züchtung überführt.

2.2.4. Zellzahlbestimmung und Zellzahleinstellung

Die Zellen wurden wie in 2.2.1. und 2.2.2. beschrieben vorbereitet und das Zellpellet in 10 ml RPMI 1640* suspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden in ein Eppendorfhütchen überführt und mit 50 µl 0,4 %iger Trypan Blau-Lösung gründlich gemischt. Wenn eine hohe Zellzahl in der Ausgangslösung angenommen wurde, wurde die 50 µl Zellsuspension vor der Zugabe von Trypan Blau-Lösung zunächst mit RPMI 1640* verdünnt. Mit Hilfe eines Kapillarröhrchens wurde die Zell-Trypan-Blau-Lösung in eine Neubauerzählkammer überführt und die vier Zählfelder (4×16 Quadrate) unter dem Mikroskop ausgezählt. Da die Trypan-blau-Lösung bei toten Zellen durch die Zellmembran diffundieren kann, konnte bei der Auszählung zwischen beschädigten und intakten Zellen unterschieden werden. Für die Berechnung der Zellzahl wurden nur die Anzahl intakter Zellen verwendet.

(1) Berechnung Zellzahl:

$$\text{Zellzahl / ml} = x \times \text{evtl. Verdünnung} \times 2 \times 10^4$$

x = Mittelwert Zellzahl in den 4 Zählkammern

Beispielrechnung:

Ausgezählte Zellen: 1. Zählkammer: 28; 2. Zählkammer: 35; 3. Zählkammer: 32; 4. Zählkammer: 40; Verdünnung: 1 : 20

Mittelwert $x = (28 + 35 + 32 + 40) / 4 = 33,75$

Zellzahl/ml = $33,75 \times 20 \times 2 \times 10^4 = 1350 \times 10^4$ Zellen/ml

(2) Zellzahleinstellung

$x \text{ ml} = (\text{Ausgangszellzahl} / \text{Zielzellzahl})$

Beispielrechnung:

Ausgangszellzahl : 2×10^6 Zellen/ml Zielzellzahl: $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml

$x \text{ ml} = (2 \times 10^6 \text{ Zellen/ml} / 0,5 \times 10^6 \text{ Zellen/ml}) \times 1 \text{ ml} = 4 \text{ ml}$

2.2.5. Zellvolumenbestimmung

Das Verfahren zur Zellvolumenbestimmung erfolgte in Analogie zur Hämatokritbestimmung bei Erythrozyten mittels Zentrifugation, um den prozentualen Volumenanteil der Zellen in einer Zellsuspension zu bestimmen. Hierzu wurden 50 μl Zellsuspension mit einer vorher bestimmten Zellzahlkonzentration in ein Eppendorfhütchen überführt und mittels Schütteln gut gemischt, um eine gleichmäßige Zellkonzentration in der gesamten Suspension zu erreichen. Ein Teil der Zellsuspension wurde in ein Hämatokritröhrchen aufgezogen und dieses anschließend bei 1000g in einer Hämatokritzentrifuge zentrifugiert bis eine maximale Zellpackungsdichte erreicht war. Nach der Zentrifugation wurde mit Hilfe einer speziellen Hämatokritauswertscheibe der prozentuale Anteil der abgesetzten Zellen in % an der Füllhöhe der Zellsuspension im Hämatokritröhrchen bestimmt. Ein Annäherungswert an das Volumen von 10^6 Zellen wurde wie folgt berechnet:

(1) Umrechnung prozentualer Anteil der Zellen an Gesamtvolumen (50 μl):

$x \mu\text{l} = m \times 50 \mu\text{l}$ (m = Abgelesener Prozentwert)

(2) Volumenberechnung von 1×10^6 Zellen:

$$y \mu\text{l} = (1 \times 10^6 \times x \mu\text{l}) / \text{Ausgangszellzahl in } 50 \mu\text{l}$$

$$y = \text{Volumen von } 1 \times 10^6 \text{ Zellen}$$

Beispielrechnung: Ausgangszellzahl: 5×10^6 Zellen/50 μl

Abgelesener Prozentwert: 17 %

$$x = 0,17 \times 50 \mu\text{l} = 8,5 \mu\text{l}$$

$$y = (1 \times 10^6 \times 8,5 \mu\text{l}) / 5 \times 10^6 = 1,7 \mu\text{l}$$

Demnach nehmen 10^6 Zellen annäherungsweise ein Volumen von 1,7 μl ein.

2.2.6. Mitochondrienisolation von Neuroblastomzellen

2.2.6.1. Prinzip

Zur Mitochondrienisolation wurde das Qproteom Mitochondria Isolation Kit verwendet. Zunächst werden die Zellen hierbei in Lysispuffer suspendiert, welcher selektiv die Plasmamembran zerstört, ohne sie aufzulösen. Hierdurch werden die zytosolischen Proteine freigesetzt, die Plasmamembran und die Zellorganellen wie Nukleus, Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum (ER) bleiben jedoch intakt und sammeln sich bei der Zentrifugation im Pellet. Dieses Pellet wird wiederum in Disruption Buffer suspendiert und mehrfach durch eine 26 G Nadel aufgezogen, wodurch eine komplette Zellzerstörung erreicht wird. Nach erneuter Zentrifugation befinden sich im Zellpellet Nuclei, Zelltrümmer und Zellen. Der Überstand mit Mitochondrien und Mikrosomenbestandteilen wird erneut zentrifugiert, um die Mitochondrien im Pellet zu sammeln. Um die Mitochondrien längere Zeit einfrieren zu können oder um sie für Versuche einzusetzen, wird das Pellet in Storage Buffer suspendiert (Qproteome Mitochondria Isolation Handbook).

2.2.6.2. Durchführung

Die Isolierung wurde gemäß Vorschrift (Qproteome Mitochondria Isolation Handbook) bei 4°C durchgeführt. Es wurden daher nur vorgekühlte Lösungen verwendet und die verwendeten Zentrifugen ebenfalls auf 4°C vorgekühlt. Lysis Buffer und Disruption Buffer wurden vorher steril zu 1 ml respektive 1,5 ml in Eppendorfhütchen (2 ml) aliquotiert. Direkt vor der Verwendung des Lysis Buffers oder Disruption Buffers wurde diesen eine Protease Inhibitor Solution beigemischt (Jeweils 1/100 des Ausgangsvolumens).

Zellen aus mehreren Zellkulturflaschen wurden geerntet und dann bei 380g, 4°C, 5 min in einem 15 ml Röhrchen zentrifugiert. Dabei war die Anzahl der verwendeten Zellkulturflaschen von der jeweiligen Zelllinie und dem Wachstumsstand des Zellrasens abhängig. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert, in ein 2 ml Eppendorfhütchen überführt und anschließend zentrifugiert (500g, 4°C, 10 min). Der NaCl-Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, ohne das Zellpellet zu beschädigen und das Zellpellet wurde dann in 2 ml Lysis Buffer + 20 µl Protease Inhibitor Solution (1 ml Lysis Buffer pro 1×10^7 Zellen) resuspendiert. Das Lysat wurde für 10 min in einem End-over-end Shaker inkubiert und anschließend zentrifugiert (1000g, 4°C, 10 min). Der Überstand (enthält vor allem Proteinbestandteilen des Zytoplasmas) wurde vorsichtig abgesaugt, und das Zellpellet mit 1,5 ml Disruption Buffer + 15 µl Protease Inhibitor Solution resuspendiert. Hierzu wurde die Lösung 10× in eine 2 ml Spritze mit einer 26 G Nadel langsam aufgezogen und schnell ausgeworfen. Danach wurde das Lysat zentrifugiert (1000g, 4°C, 10 min). Die Suspension, in dem noch Nukleusbestandteile, Zelltrümmer und Zellen vorhanden waren, wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfhütchen überführt. Der Überstand wurde zentrifugiert (6000g, 4°C, 10 min), danach der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Pellet in 1 ml Storage Buffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert (6000g, 4°C, 20 min). Der Überstand wurde abermals abgesaugt und das Pellet mit den isolierten Mitochondrien je nach Bedarf in Storage Buffer resuspendiert. Zur Bestimmung der Mitochondrienmenge wurden von jeder Isolation vor der Weiterverwendung 10-20 µl

der Suspension bei -20°C zur späteren Proteinbestimmung eingefroren (Versuchsablauf siehe Abb. 6) (Qproteome Mitochondria Isolation Handbook).

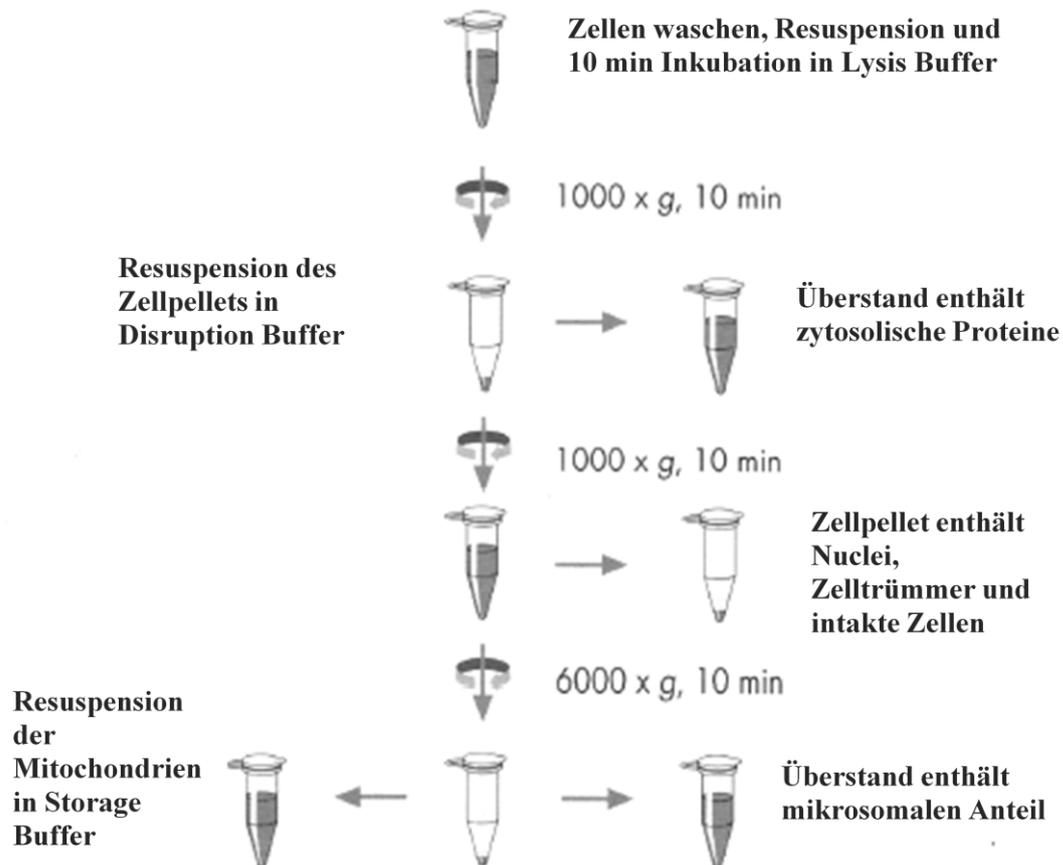


Abb. 6: Einzelne Versuchsschritte der Mitochondrienisolierung mit dem Qproteome Mitochondria Isolation Kit (Modifiziert nach Qproteome Mitochondria Isolation Handbook). Einzelheiten siehe Text.

2.2.7. Proteinbestimmung nach Lowry

2.2.7.1. Prinzip

Die Proteinbestimmung nach Lowry dient dazu, Proteine quantitativ zu bestimmen und beruht auf zwei Reaktionen. Zum einen auf der Biuretreaktion, die im ersten Schritt der Bestimmung zur Bildung eines blau-violetten Komplexes zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung führt. Die zweite Reaktion besteht darin, dass dieser Komplex das gelbe Folinreagenz reduziert. Von der resultierenden Blaufärbung der Lösung wird photometrisch die Extinktion bei einer Wellenlänge von 500 nm bestimmt und diese zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt [Berechnung erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beersches Gesetz: $E = \varepsilon \times c \times d$, E = Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge, ε = molarer Extinktionskoeffizient (cm^2/mol), c = Konzentration des Stoffs (mol/cm^3), d = Schichtdicke der Messküvette (cm)] (Lowry et al., 1951).

2.2.7.2. Herstellung der Reagenzien

Lösung A: 2% Na_2CO_3 (2g/100 ml H_2O) + 0.1 M NaOH + 0.2g/l K-Na-Tartrat. Für Lösung A wurden 2 g Na_2CO_3 und 20 mg K-Na-Tartrat in 100 ml 0.1 M NaOH gelöst.

Lösung B: 750 mg CuSO_4 /100 ml H_2O

Lösung C: 0.2 ml Lösung B + 10 ml Lösung A

Lösung E: Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz

2.2.7.3. Durchführung

Zunächst wurden 500 µl der Lösung C in die Photometerküvetten pipettiert, dann 10 µl des Standards/der Probe hinzu pipettiert. Dies wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 20 µl der Lösung E hinzugegeben, resuspendiert und die Lösungen durch Schütteln gut gemischt. Dann folgten 20 min Inkubationszeit bevor mit den Messungen begonnen wurde (siehe Tab. 4). Die Proben wurden bei 500 nm gegen H₂O (500 µl pro Küvette) gemessen.

Tabelle 4: Pipettierschema für die Proteinbestimmung nach Lowry

Probe	Lösung C	Lösung E (Folin Reagenz)
10 µl	500 µl	
5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur		
		20 µl
20 min Inkubation bei Raumtemperatur		
Photometrische Messung bei 500 nm		

2.2.7.4. Erstellen der Protein-Eichkurven

Als Grundlage für die Erstellung der Eichkurven wurde der Proteingehalt von festgelegten Konzentrationen einer Bovine Serum Albumin (BSA) - Standardlösung ermittelt. Es wurden 3 Eichkurven erstellt, bei denen sich jeweils das Lösungsmittel unterschied, die eingesetzten BSA-Konzentrationen jedoch identisch waren.

- Eichkurve 1: BSA gelöst in destilliertem H₂O
- Eichkurve 2: BSA gelöst in Storage Buffer des Qproteome Mitochondria Isolation Kit
- Eichkurve 3: BSA gelöst in Phosphat gepufferte Kochsalzlösung + Magnesium + Calcium (PBS⁺⁺)

Die Eichkurve 1 (siehe Anhang) wurde als Vergleichseichkurve zu der Eichkurve 2 (siehe Ergebnisse 3.7.) und 3 (siehe Ergebnisse 3.1.) erstellt. Eichkurve 2 und 3 wurden erstellt, um Fehlerquellen bei der Auswertung der in den Versuchen erhobenen Proteinkonzentrationen zu minimieren, da im jeweiligen Lösungsmittel (Qproteome Mitochondria Isolation Kit Storage Buffer oder PBS⁺⁺) Substanzen enthalten sein können, die mit einer Proteinbestimmung interferieren. Für die Ausgangslösung wurde 5 mg BSA in 1 ml Flüssigkeit gelöst (Konzentration 50 µg/10 µl) und hieraus eine Verdünnungsreihe erstellt (siehe Tab. 5).

Tabelle 5: Verdünnungsreihe des BSA-Standards

Verdünnung	Protein- konzentration [µg/10 µl]	BSA- Ausgangslösung (5 mg/1ml) [µl]	H₂O / PBS⁺⁺/ Storage Buffer [µl]	Eingesetzte Probenmenge [µl]
1	60	12	-	12
2	50	10	-	10
3	40	80	20	10
4	30	60	40	10
5	20	40	60	10
6	10	20	80	10
7	5	10	90	10
8	2.5	25 (von Lösung F anstatt BSA- Standard)	75	10

Verdünnungsreihe BSA Standard zur Eichkurvenerstellung für die Auswertung der bei der Proteinbestimmung von Zell- und Mitochondriensuspensionen erhobenen Werte. Eichkurven siehe 3.1., 3.7. und Anhang.

2.2.7.5. Proteinbestimmung bei intakten Zellen

Um einen guten Messbereich zu erzielen wurden die Proben mit Kelly-Zellen auf eine Konzentration von $0,1 \times 10^6$ Zellen/10 μ l verdünnt, die Proben mit SK-N-SH-Zellen auf eine Konzentration von $0,2 \times 10^6$ Zellen/10 μ l. Die Proteinmenge wurde graphisch mit Hilfe der Eichkurve 3 (PBS⁺⁺) bestimmt.

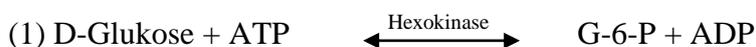
2.2.7.6. Proteinbestimmung bei Mitochondrien

Die Proben mit den isolierten Mitochondrien wurden unverdünnt für die Messung eingesetzt. Die Proteinmenge wurde graphisch mit Hilfe der Eichkurve mit Storage Buffer als Lösungsmittel bestimmt. Da keine 100%ige Reinheit der isolierten Mitochondrien vorausgesetzt werden konnte, wurde mit Hilfe der Proteinmenge abgeschätzt, wie die Mitochondrienkonzentration der verschiedenen Proben in Relation zu einander stehen. Somit konnten die Messergebnisse der Sauerstoffmessungen in Relation zueinander gesetzt werden.

2.2.8. Photometrische Glukosebestimmung

2.2.8.1. Prinzip und Enzymatische Reaktion der photometrischen Glukosebestimmung

D-Glukose und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) werden durch das Enzym Hexokinase umgesetzt. Dabei wird D-Glukose unter gleichzeitiger Bildung von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) zu D-Glukose-6-phosphat (G-6-P) phosphoryliert.



NADP⁺ oxidiert G-6-P in Gegenwart des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) zu D-Gluconat-6-Phosphat. Dabei entsteht reduziertes NADPH.



Die während der Reaktion (2) gebildete NADPH-Menge ist der umgesetzten D-Glukose-Menge äquivalent und wird daher als Messgröße verwendet. Die NADPH-Konzentration wurde photometrisch bei 365 nm bestimmt (D-Glucose UV-Test, Testbeschreibung).

2.2.8.2. Durchführung der photometrischen Glukosebestimmung

Zur Glukosebestimmung wurden folgende Lösungen eingesetzt (D-Glucose UV-Test):

Lösung A: Gemisch aus Triethylamin-Puffer (pH 7,6), NADP⁺, ATP und Magnesiumsulfat)

Lösung B: Lösung mit Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase.

Definierte Volumina (siehe Tab. 6 und 7) der Lösung A, der Probe und Ampuwa wurden in einer Küvette sorgfältig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 3 min erfolgte die Messung der Extinktion E_1 . Anschließend wurde die Lösung B hinzugegeben und damit die enzymatischen Reaktionen gestartet. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 16 min wurde die Extinktion E_2 gemessen. Alle Bestimmungen wurden bei Zimmertemperatur in Halbmikroküvetten von 1 cm Schichtdicke gegen eine Wellenlänge von 365 nm durchgeführt. Zu jeder Bestimmungsreihe wurde ein Leerwert mitgeführt (D-Glukose UV-Test, Testbeschreibung). In Tab. 6 ist das Pipettierschema für die photometrische Bestimmung des Glukosegehaltes bei unterschiedlichen Glukoseausgangskonzentrationen im Zellmedium dargestellt. Dieses Pipettierschema wurde für den in 2.2.10.7. (Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen) dargestellten Versuchsaufbau verwendet. In Tab. 7 ist das Pipettierschema für die photometrische Glukosebestimmung des in 2.2.10.10. (Einfluss von DCA auf Neuroblastomzellen) beschriebenen Versuches dargestellt.

Tabelle 6: Pipettierschema 1 für die photometrische Bestimmung von Glukose (Versuch 2.2.10.7)

In Küvette pipettieren (Gesamtvolumen: 0,755 ml)	Leerwert [ml]	c(Glukose) = 0 µmol/ml [ml]	c(Glukose) = 1 µmol/ml [ml]	c(Glukose) = 5 µmol/ml [ml]
Lösung A	0,250	0,250	0,250	0,250
Probe	-	0,025	0,050	0,025
Ampuwa	0,500	0,475	0,450	0,475
Mischen, nach ca. 3 min Messung von E ₁ , anschließend starten der Reaktion durch Zugabe von				
Lösung B	0,005	0,005	0,005	0,005
Mischen, nach 15 min Messung von E ₂				

Tabelle 7: Pipettierschema 2 für die photometrische Bestimmung von Glukose (Versuch 2.2.10.10)

In Küvette pipettieren	Leerwert [ml]	Probe c(Glukose) ≥ 10 mmol/l
Lösung A	0,250	0,250
Probe	-	0,012
Ampuwa	0,500	0,488
Mischen, nach ca. 3 min Messung von E ₁ , anschließend starten der Reaktion durch Zugabe von		
Lösung B	0,005	0,005
Mischen, nach 15 min Messung von E ₂		

2.2.8.3. Berechnung der Glukosekonzentration

Zunächst wurde aus den gemessenen Extinktionen für Leerwert und Probe die jeweilige Extinktionsdifferenz $E_2 - E_1$ berechnet. Von der Extinktionsdifferenz der Probe wurde die Extinktionsdifferenz des Leerwertes abgezogen (D-Glucose UV-Test, Testbeschreibung).

$$(1) \Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

Die Berechnung des Glukosewertes in [g D-Glucose/l Probelösung] erfolgte gemäß folgender Formel

$$(2) c_{\text{Glukose}} [\text{g/l}] = ((V \times \text{MG}_{\text{Glukose}}) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)) \times \Delta E [\text{g/l}]$$

V = Gesamtvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht D-Glucose [g/mol] = 180.16

d = Schichtdicke [cm]

$\epsilon = 3,5 [1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$

Die Umrechnung in mmol/l erfolgte gemäß folgender Formel

$$(3) c_{\text{Glukose}} [\text{mmol/l}] = c_{\text{Glukose}} [\text{g/l}] \times 5,55$$

2.2.9. Photometrische Laktatbestimmung

2.2.9.1. Prinzip und enzymatische Reaktion der photometrischen Laktatbestimmung

Laktat wird in Gegenwart von LDH durch NAD^+ zu Pyruvat oxidiert.



Bei dieser Reaktion liegt das Gleichgewicht auf der Seite von Laktat. Durch eine nachgeschaltete Reaktion mit dem Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase kann das Pyruvat jedoch abgefangen und somit das Gleichgewicht der ersten Reaktion auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben werden.



Die während der Reaktion (1) gebildete Menge des NADH ist der Menge des Laktats äquivalent. NADH wird daher in dem Test zur photometrischen Laktatbestimmung als Messgröße eingesetzt und seine Konzentration über Extinktionsbestimmung bei 365 nm photometrisch bestimmt (L-Milchsäure UV-Test, Testbeschreibung)

2.2.9.2. Durchführung der photometrischen Laktatbestimmung

Zur Laktatbestimmung wurden folgende Lösungen eingesetzt (L-Milchsäure UV-Test.):

Lösung A: Gemisch aus Glycylglycinpuffer und L-Glutaminsäure

Lösung B: NAD⁺-Lyophilisat

Lösung C: Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Suspension

Lösung D: L-Lactat-Dehydrogenase-Lösung

Im ersten Schritt wurden definierte Volumina (siehe Tab. 8 und 9) von Lösung A, Lösung B, Lösung C, der Probe und Ampuwa in einer Küvette sorgfältig gemischt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die Extinktion E_1 bestimmt. Anschließend wurde die Lösung D hinzugegeben (LDH) und damit die Reaktion (1) (siehe 2.2.9.1.) gestartet. Nach 30 min wurde die Extinktion E_2 bestimmt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur in Halbmikroküvetten von 1 cm Schichtdicke gegen eine Wellenlänge von 365 nm durchgeführt. Zu jeder Messreihe wurde ein Leerwert mitgeführt.

Es wurden zwei Pipettierschemata für die Laktatbestimmung eingesetzt (siehe Tab. 8 und 9). Tab. 8 zeigt das Pipettierschema der in 2.2.10.7. dargestellten Versuche, sowie der Proben t_0 und t_1 der LS Zellreihe in 2.2.10.10.. Tab. 9 stellt das Pipettierschema dar, das für die Laktatbestimmungen der Proben von SK-N-SH- (t_0 - t_4), Kelly- (t_0 - t_4) und LS- (t_2 - t_4) Zellen der in 2.2.10.10. beschriebenen Versuche verwendet wurde.

Tabelle 8: Pipettierschema 1 für die photometrische Bestimmung von Laktat (Versuch 2.2.10.7., sowie Proben t_0 und t_1 der LS-Zellreihe in 2.2.10.10.)

In Küvette pipettieren Gesamtvolumen: 0,747 ml	Leerwert [μl]	Probe [μl]
Lösung A	333	333
Lösung B	67	67
Lösung C	7	7
Probelösung	-	100
Ampuwa	333	233
Mischen, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E_1). Dann Reaktion starten durch Zugabe von:		
Lösung D	7	7
Mischen, nach ca. 30 min Extinktion E_2 messen.		

Tabelle 9: Pipettierschema 2 für die photometrische Bestimmung von Laktat (Versuch 2.2.10.10)

In Küvette pipettieren Gesamtvolumen : 0,747 ml	Leerwert [μl]	Probe [μl]
Lösung A	333	333
Lösung B	67	67
Lösung C	7	7
Probelösung	-	33
Ampuwa	333	300
Mischen, nach ca. 5 min Extinktionen der Lösungen messen (E_1). Dann Reaktion starten durch Zugabe von:		
Lösung C	7	7
Mischen, nach ca. 30 min Extinktion E_2 messen.		

2.2.9.3. Berechnung der Laktatkonzentration

Zunächst wurde zur Berechnung des Laktatwertes aus den gemessenen Extinktionen für Leerwert und Probe die jeweilige Extinktionsdifferenz $E_2 - E_1$ berechnet. Von der Extinktionsdifferenz der Probe wird die Extinktionsdifferenz des Leerwertes abgezogen (L-Milchsäure, UV-Test, Testbeschreibung).

$$(1) \Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

Die Berechnung des Laktatwertes in [g Laktat/l Probelösung] erfolgte gemäß folgender Formel

$$(2) c_{\text{Laktat}} [\text{g/l}] = ((V \times \text{MG}_{\text{Laktat}}) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)) \times \Delta E [\text{g/l}]$$

V = Gesamtvolumen [ml]

v = Probevolumen [ml]

MG = Molekulargewicht Laktat [g/mol] = 90.1

d = Schichtdicke [cm] = 1

ϵ = 3,4 [$l \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

Die Umrechnung in mmol/l erfolgte gemäß folgender Formel

$$c_{\text{Laktat}} [\text{mmol/l}] = c_{\text{Laktat}} [\text{g/l}] \times 11,1$$

2.2.10. Sauerstoffverbrauchsmessung

Bei der Messung der Respirationsrate mittels des 928 6-Channel Dissolved Oxygen System handelte es sich um eine Methode, die vor Beginn der Messungen zunächst etabliert werden musste. Es folgt daher eine genaue Beschreibung des während der Etablierung als optimal festgestellten Versuchsaufbaus und der Versuchsdurchführung.

2.2.10.1. Messprinzip der Sauerstoffmessung mittels der Clark-Elektroden

Das zur Sauerstoffverbrauchsmessung verwendete Gerät 928 6-Channel Dissolved Oxygen System beruht auf dem Grundprinzip der Clark-Elektrode (siehe Abb. 7). Dabei wird durch Anlegen einer negativen Spannung an einer wasserbenetzten Platinelektrode der sich an ihrer Oberfläche diffundierende Sauerstoff durch Anlagerung von Elektronen zu Wasser reduziert.

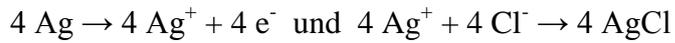
Die verwendeten Messelektroden (Abb. 7) bestehen jeweils aus einem Platindraht (Kathode) und einem Silberdraht (Anode), die als Bezugslektrode dient. Die Silber-Anode und Platin-Kathode sind mittels einer KCl-gesättigten Elektrolytlösung (KCl-Brücke) miteinander verbunden. Die Elektroden sind vom Reaktionsgefäß durch eine sauerstoffpermeable Polypropylenmembran vom Reaktionsgefäß getrennt (Clark, 1959).



Abb. 7: 1302 Microcathode Oxygen Electrode von Strathkelvin Instruments. Diese Elektrode beruht auf dem Prinzip der Clark-Elektrode und wurde für die Sauerstoffverbrauchsmessungen verwendet. (SI Instruction Manual). Erklärungen siehe Text.

Wird nun eine Spannung von -650 mV an die Kathode angelegt, wird diese ständig polarisiert. Folgende Reaktionen treten in diesem Fall auf (Delieu und Walker, 1972) (siehe Abb.8):

Reaktionen an der Anodenoberfläche:



Reaktionen an der Kathodenoberfläche:

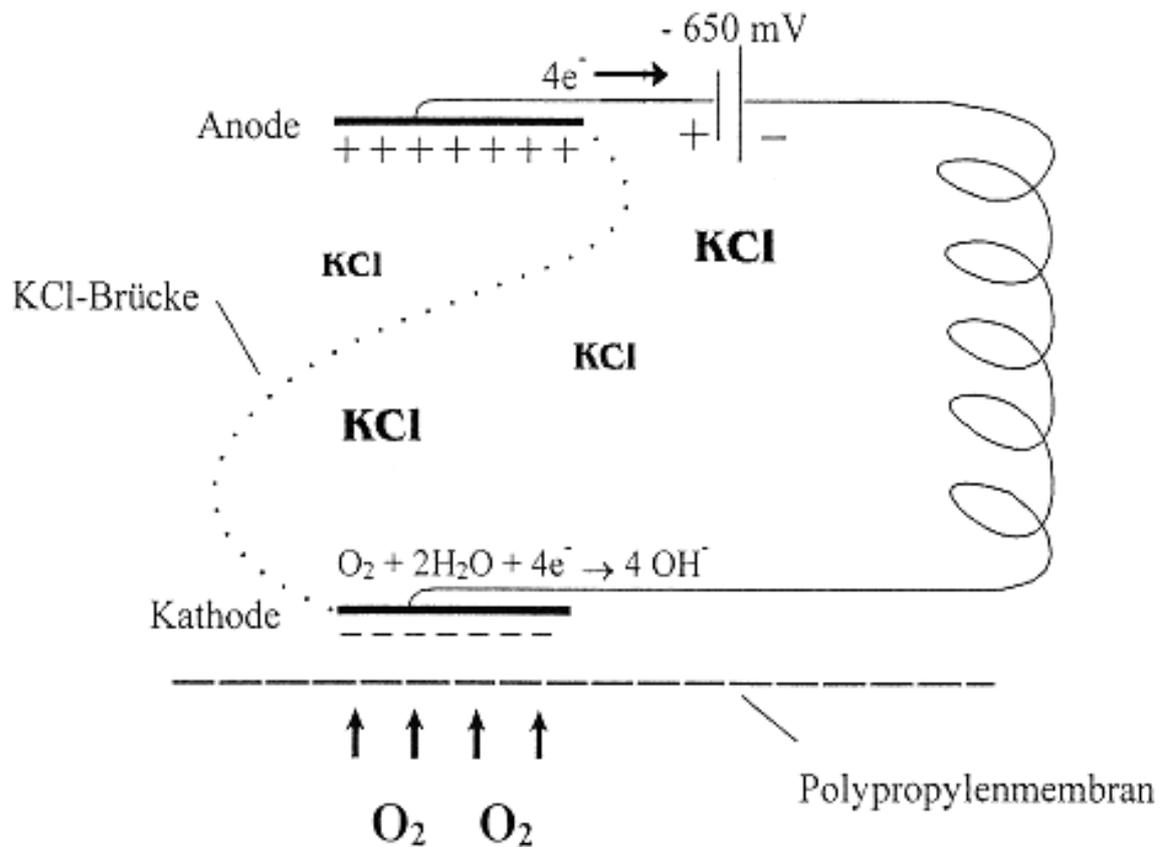
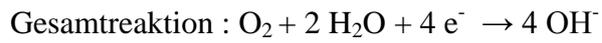
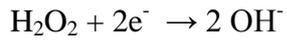
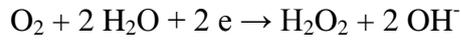


Abb. 8: Reaktionen an der Clark-Elektrode. Erklärung siehe Text (Abb. aus Hess, 2005: S. 25).

Der aus dem Reaktionsgefäß durch die Polypropylenmembran an die Platinelektrode diffundierende Sauerstoff dient in dieser Reaktion als Elektronenakzeptor und wird zu OH^- reduziert. Die KCl-Elektrolytlösung ist gepuffert und entfernt so das an der Kathode entstehende OH^- (Delieu und Walker, 1972; Gleichmann und Lübbers, 1960).

Die Menge des zur Kathode durchdiffundierten und reduzierten Sauerstoffs ist gleich der Sauerstoffmenge im Medium des Reaktionsgefäßes. Daher ist der fließende Strom proportional dem verbrauchten Sauerstoff an der Kathode und dies erlaubt einen Rückschluss auf die Sauerstoffkonzentration im Reaktionsgefäß. Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, dass während der Messung durch ständiges Rühren mit einem Magnetrührer in der Lösung des Reaktionsgefäßes ein Sauerstoffkonzentrationsausgleich geschaffen wird. Wird die Lösung nicht ständig gerührt, bildet sich ein pO_2 -Gradient zwischen Reaktionslösung und Kathode aus. Es wird die Diffusionsstrecke für den in der Lösung vorhandenen Sauerstoff zu groß und der noch vorhandene Sauerstoff an der Kathodenoberfläche wird schnell reduziert. Als Folge wird letztendlich eine zu geringe Sauerstoffkonzentration gemessen (SI Instruction Manual, 1998).

Insgesamt wird die Sauerstoffmessung von folgenden Faktoren beeinflusst:

- pO_2 der Reaktionslösung
- Permeabilität der Polypropylenmembran
- Temperatur
- Größe der Kathodenoberfläche

Steigt einer dieser Faktoren an, steigt auch die gemessene Spannung bzw. der gemessene Sauerstoffgehalt (SI Instruction Manual, 1998).

Zwischen den Messungen wurde das 928 Interface Gerät nicht ausgeschaltet, um den Polarisierungsstrom zu gewährleisten. Die Messwerte wurden durch ein 6-Kanal-Meßgerät (928 Oxygen Interface) registriert und mit Hilfe der dazugehörigen Software (928 Software, Stathkelvin Instruments) graphisch dargestellt und ausgewertet.

2.2.10.2. Aufbau der Versuchsapparatur

Der Versuchsaufbau bestand aus 3 gläsernen Messzellen mit jeweils einer Reaktionskammer. Die Messzellen konnten über eine Wasserpumpe an einen Thermostat angeschlossen werden, so dass die Reaktionskammern konstant mit 37°C warmen Wasser umspült wurden. Während der Etablierung der Methode wurde die Temperatur in den verschiedenen Reaktionskammern überprüft und dabei festgestellt, dass in allen 3 Kammern die Temperatur unter diesen Bedingungen konstant bei $37 \pm 0,5$ °C war. Die Messzellen waren auf einem Magnetrührer befestigt und in jeder Reaktionskammer befand sich ein Magnetschwimmer (Versuchsaufbau siehe Abb. 9). Die Elektroden mit Elektrodenhalter (siehe Abb. 10) wurden so in die Reaktionskammern eingeführt, dass der Stempel des Elektrodenhalters den Messraum luftdicht abschloss. Dazu konnte der Stempel des Elektrodenhalters gedreht werden und eventuell im Reaktionsraum vorhandene Luftblasen konnten über eine Rinne im Elektrodenhalter entweichen. Während der Sauerstoffverbrauchsmessungen bei isolierten Mitochondrien befand sich in dieser Rinne ein Kanüle über die mit Hilfe einer Hamilton Spritze die Succinat-Zugabe erfolgte. Die Elektroden waren an das 928 Oxygen Interface und dieses wiederum an einen Computer angeschlossen. Somit konnten alle Einstellungen der Elektroden sowie die Aufzeichnung der Ergebnisse über das 928 Softwareprogramm von Strathkelvin Instruments erfolgen. Nach jeder Messung wurden die Messkammern mit destilliertem Wasser gespült (Gerber, 1995; Hess, 2005).

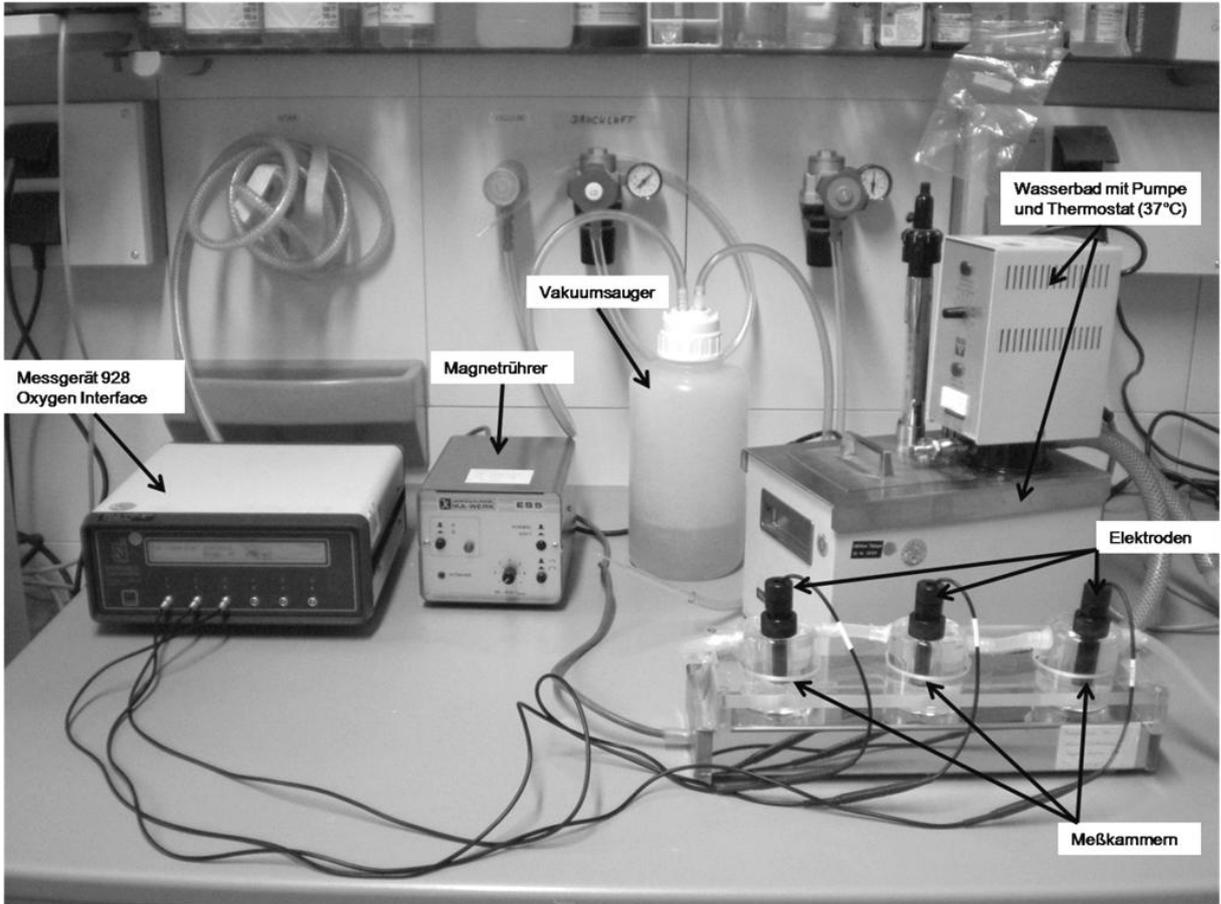


Abb. 9: Versuchsanordnung zur Sauerstoffverbrauchsmessung. Erklärung siehe Text.

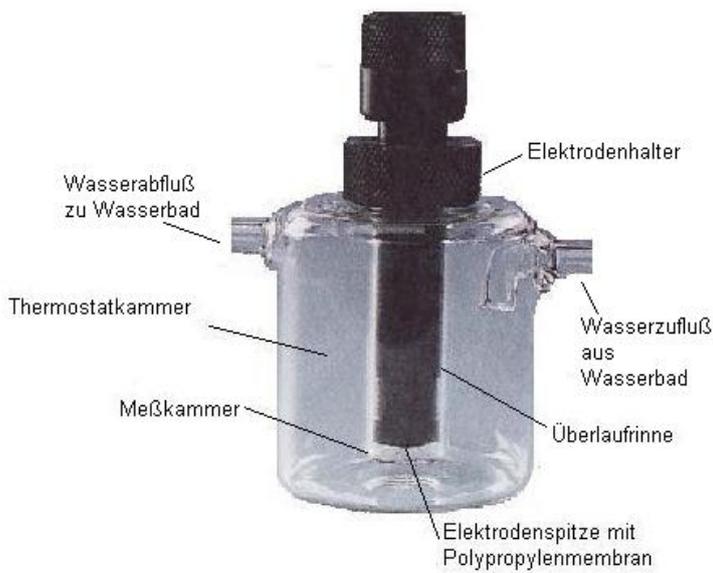


Abb. 10: Messzelle mit Messkammer zur Bestimmung der Respirationsrate

2.2.10.3. Kalibrierung der Sauerstoffelektrode

Die Kalibrierung wurde vor jedem Experiment bei 37°C (Messtemperatur) durchgeführt. Die Einstellungen für die Kalibrierung wurden über das Softwareprogramm vorgenommen. Mindestens eine halbe Stunde vor Beginn der Kalibrierung wurde der Temperaturregler auf 37°C eingestellt, um die Elektroden bei dieser Temperatur zu stabilisieren. Zur Vorbereitung wurde PBS⁺⁺ auf 37°C erwärmt und im Wasserbad mit Luft mindestens 30 min durchperlt, um eine luftgesättigte Lösung zu erhalten. Die zur Null Punkt Bestimmung verwendete Borat-Sulfit-Lösung (1000 ml enthaltend 381 g Di-Natrium-Tetraborat-Decahydrat + 20 g Natriumsulfit) wurde vor Verwendung ebenfalls auf 37°C erwärmt. Vor Beginn der Kalibrierung musste im Softwareprogramm ein berechneter Maximalwert des Sauerstoffgehaltes der luftgesättigten PBS⁺⁺-Lösung eingegeben werden, damit das Programm die übermittelten Werte der Elektroden umrechnen konnte. Dieser Maximalwert wurde während der Etablierung der Methode einmal berechnet und dann für die Kalibrierung vor allen Messungen beibehalten, auch wenn sich das Reaktionsmedium änderte. Dies konnte auf Grund des Messprinzips im geschlossenen System erfolgen, bei dem nur die Sauerstoffabnahme bestimmt wird (SI Instruction Manual, 1998)

2.2.10.3.1. Berechnung des Maximalwertes

Zur Berechnung des Maximalwertes der Kalibrierung wurde zunächst die Sauerstoffkonzentration in einer mit 100 % Luft gesättigten NaCl-Lösung bestimmt. Um den Sauerstoffgehalt in einer Lösung zu berechnen benötigt man den Sauerstoffpartialdruck und den Bunsen'schen Absorptionskoeffizient bei Versuchstemperatur (in diesem Fall 37°C). Die Berechnung des gelösten Sauerstoffes (L) im Medium erfolgt nach folgender Formel:

$$L = \alpha \times pO_2 \times 1/760 \text{ [ml O}_2\text{/ml Medium]}$$

α = Bunsen'scher Löslichkeitskoeffizient bei 37° C

pO_2 = Sauerstoffpartialdruck

Für die Kalibrierung wurde die Sauerstoffkonzentration und α für den Maximalwert einmalig mit Hilfe einer Sauerstofflöslichkeitstabelle (Tab. 10) eine Graphik (Abb. 11) erstellt. Mit Hilfe dieser Graphik wurde die Sauerstoffkonzentration von 5 ml O_2 / l PBS^{++} bei $pO_2 = 760$ torr und $37^\circ C$ bestimmt.

Umrechnung in $\mu mol/l$ (SI Instruction Manual, 1998):

$$1 \text{ mg } O_2 = 0,7 \text{ ml } O_2 = 31,251 \mu \text{mol } O_2$$

$$5 \text{ ml } O_2 \times l^{-1} \text{ PBS}^{++} \times 31,251 \mu \text{mol} \times 0,7 \text{ ml}^{-1} = 223,22 \mu \text{mol/l}$$

Es wurde für alle Versuche ein Maximalwert von $223 \mu mol/l$ verwendet.

Tabelle 10: Sauerstofflöslichkeitstabelle (übernommen aus SI Instruction Manual: S. 60/61)

Temperatur [$^\circ C$]	Sauerstoffkonzentration einer 100% luftgesättigten Ringer Lösung [ml O_2/l Medium] bei $pO_2 = 760$ torr	Bunsen'scher Koeffizient α [ml O_2/ml Medium] bei $pO_2 = 760$ torr
10	10,05	0,0480
15	7,12	0,0340
20	6,49	0,0310
25	5,97	0,0285
30	5,44	0,026
35	5,13	0,0245
40	4,81	0,023

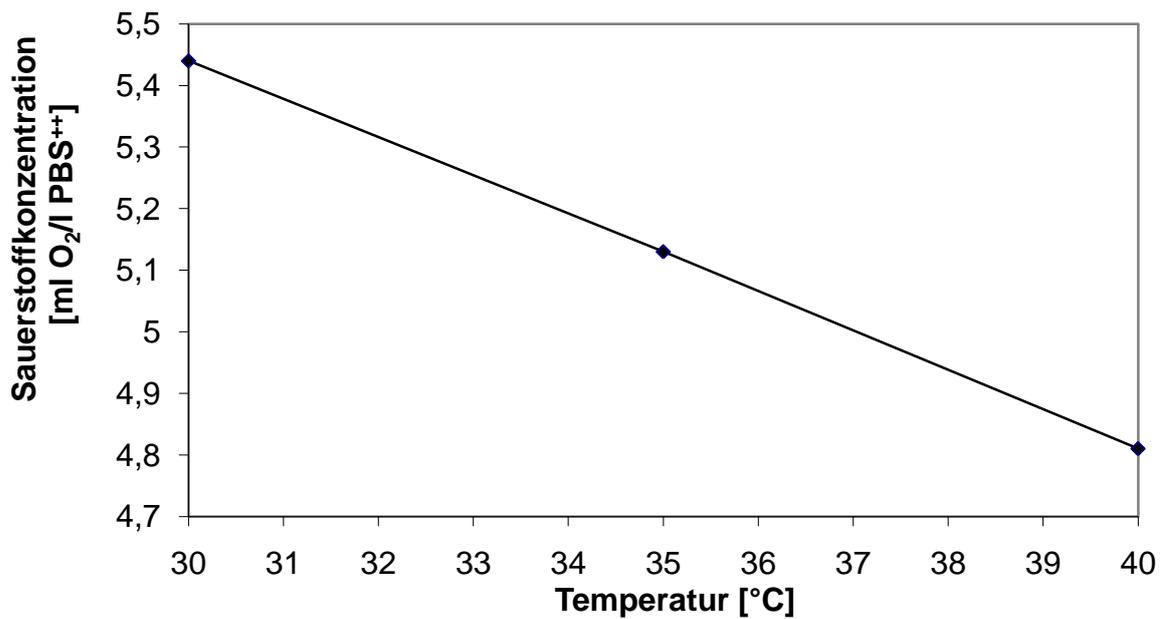


Abb. 11: Darstellung der Sauerstoffkonzentration in Abhängigkeit von der Temperatur bei $pO_2 = 760$ torr zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration bei $37^\circ C$.

2.2.10.3.2. Kalibrierung

Zunächst wurde der Null-Wert der Elektrode kalibriert. Dazu wurde die Elektrode 1 ml Borat Sulfit Lösung ausgesetzt und mindestens eine Minute abgewartet bis die Elektrode stabile Werte anzeigte (SI Instruction Manual, 1998). Zur Kalibrierung des Maximal-Wertes wurde 1 ml luftgesättigte PBS⁺⁺-Lösung in die Messkammer gefüllt und diese mit der Messelektrode luftdicht verschlossen. Die Elektrode brauchte erfahrungsgemäß ca. 3-4 Minuten um sich auf den Maximalwert ($223 \mu\text{mol/l}$) zu stabilisieren. Nach der Kalibrierung konnte mit dem jeweiligen Experiment begonnen werden. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Elektroden nach der Kalibrierung mehrere Stunden stabile Werte anzeigten.

2.2.10.4. Auswertung der Sauerstoffverbrauchsmessungen

Die Verbrauchsmessungen wurden mit Hilfe der „Analysis of Data“ Funktion des 928-Softwareprogrammes ausgewertet. Mit dem Programm konnten die absoluten Werte des Sauerstoffgehaltes in den Messkammern und die Sauerstoffabnahmerate über einen bestimmten Zeitraum berechnet werden. Die Sauerstoffabnahmerate wurde mittels Trendlinien der während des Versuches erstellten Graphen berechnet (siehe Abb.12). Für die Berechnung der Raten wurde jeweils der Zeitraum gewählt, in dem sich während des Versuches eine konstante Abnahme des Graphen eingestellt hatte. Für die Auswertung der Versuchsergebnisse wurden die Abnahmeraten verwendet. Die vom Programm ermittelten Werte wurden in $\mu\text{mol}/\text{min}$ angegeben. Zur Auswertung der Ergebnisse sind die Respirationsraten in $\text{nmol}/(\text{min} \times \text{Zellenzahl})$ angegeben, da sich immer eine definierte Zellzahl in jeder Reaktionskammer befand.

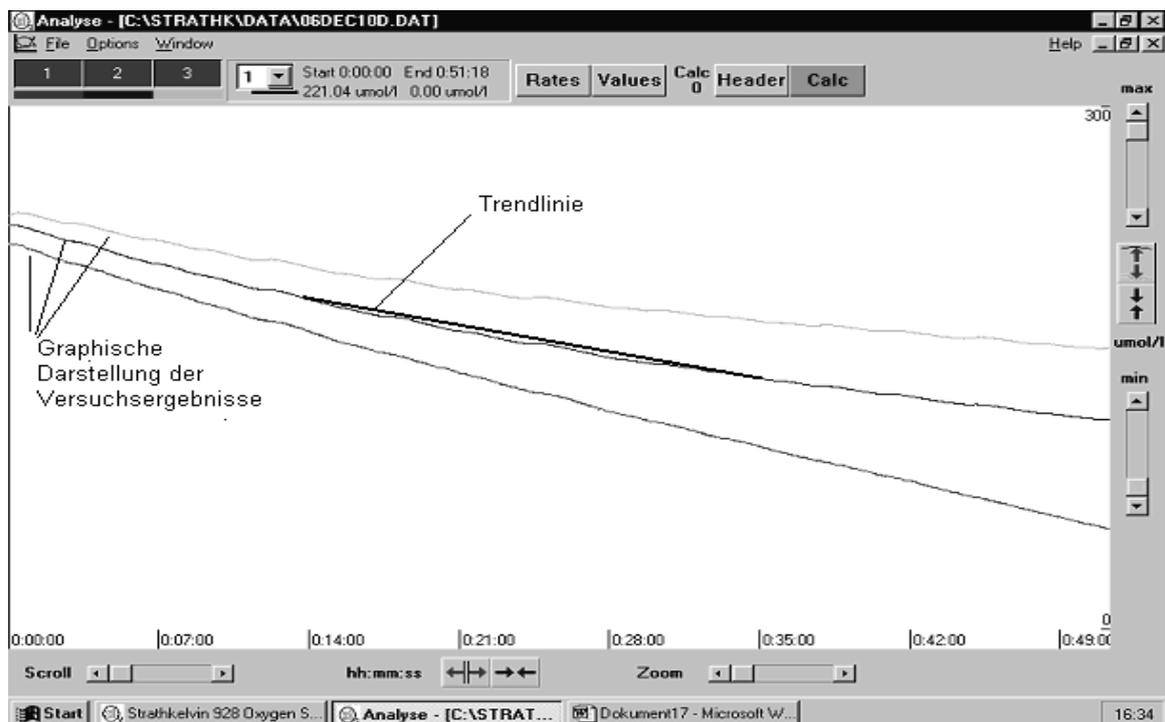


Abb. 12: Graphische Auswertung der Messergebnisse der Sauerstoffelektroden zur Bestimmung der Respirationsrate mittels der Strathkelvin Software. Jeder Graph stellt die Aufzeichnung der Sauerstoffabnahme in einer Messkammer da. Der Versuchsaufbau erlaubte die parallele Aufzeichnung der Sauerstoffabnahme von 3 Messkammern.

2.2.10.5. Vorversuche

Es wurden Vorversuche zur Etablierung der Methode und des oben beschriebenen Kalibrierungsablaufes durchgeführt. Aus den Vorversuchen ergab sich, dass auf Grund der Temperaturempfindlichkeit der Elektroden alle Lösungen vor der Kalibrierung oder Messung auf 37°C angewärmt sein müssen, da sich sonst signifikante Veränderungen in den Messergebnissen ergeben. In mehreren Testreihen war ersichtlich, dass die Sauerstoffverbrauchsrate der Zellen durch die Suspensionslösung in der Reaktionskammer verändert wird. Auf Grund dieser Beobachtungen wurden anschließend Versuchsreihen zum Vergleich des Effektes von PBS⁺⁺ als Reaktionsmedium gegenüber RPMI 1640* als Reaktionsmedium gemacht.

2.2.10.6. Zellzahlfestlegung

Dieser Versuchsaufbau wurde jeweils einmal für die Zelllinien Kelly und SK-N-SH durchgeführt. Hierdurch wurde die Zellzahl festgelegt, bei der die Respirationsrate in einem gut messbaren Bereich lag. Zudem wurde festgestellt, wie sich die lineare Zunahme der Zellzahl auf die Respirationsrate auswirkt. Der Versuch wurde für die Zellzahl 3×10^6 Zellen/ml, 2×10^6 Zellen/ml und 1×10^6 Zellen/ml durchgeführt. Als Reaktionsmedium wurde für jede Zellreihe einmal PBS⁺⁺ und einmal RPMI 1640* verwendet, um den Einfluss des Reaktionsmediums auf die Respirationsrate zu testen. Versuchsansätze siehe Tab. 11.

Tabelle 11: Zellzahlfestlegung: Versuchsansätze

Versuch	Zelllinie	Reaktionsmedium	Zellzahl/ml
1	Kelly	PBS ⁺⁺	1×10^6
2			2×10^6
3			3×10^6
4	SK-N-SH		1×10^6
5			2×10^6
6			3×10^6
7	Kelly	RPMI 1640*	1×10^6
8			2×10^6
9			3×10^6
10	SK-N-SH		1×10^6
11			2×10^6
12			3×10^6

Durchführung

Zunächst wurden die Elektroden wie in 2.2.10.3. beschrieben kalibriert. Dann wurden Zellen (SK-N-SH oder Kelly) aus einer Zellkulturflasche geerntet, abzentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde die Zellzahl auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt und eine Verdünnungsreihe (siehe Tab. 12) erstellt. Pro Reaktionskammer wurde 1 ml Zellsuspension eingefüllt. Probe A, B und C wurden parallel gemessen. Die Messzeit betrug 45 Minuten.

Tabelle 12: Versuch zur Zellzahlfestlegung: Verdünnungsreihe

Probe	Zellzahl [Zellen/ml]	Zellsuspension [µl]	Reaktionsmedium: PBS ⁺⁺ oder RPMI 1649* [µl]
A	3×10^6	1000	-
B	2×10^6	1000	500
C	1×10^6	500	1000

2.2.10.7. Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen

Dieser Versuchsansatz wurde mit den Zelllinien Kelly, SK-N-SH und LS durchgeführt. Es wurde der Sauerstoffverbrauch von 2×10^6 Zellen/ml bei 37°C und verschiedenen Glukosekonzentrationen (0, 1 und 5 $\mu\text{mol/ml}$) bestimmt. Die Glukosekonzentration von 5 $\mu\text{mol/ml}$ wurde ausgewählt, da sie annäherungsweise der physiologischen Glukosekonzentration entspricht. Mit einem Glukoseangebot von 1 μmol Glukose/ml sollte geprüft werden, ob unterschiedliche hohe Glukoseangebote einen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch besitzen. Eine glukosefreie Kontrolle wurde mitgeführt. Das Reaktionsmedium war PBS^{++} . Jeder Versuchsansatz bestand aus 3 Reaktionsansätzen (siehe Tab. 13).

Tabelle 13: Einfluss von Glukose auf die Respirationsrate von Neuroblastomzellen: Reaktionsansätze

Reaktionsansatz	Zellzahl (Zellen/ml)	Glukose Konzentration
1	2×10^6	0 $\mu\text{mol/ml}$
2	2×10^6	1 $\mu\text{mol/ml}$
3	2×10^6	5 $\mu\text{mol/ml}$

Durchführung

Zunächst wurde eine PBS^{++} Lösung mit $[\text{Glukose}] = 10 \mu\text{mol/ml}$ und eine mit $[\text{Glukose}] = 2 \mu\text{mol/ml}$ hergestellt.

Die Zellen einer Zellflasche wurden geerntet, abzentrifugiert und in 2 ml auf 4°C vorgekühltem PBS^{++} resuspendiert und die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt. Während der Bestimmung wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die Zellzahl der Zellsuspension auf 2×10^6 Zellen/500 μl eingestellt, damit pro Reaktionsansatz eine Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml erreicht werden konnte (siehe Tab. 14). Nachfolgend wurden mit den vorgekühlten

Lösungen die Reaktionsansätze hergestellt (siehe Tab. 14). Die Reaktionsansätze wurden 15 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert, um eine gleichmäßige Temperatur zu gewährleisten. Die drei Versuchsansätze einer Zelllinie wurden parallel gemessen. Exemplarisch wurde parallel zu einer Sauerstoffverbrauchsmessung eine Laktat und Glukosebestimmung, wie in 2.2.8. und 2.2.9. beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 14: Einfluss von Glukose auf die Respirationsrate von Neuroblastomzellen: Pipettierschema

c(Glukose) im PBS ⁺⁺ -Medium	Zellsuspension (2x10 ⁶ Zellen/500 µl PBS ⁺⁺)	10 µmol/ml Glukoselösung	2 µmol/ml Glukoselösung	PBS ⁺⁺
5 µmol/ml f.c.	500 µl	500 µl	-	-
1 µmol/ml f.c.	500 µl	-	500 µl	-
0 µmol/ml f.c.	500 µl	-	-	500 µl

2.2.10.8. Sauerstoffverbrauch von Neuroblastomzellen in normalem Zellkulturmedium (RPMI 1640*)

Dieser Versuch wurde mit den Zellreihen Kelly und SK-N-SH durchgeführt. Es wurden Sauerstoffverbrauchsmessungen für 2x10⁶ Zellen/ml in den Reaktionsmedien RPMI 1640* (enthält 2g/l Glukose, d.h. ca. 11,1 µmol/ml Glukose, Produktinformation siehe Anhang), PBS⁺⁺ mit c(Glukose) = 10 µmol/ml oder glukosefreiem PBS⁺⁺ bei 37°C durchgeführt (siehe Tab. 15).

Tabelle 15: Sauerstoffverbrauch von Kelly-Zellen in RPMI 1640* im Vergleich zu PBS⁺⁺ ± Glukose: Versuchsansätze

Reaktionsansatz	Zellzahl (Zellen/ml PBS ⁺⁺)	Reaktionsmedium
1	2x10 ⁶	RPMI 1640 * c(Glukose) = 11,1 µmol/ml
2	2x10 ⁶	PBS ⁺⁺ c(Glukose) = 10 µmol/ml
3	2x10 ⁶	PBS ⁺⁺ c(Glukose) = 0 µmol/ml

Durchführung

Es wurde eine Zellsuspension mit RPMI 1640* und eine mit PBS⁺⁺ erstellt. Die Zellzahl beider Zellsuspensionen wurde bestimmt und die Zellzahl eingestellt, bei der PBS⁺⁺-Zellsuspension auf 2×10^6 Zellen/ 500 μ l und bei der RPMI 1640*-Zellsuspension auf 2×10^6 Zellen/ml. Um die in Tab. 15 angegebene Endkonzentration von Glukose in den PBS⁺⁺-Proben (2 und 3, siehe Tab.15) zu erhalten, wurde die erstellte PBS⁺⁺-Zellsuspension mit einer Glukosehaltigen PBS⁺⁺-Lösung verdünnt.

Alle drei Reaktionsansätze wurden 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert bevor mit den Messungen begonnen wurde. Es erfolgte eine Parallelmessung der 3 Reaktionsansätze (jeweils 1 ml pro Ansatz).

2.2.10.9. Einfluss der Gegenwart von 2-deoxy-D-Glukose auf die Respirationsrate von Neuroblastomzellen

Dieser Versuch wurde mit den Zellreihen Kelly und SK-N-SH durchgeführt. Es wurden Sauerstoffmessungen mit 2×10^6 Zellen bei 37°C in RPMI 1640* und RPMI 1640* + 1 mmol/l 2-deoxy-D-Glukose (2DG) durchgeführt. Reaktionsansätze siehe Tab. 16.

Tabelle 16: Einflusses von 2-deoxy-D-Glukose auf die Respirationsrate: Reaktionsansätze

Reaktionsansatz	Zellzahl (Zellen/ml)	Reaktionsmedium
1	2×10^6	RPMI 1640*
2	2×10^6	RPMI 1640* c(2DG) = 1 μ mol/ml

Durchführung

Es wurde eine RPMI 1640*-Zellsuspension und eine RPMI 1640* + 1 $\mu\text{mol/ml}$ 2DG-Zellsuspension erstellt. Anschließend wurde in beiden Zellsuspensionen die Zellzahl bestimmt und auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Danach wurden beide Reaktionsansätze 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung.

2.2.10.10. Einfluss von Dichloressigsäure (DCA) auf Neuroblastomzellen

In diesem Versuch wurde der Einfluss einer DCA-Inkubation auf den Sauerstoff- und Glukoseverbrauch sowie die Laktatproduktion von Neuroblastomzellen (Kelly, SK-N-SH und LS) untersucht

Für die DCA Versuche wurde zunächst ein RPMI 1640* Medium mit einer DCA-Konzentration von $1 \mu\text{mol/ml}$ wie folgt hergestellt: Aus einer 100 ml DCA Lösung mit insgesamt 156,3 g DCA ($\text{MG} = 128,94 \text{ g/mol}$, also einer 12,12 molaren Lösung) wurde 1 Volumenanteil (1 ml) zu 11,1 Volumenteilen (11,1 ml) Zellkulturmedium gegeben. Dies ergab eine 1 molare Lösung. Von dieser Lösung wurden 35 μl zu 35 ml Zellkulturmedium gegeben, um ein 1 mM DCA-Zellkulturmedium zu erhalten. Der pH-Wert des DCA-Zellkulturmediums wurde vor Verwendung mittels eines pH-Meters bestimmt und mit Natronlauge (NaOH) auf 7,3 eingestellt.

Versuchsprotokoll

(1) Am ersten Versuchstag wurden aus einer 750 ml-Zellkulturflasche, die einen kompletten Zellrasen der Kelly-Zellreihe, SK-N-SH-Zellreihe oder LS-Zelllinie enthielt, die Zellen geerntet. Danach wurde die Zellzahl bestimmt und 1/3 (Kelly), 1/7 (LS) oder 1/2 (SK-N-SH) der geernteten Zellen wurden pro Zellflasche ausgesät. Es

wurden für jede Zellreihe zwei Zellkulturflaschen (A und B) derselben Passage und Zellzahl (Ausgangszellzahl) ausgesät.

(2) Die Kelly- und LS-Zellkulturflaschen wurden für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt, die SK-N-SH-Zellkulturflaschen für 48 Stunden, damit die Zellen anwachsen konnten.

(3) Nach 24 Stunden (Kellys, LS) bzw. 48 Stunden (SK-N-SH) erfolgte ein Mediumwechsel: Der Zellkulturflasche A wurden 35 ml RPMI 1640* als Medium hinzugefügt. Der Zellkulturflasche B 35 ml RPMI 1640* mit 1 $\mu\text{mol/ml}$ DCA-Zusatz. Beiden Medien wurde vor Zugabe in die Zellkulturflaschen jeweils 400 μl entnommen für die spätere Glucose- und Laktatbestimmung (Wert t_0). Die Mediumproben wurden bei -20°C eingefroren.

(4) Die Zellkulturflaschen A und B wurden für ca. 65 – 80 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 4-8 Stunden (Wert t_1), 20-30 Stunden (Wert t_2) und 40-50 Stunden (Wert t_3) wurden aus jeder Zellkulturflasche jeweils 400 μl Zellkulturmedium entnommen, bei $400g$ und 18°C 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand bei -20°C für die spätere Laktat- und Glukosebestimmung eingefroren.

(5) Nach 72 Stunden wurden der Zellkulturflasche A und B wieder jeweils 400 μl (Wert t_4) entnommen und wie in (4) beschrieben für die Laktat- und Glukosebestimmung vorbereitet. Danach wurden die Zellen geerntet und bei beiden Zellkulturflaschen die Zellzahl bestimmt (Zellzahl IIA und IIB). Für die Sauerstoffverbrauchsmessungen [Messergebnisse A (RPMI 1640* ohne DCA) und B (RPMI 1640* mit DCA-Zusatz, f.c.: 1 $\mu\text{mol/ml}$)] wurde das Zellpellet der Zellkulturflasche B in 1 ml DCA-Zellkulturmedium und das Zellpellet der Zellkulturflasche A in 1 ml RPMI 1640* für die Sauerstoffverbrauchsmessungen resuspendiert.

Für jede Zellreihe wurden die in Tab. 17 aufgeführten Werte ermittelt.

Tabelle 17: Zellversuche mit und ohne DCA-Inkubation: Während der Versuchsdurchführung erhobene Werte

Ergebnisbezeichnung	Beschreibung
Ausgangszellzahl (Zellzahl I)	Zellzahl zu Beginn der Inkubationszeit
Zellzahl II	Zellzahl nach ca. 65 - 80 Stunden Inkubation mit RPMI 1640* oder RPMI 1640* mit 1 μ mol DCA/ml f.c.
Glukose t_0	Ausgangsglukosemenge
Glukose t_1	Glukosekonzentration im Zellmedium nach 4 - 8 Stunden
Glukose t_2	Glukosekonzentration im Zellmedium nach 20 - 30 Stunden
Glukose t_3	Glukosekonzentration im Zellmedium nach 40 -50 Stunden
Glukose t_4	Glukosekonzentration im Zellmedium nach 65 -80 Stunden
Laktat t_0	Ausgangslaktatmenge
Laktat t_1	Laktatkonzentration im Zellmedium nach 4 - 8 Stunden
Laktat t_2	Laktatkonzentration im Zellmedium nach 20 - 30 Stunden
Laktat t_3	Laktatkonzentration im Zellmedium nach 40 - 50 Stunden
Laktat t_4	Laktatkonzentration im Zellmedium nach 65 - 80 Stunden
Respirationsrate	Messung der zellulären Respirationsrate nach Inkubation mit RPMI 1640* oder RPMI 1640* mit 1 μ mol DCA / ml f.c.

2.2.10.11. Sauerstoffverbrauch von Neuroblastommitochondrien

Prinzip

Durch die Registrierung der Respirationsraten von Mitochondrien kann die Substratveratmung sowie die Kopplung des Sauerstoffverbrauches an die ADP-Phosphorylierung bestimmt werden. Die wichtigsten natürlichen Substrate der oxidativen Phosphorylierung sind NADH und Succinat. Succinat kann bei intakter mitochondrialer Membran über Carrier in die mitochondriale Matrix transportiert werden und wurde daher für diesen Versuch als Substrat verwendet. Die mitochondriale Respirationsrate wird je nach Substratangebot in verschiedene Stadien eingeteilt (siehe Tab. 18). Die Succinatzugabe induziert das Stadium 4, die Zugabe von ADP das Stadium 3 (siehe Tab. 18). Das für die Phosphorylierung benötigte Phosphat war im Überschuss in den Messpuffern vorhanden.

Tabelle 18: Stadieneinteilung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches

Stadium	Bezeichnung	Im Überschuss vorhanden	Respirationsrate begrenzt durch
1		O ₂	ADP und Substrat
2	Zustand der Substratverarmung	O ₂ , ADP	Substrat
3	Aktiver oder unkontrollierter Zustand	O ₂ , ADP, Substrat	Protonengradient
4	Inaktiver oder kontrollierter Zustand	O ₂ , Substrat	ADP
5	Anaerober Zustand	ADP, Substrat	O ₂
Entkoppelt		O ₂ , Substrat, ADP hat keinen Einfluss mehr auf Respirationsrate	Maximalgeschwindigkeit des Elektronentransports

Versuchsdurchführung

Es wurden für die Versuche Mitochondrien der Zelllinien Kelly, SK-N-SH und LS verwendet. Zur Vorbereitung der Versuche wurden einmalig die Messpuffer A und B gemäß Protokoll (Kleber et al., 1997) hergestellt. Für den Messpuffer A wurde TrisHCl-Puffer (20 mmol/l, pH 7,4) hergestellt [Messpuffer A enthält: Saccharose (0,225mol/l), K-Phosphatpuffer (10 mmol/l, pH 7,4), MgCl₂ (5 mmol/l) und KCl (20 mmol/l)]. Anschließend wurde der pH-Wert überprüft (6,5) und mit 1 mol/l KOH auf pH 7,4 titriert. Vor jedem Versuch wurde der pH-Wert des Messpuffers überprüft und gegebenenfalls wieder auf pH 7,4 titriert (Kleber et al., 1997). Für den Messpuffer B wurden 0,1 M KH₂PO₄ und 0,1 M K₂HPO₄ gegeneinander bis zu einem pH-Wert von 7,4 titriert. Vor jedem Versuch wurde eine Succinat – (1,75 mol/l) sowie ADP-Lösung (10 mmol/l) in Messpuffer B hergestellt.

Zunächst wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen geerntet und die gesamte Zellzahl der zur Mitochondrienisolierung eingesetzten Zellen bestimmt. Die Mitochondrienisolierung erfolgt mit Hilfe des Qproteome Mitochondria Isolation Kit wie in 2.2.6. beschrieben. Die Zellzahl der zur Mitochondrienisolation verwendeten Ausgangszellzahl variierte hierbei sehr und zudem wurde auf Grund des Isolierungsvorganges (siehe Abb.1) von einem hohen Zellverlust während der einzelnen Versuchsschritte ausgegangen. Daher wurde zur ungefähren Bestimmung der Mitochondrienmenge in jeder Isolation vor der Weiterverwendung der Mitochondriensuspension 10-20 µl zur späteren Proteinbestimmung bei –20°C eingefroren. 100 µl der Mitochondriensuspension wurden pro Reaktionskammer zur Sauerstoffverbrauchsmessung eingesetzt. In jede Versuchskammer wurde zunächst 1 ml Messpuffer A gegeben und bei eingeschaltetem Rührer 5 min belassen, um sich auf 37°C vorzuwärmen. Dann wurden 100 µl Mitochondrien-Storage-Buffer-Suspension pro Versuchskammer dazugegeben und die Versuchskammer mit der Elektrode verschlossen. Das System brauchte auf Grund des Temperaturunterschiedes in der Regel 5 min um sich zu stabilisieren, danach stellte sich die basale Respirationsrate der Mitochondrien ein. Nach ca. 15 – 20 min wurden 50 µl Succinat (1,75 mol/l) mit Hilfe einer Hamilton Spritze über den Zuführungsgang zugegeben. Nachdem sich die

Respirationsrate stabilisiert hatte, wurden 50 µl ADP (10 mmol/l) ebenfalls über die Hamilton Spritze hinzugegeben und erneut die Respirationsrate bestimmt (Versuchsprotokoll modifiziert nach Kleber et al., 1997).

Es wurden in diesem Versuch für jede Zelllinie folgende Werte ermittelt:

- Mitochondrienmenge im Ansatz (über Proteinbestimmung nach Lowry siehe 2.2.7.)
- Basale Respirationsrate
- Respirationsrate nach Hinzufügen von Succinat (f.c.: 80 µmol/ml)
- Respirationsrate nach Hinzufügen von ADP (f.c.: 0,4 µmol/ml)

2.2.10.12. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien-Isolaten

In diesem Versuch wurde aus einer Mitochondrienisolierung parallel eine O₂ – Verbrauchsmessung, eine Proteinbestimmung und eine elektronenmikroskopische Aufnahme erstellt.

Für eine Mitochondrienpräparation in diesem Versuchsaufbau wurden ca. 4×10^7 Zellen benötigt, nach Erfahrungswerten waren in 4 Zellkulturflaschen SK-N-SH- oder Kelly-Zellen oder 6 Zellkulturflaschen LS-Zellen diese Zellmenge enthalten. Aus jeder Zellkulturflasche wurden die Zellen abgelöst. Die gesamte (aus allen Flaschen) abtrypsinierten Zellsuspension wurde auf zwei 50 ml Röhren verteilt und die Zellen danach abzentrifugiert (380g, 18°C, 5 min).

Die 2 Zellpellets wurden jeweils in ca. 1 ml kalter NaCl-Lösung resuspendiert und 1000 µl in jeweils ein 2 ml Eppendorfhütchen überführt. Für jede Zellsuspension wurde die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Aus beiden Eppendorfhütchen wurden die Mitochondrien isoliert. Eine Isolation wurde zur Sauerstoffverbrauchsmessung verwendet. Dazu wurde nach dem letzten Zentrifugationsschritt das Mitochondrienpellet in 100 µl Storage Buffer resuspendiert. Genau 100 µl Mitochondrien-Storage-Buffer-Suspension wurde zur

Sauerstoffverbrauchsmessung eingesetzt. Der Rest wurde zur Proteinbestimmung bei -20°C eingefroren.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die 2. Mitochondrienisolation wie in 2.2.11. (s.u.) präpariert. Es wurden in diesem Versuchsaufbau folgende Versuchsergebnisse für die SK-N-SH-, Kelly- und LS- Zelllinie ermittelt:

- Proteinbestimmung der Mitochondrienprobe
- Basale Respirationsrate
- Respirationsrate nach Succinatzugabe (f.c.: $80\ \mu\text{mol/ml}$)
- Respirationsrate nach ADP-Zugabe (f.c.: $0,4\ \mu\text{mol/ml}$)
- Elektronenmikroskopische Aufnahme der jeweiligen Mitochondrienisolierung, durchgeführt von Herrn Prof. Dr. H. Wolburg, Pathologisches Institut, Universität Tübingen.

2.2.11. Elektronenmikroskopie

Die Mitochondrien-Fractionen wurden zentrifugiert und die Pellets direkt mit 2,5%igem Glutaraldehyd, gepuffert in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) für 2-4 Stunden fixiert und in Agar-Agar überführt, um eine erneute Zentrifugation nach jedem Wasch- oder Entwässerungsschritt zu vermeiden. Die Agarwürfelchen mit den Mitochondrien wurden in reinem Cacodylatpuffer gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert (50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol, Dauer je 30 min; dem 70 % Ethanol war das Kontrastierungsmittel Uranaylacetat gesättigt beigemischt) und über eine Propylenoxid/Aralditmischung in reines Araldit eingebettet. Nach Auspolymerisierung der Aralditblöcke wurden am Leica Ultracut R-Ultramikrotom Ultradünnschnitte (ca. 50 nm) angefertigt und die Schnitte anschließend mit Bleicitrat nachkontrastiert. Die elektronenmikroskopischen Bilder der Präparate wurden am EM-10 Elektronenmikroskop von Zeiss (Carl-Zeiss, Oberkochen) aufgenommen; die Aufnahmen wurden eingescannt und mit Adobe-Photoshop nachbearbeitet.

2.2.12. Statistik

Alle angegebenen Daten wurden mit 2 Nachkommastellen angegeben und alle Werte ab $n = 2$ wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Daten wurden ab $n = 3$ mit einem gepaarten zweiseitigen t-Test oder ungepaarten zweiseitigen t-Test (bei unterschiedlicher Varianz mit Welch Korrektur) und dem Programm INSTAT 3.06 (2003, GraphPad Software, USA) ausgewertet. Als gepaarte Werte wurden die Respirationsraten, Laktat- und Glukosewerte von Zellen in PBS⁺⁺ mit unterschiedlichen Glukosezusätzen gewertet. Wurden unterschiedliche Zellmedien im Versuchsaufbau verwendet, erfolgt die Auswertung mit dem ungepaarten zweiseitigen t-Test, wurde bei den Werten eine signifikant unterschiedliche Varianz festgestellt, wurde der ungepaarte t-Test mit Welch Korrektur angewendet. Die Auswertung der Ergebnisse von Mitochondrienisolaten erfolgte ebenfalls mit dem ungepaarten, zweiseitigen t-Test, teilweise mit Welch Korrektur. Die Werte waren signifikant unterschiedlich, wenn ein $p < 0,05$ auftrat.

2.2.13. Zusatz

Die Ergebnisse einiger Versuchsansätze wurden in Zusammenarbeit mit Beate Deubzer erstellt. Folgende Abschnitte der Ergebnisdarstellung enthalten in Zusammenarbeit ermittelte Versuchswerte: 3.3.1.2.: Glukose und Laktatbestimmungen, 3.3.2.2.: Glukose und Laktatbestimmungen. Die in 3.6. dargestellten Ergebnisse des MTT-Tests bei DCA inkubierten Kelly-Zellen wurden freundlicherweise von Beate Deubzer zu Verfügung gestellt. In den Abschnitten 3.3.-3.5. beziehen sich alle erhobenen Versuchsergebnisse (Respirationsrate, Glukoseverbrauch und Laktatproduktion) immer auf 2×10^6 Zellen, da für jeden Versuchsblock eine Zellsuspension von 2×10^6 Zellen/ml erstellt und für jede Bestimmung immer 1 ml Zellsuspension eingesetzt wurde. In 3.6. beziehen sich die Respirationsraten auf 2×10^6 Zellen, nicht aber der Glukoseverbrauch oder die Laktatproduktion pro Minute. Die Auswahl dieser Zellzahl wurde nach den in 3.2. dargestellten Versuchsergebnissen getroffen.

3. Ergebnisse

Otto Warburg hatte bereits 1924 einen besonderen Glukosemetabolismus bei Tumorzellen beschrieben, bei dem auch in Gegenwart von Sauerstoff Glukose zu Laktat abgebaut wird. Bis heute ist der Warburg Effekt Gegenstand von Studien und konnte in vielen Tumorzellarten nachgewiesen werden (Kim und Dang, 2006; Denko, 2008; Gatenby und Gillies, 2004). Sauerstoffverbrauchsmessungen sind bei Tumorzellen in einer Vielzahl von Arbeiten durchgeführt worden (Rossignol et al., 2004; Smith et al., 2008; Wu et al., 2007; Schulz et al., 2006; Fantin et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde der Sauerstoffverbrauch von Neuroblastomzellen und ihren isolierten Mitochondrien untersucht.

Es wurden zunächst Kelly- und SK-N-SH-Zellen mit Hilfe von Zellvolumen- und Zellproteinbestimmungen näher charakterisiert. Da es sich bei der Sauerstoffverbrauchsmessung mittels der Clark-Elektrode um eine in unserem Labor neu zu etablierende Methode handelte, stand zunächst die Optimierung der Versuchsbedingungen im Vordergrund. Hierzu wurde der Zusammenhang zwischen Zellzahl und zellulärer Respirationsrate untersucht, um für spätere Versuchsreihen eine optimale Zellzahl zur Versuchsdurchführung zu ermitteln. Da einige Arbeiten (Smith et al., 2008; Stolze et al., 2002) zelluläre Respirationsraten auf die Proteinkonzentration der eingesetzten Zellsuspension bezogen haben, wurde dies exemplarisch als alternatives Bezugssystem untersucht. Anschließend wurden die zellulären Respirationsraten von Kelly-, SK-N-SH- und LS-Zellen in Gegenwart verschiedener Glukosekonzentrationen ermittelt, um den Einfluss von Glukose auf den zellulären Sauerstoffverbrauch zu charakterisieren. Zusätze im Zellkulturmedium können ebenfalls den Zellmetabolismus beeinflussen, somit wurden die zellulären Respirationsraten von Zellen in glukosehaltigen PBS⁺⁺ mit denen von Zellen in dem in unserem Labor gebräuchlichen Kulturmedium RPMI 1640* verglichen.

Glykolyseinhibition ist vor dem Hintergrund des glykolytischen Phänotyps bei vielen Tumorzellen zu einem viel diskutierten Ansatz zur Hemmung der Tumorzellproliferation geworden. Daher wurde ein Versuch konzipiert, um den Einfluss eines bekannten Glykolyseinhibitors (2-deoxy-D-Glukose) auf den

Glukosemetabolismus von Neuroblastomzellen zu untersuchen.

Ein weiterer Ansatz, der eventuell therapeutische Bedeutung in der Krebstherapie erlangen könnte, ist die Umlenkung des Glukosemetabolismus glykolytischer Tumorzellen von der aeroben Glykolyse hin zur oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS). Es ist bekannt, dass Dichloracetat (DCA) indirekt den Pyruvatdehydrogenase Komplex (PDH) aktiviert und somit die OXPHOS in Zellen steigern sowie die Laktatproduktion senken kann (Kim et al., 2006). Bei Tumorzellen konnte ein Effekt von DCA auf den Glukosemetabolismus nachgewiesen werden (Bonnet et al., 2007). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von DCA auf den Glukosemetabolismus von Neuroblastomzellen betrachtet.

Im Rahmen des Warburg Effektes ist immer wieder eine verminderte mitochondriale Funktion bei Tumorzellen diskutiert worden (Denko, 2008). Es wurden von den hier verwendeten Zelllinien die Mitochondrien isoliert, ihr Sauerstoffverbrauch bestimmt und mittels Elektronenmikroskopischer Aufnahmen eine morphologische Charakterisierung vorgenommen.

3.1. Proteingehalt und Zellvolumen von Neuroblastomzellen

In diesem Versuch wurde der Proteingehalt und das Zellvolumen der Zelllinien Kelly und SK-N-SH bestimmt. Der Proteingehalt der Zellen wurde in Hinsicht auf die nachfolgenden Versuche zur Respirationsrate von Kelly und SK-N-SH bestimmt, um diesen als weiteres Bezugssystem in Ergänzung zur Zellzahl zur Auswertung der Respirationsraten zu verwenden. Zur Auswertung der Versuchsergebnisse zur Proteinbestimmung wurde zunächst eine Eichkurve mit einer BSA-Standard-Lösung erstellt (siehe Abb. 13), wobei PBS⁺⁺ als Suspensionslösung verwendet wurde, da die Zellen bei der Proteinbestimmung ebenfalls in PBS⁺⁺ suspendiert waren und somit eine Interferenz der Suspensionslösung in Hinblick auf die Ergebnisse der Proteinbestimmung berücksichtigt werden sollte. Anhand dieser Eichkurve wurden die Extinktionswerte bei 500 nm pro 10 µl (siehe Tab. 19) der Zellsuspension in µg Protein umgerechnet. Tabelle 19 zeigt eine höhere Proteinkonzentration in Kelly-Zellen (MW ± SD: 233,15 ± 3,32 µg Protein/10⁶Zellen, n = 2) als in SK-N-SH-Zellen (169 µg

Protein/ 10^6 Zellen). Die Ermittlung der Zellvolumina beider Zelllinien (Tab. 20) erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.5.) beschrieben. Kelly-Zellen hatten ein durchschnittliches Zellvolumen von $1,39 \pm 0,31 \mu\text{l}/10^6$ Zellen ($n = 2$), SK-N-SH-Zellen ein Zellvolumen von $0,93 \mu\text{l}/10^6$ Zellen. Durch die Bestimmung der Zellvolumina ist es möglich, Metabolitenkonzentrationen der Zellen anzugeben.

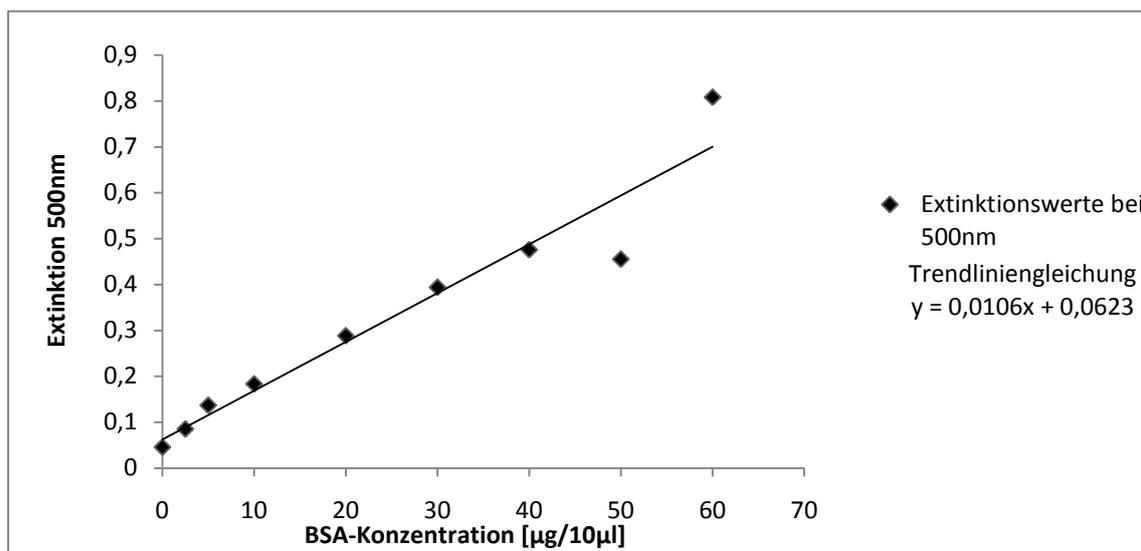


Abb. 13: BSA Standard Eichkurve mit PBS^{++} als Lösungsmittel für Proteinbestimmung nach Lowry.

Tabelle 19: Proteingehalt von Kelly und SK-N-SH-Zellen

Zelllinie	Extinktionswert bei 500 nm pro 10 μl Zellsuspension	Proteinkonzentration [μg] / Zellzahl	Proteinkonzentration [μg] / 10^6 Zellen
Kelly	0,31	23,08 / $0,1 \times 10^6$ Zellen	231
Kelly	0,31	23,55 / $0,1 \times 10^6$ Zellen	236
SK-N-SH	0,42	16,92 / $0,2 \times 10^6$ Zellen	169

In $10 \mu\text{l}$ Kelly-Zellsuspension waren $0,1 \times 10^6$ Zellen enthalten, in $10 \mu\text{l}$ SK-N-SH-Zellsuspension $0,2 \times 10^6$ Zellen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der BSA Standard Eichkurve bestimmt, siehe Abb. 13.

Tabelle 20: Zellvolumenbestimmung Kelly-Zellen und SK-N-SH-Zellen

Zelllinie	Zellzahl pro 50 μl [Zellen/50 μl]	Volumenanteil der Zellmasse an 50 μl Zellsuspension		Volumen von 10^6 Zellen [$\mu\text{l}/10^6$ Zellen]
		[%]	[$\mu\text{l}/50 \mu\text{l}$]	
Kelly	$5,27 \times 10^6$	17	8,5	1,61
Kelly	$9,21 \times 10^6$	21,5	10,75	1,17
SK-N-	$2,15 \times 10^6$	4	2	0,93

Das Zellvolumen wurde wie in Material und Methoden 2.2.5 beschrieben als % von 50 μl bestimmt und aus dem prozentualen Wert anschließend das Zellvolumen berechnet.

3.2. Zusammenhang der Zellzahl bzw. Zellproteinmenge und der zellulären Respirationsrate

Die folgenden Versuchsreihen wurden für die Zelllinien Kelly und SK-N-SH durchgeführt, um festzustellen, welche Zellkonzentration in welchem Medium einen guten Messbereich der Respirationsrate von Neuroblastomzellen aufweist.

Tab. 21 zeigt eine proportionale Zunahme der Respirationsrate im Vergleich zur Zellzahl im Reaktionsansatz: Je höher die Zellzahl/ml, desto höher war die gemessene Respirationsrate. Dieser Zusammenhang gilt sowohl für Kelly-Zellen als auch für SK-N-SH-Zellen und die beiden verwendeten Reaktionsmedien, die sich unter anderem in ihrem Glukosegehalt unterschieden [PBS⁺⁺ (enthält keine Glukose, Zusammensetzung siehe Produktinformation im Anhang) und RPMI 1640* (enthält 11,1 mmol/l Glukose, siehe 3.4. und Produktinformation im Anhang)]. In Abb. 14 wurde die Respirationsrate gegen die Zellzahl aufgetragen, um den proportionalen Zusammenhang zwischen Zellzahl und Respirationsrate zu veranschaulichen.

Tabelle 21: Respirationsraten von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in Abhängigkeit von Zellzahl und Medium

Versuch:	1	2	3	4
Zelllinie:	Kelly		SK-N-SH	
Zellmedium:	PBS ⁺⁺	RPMI 1640*	PBS ⁺⁺	RPMI 1640*
Zellzahl/ml	Respirationsrate [nmol O ₂ /min]			
1×10 ⁶	1,73	1,25	0,83	0,45
2×10 ⁶	2,97	2,4	1,87	0,89
3×10 ⁶	5,28	4,18	2,78	1,42

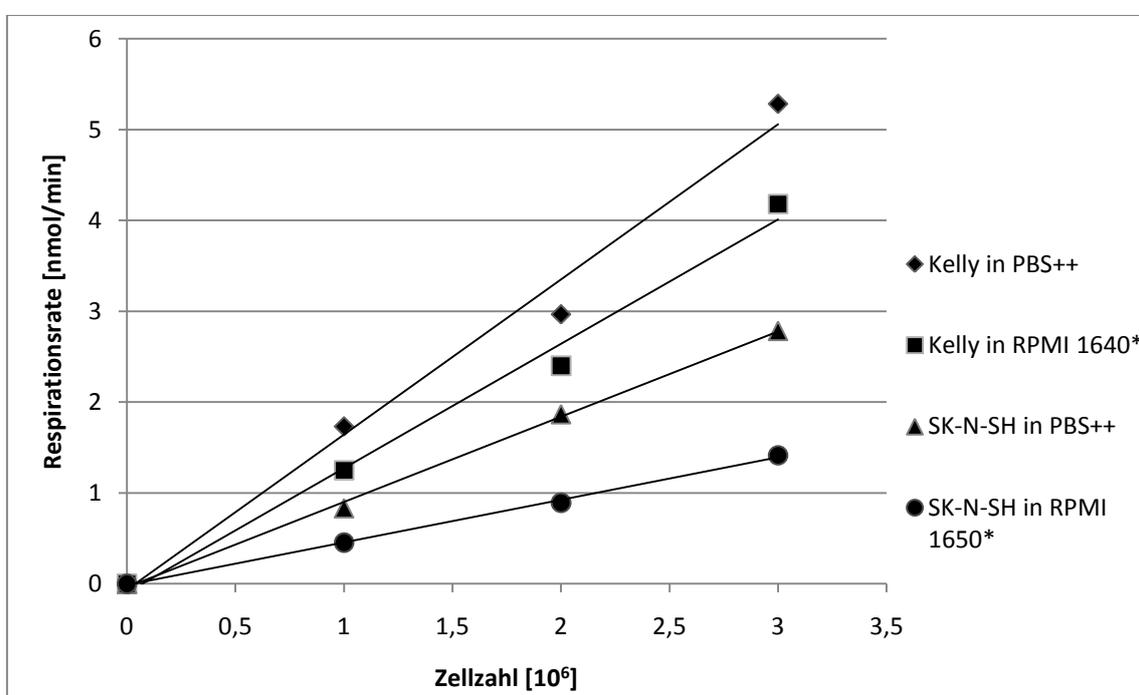


Abb.14: Respirationsraten von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in Abhängigkeit von Zellzahl und Medium. Werte siehe Tab. 21.

Abb. 15 veranschaulicht den Unterschied der Respirationsraten zwischen den Zelllinien und Reaktionsmedien exemplarisch für 10⁶ Zellen/ml. Die Sauerstoffverbrauchsmessungen bei Neuroblastomzellen in PBS⁺⁺ (ohne Glukose) zeigen eine höhere Respirationsrate als bei Neuroblastomzellen in RPMI 1640* (enthält 11,1 mmol/l Glukose) (siehe Abb. 14 und 15).

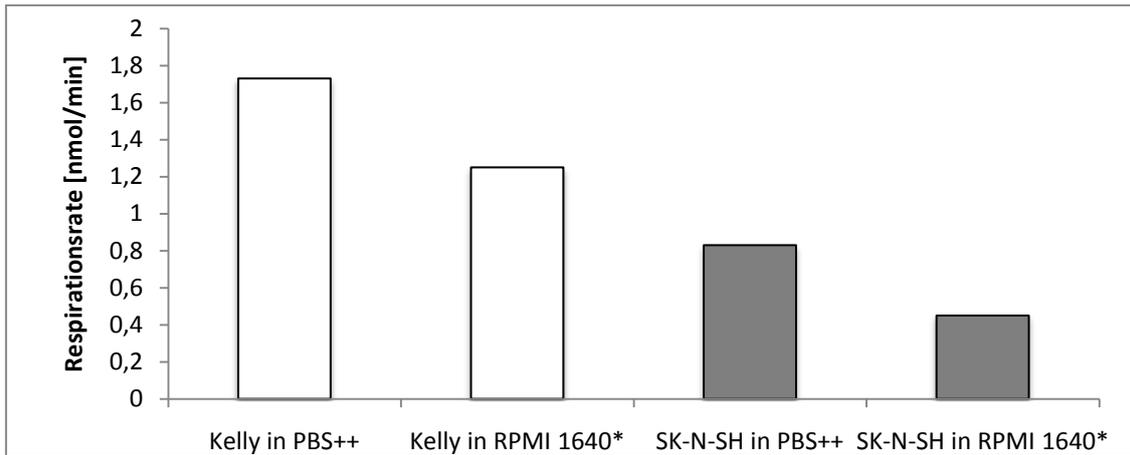


Abb. 15: Respirationsraten von 10^6 Kelly-Zellen/ml und 10^6 SK-N-SH-Zellen/ml in unterschiedlichen Reaktionsmedien. Werte siehe Tab. 21.

Tab. 22 zeigt eine alternative Auswertungsmöglichkeit der Respirationsrate bei Neuroblastomzellen. Hierbei wurden die Respirationsraten [nmol O₂/min] auf 100 µg Zellprotein bezogen. Es zeigten sich auch in diesem Bezugssystem höhere Respirationsraten bei Kelly- bzw. SK-N-SH-Zellen in PBS⁺⁺ im Vergleich zu Kelly- bzw. SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640*, sowie insgesamt höhere Respirationsraten bei Kelly-Zellen als bei SK-N-SH-Zellen.

Tabelle 22: Respirationsrate pro 100 µg Zellprotein bei Kelly- und SK-N-SH-Zellen

Zelllinie	Zellmedium	Zellproteinkonzentration [µg/10 ⁶ Zellen]	Respirationsrate [nmol O ₂ /min × 10 ⁶ Zellen]	Respirationsrate [nmol O ₂ /(min × 100µg Zellprotein)]
Kelly	PBS ⁺⁺	233	1,73	0,74
Kelly	RPMI	233	1,25	0,54
SK-N-	PBS ⁺⁺	169	0,83	0,49
SK-N-	RPMI	169	0,45	0,26

Messwerte beziehen sich auf 1×10^6 Zellen/ml. Berechnung des Sauerstoffverbrauch /100 µg Protein nach folgender Formel: Respirationsrate [nmol/min] pro 100 µg Zellprotein = $(100 \times \text{Respirationsrate [O}_2 \text{ nmol/min]}/10^6 \text{ Zellen})/(\text{Zellproteinkonzentration } [\mu\text{g}/10^6 \text{ Zellen}])$. Angegebene Zellproteinkonzentration/10⁶ Zellen von Kelly-Zellen ist ein Mittelwert ($n = 2$, Standardabweichung = 3,3) der in Tab. 19 dargestellten Messwerte.

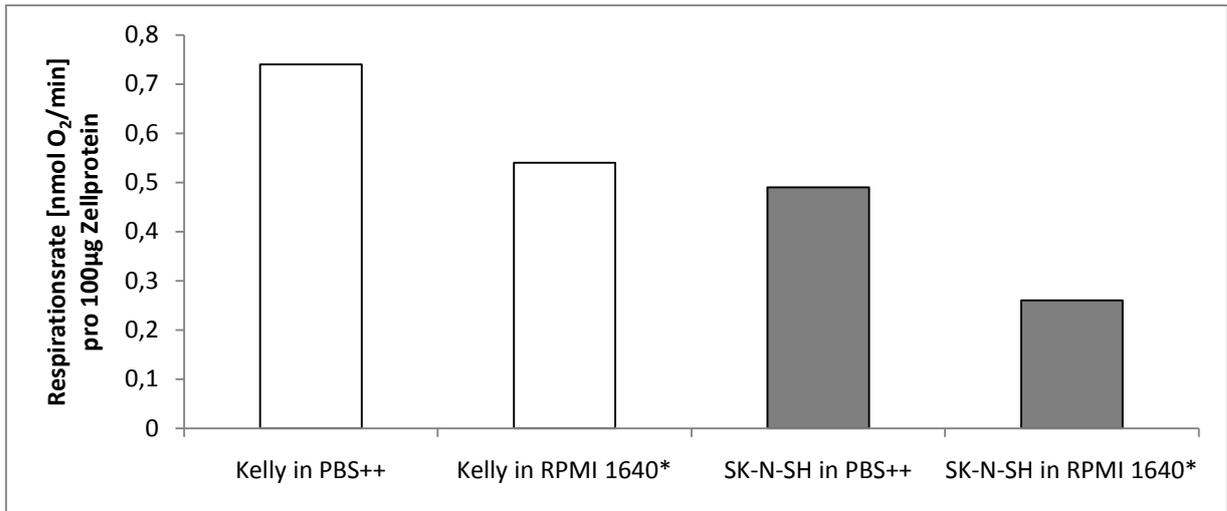


Abb. 16: *Respirationsrate [nmol O₂/(min×100 µg Zellprotein)] bei Kelly- und SK-N-SH-Zellen in unterschiedlichen Reaktionsmedien. Werte siehe Tab. 22.*

Für alle späteren Versuchsreihen wurden immer die Respirationsraten von 2×10^6 Zellen/ml bestimmt, da sie bei dieser Zellkonzentration in einem guten Messbereich lagen und auf Grund des oben erwähnten proportionalen Zusammenhanges zwischen Respirationsrate und Zellzahl Rückschlüsse auf die Respirationsraten anderer Zellzahlen erlaubt. Es wurde für jede Bestimmung 1 ml Zellsuspension eingesetzt, so dass sich die dargestellten Versuchsergebnisse für Respirationsrate, Glukoseverbrauch und Laktatproduktion jeder Zelllinie in den Abschnitten 3.3.-3.5. jeweils auf 2×10^6 Zellen beziehen.

Das oben dargestellte alternative Auswertungssystem, in dem die Respirationsrate auf 100 µg Zellprotein bezogen wird (Tab. 22, Abb. 16), wurde für die Auswertung der Zellrespirationsraten späterer Versuchsreihe nicht mehr verwendet.

3.3. Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen

Bei der oxidativen Phosphorylierung werden zur Oxidation von 1 mol Glukose 6 Mole O_2 verbraucht, bei der Glykolyse entstehen aus 1 mol Glukose 2 mol Laktat.

In 3.2. konnte gezeigt werden, dass Neuroblastomzellen in glukosefreiem PBS^{++} eine höhere Respirationsrate aufweisen als in RPMI 1640* [$c(\text{Glukose}) = 11,1 \mu\text{mol/ml}$, siehe auch 3.4.]. In den im Folgenden dargestellten Versuchsreihen, wurde der Einfluss von Glukose auf die Respirationsrate, den Glukoseverbrauch und die Laktaproduktion bei Kelly-, SK-N-SH- und LS-Zellen gemessen. Hierzu wurden in der Versuchsreihe eine identische Zellzahl derselben Passage in PBS^{++} mit verschiedenen Glukosekonzentrationen ($0 \mu\text{mol/ml f.c.}$, $1 \mu\text{mol/ml f.c.}$ oder $5 \mu\text{mol/ml f.c.}$) inkubiert und anschließend die Respirationsrate bestimmt, um festzustellen, ob eine Erhöhung des Glukoseangebotes im Reaktionsmedium eine Veränderung des Sauerstoffverbrauches der Zellen verursacht. Parallel zur Sauerstoffverbrauchsmessung wurden innerhalb von 240 min zu mehreren Zeitpunkten der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion exemplarisch gemessen.

3.3.1. Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von Kelly-Zellen

3.3.1.1. Sauerstoffverbrauch

Die im Folgenden dargestellten Respirationsraten beziehen sich immer auf 2×10^6 Zellen. Die Versuchsreihe wurde mit $n = 5$ durchgeführt. Für die Auswertung wurde ein gepaarter t-Test verwendet.

Tab. 23 zeigt, dass die Respirationsrate bei Kelly-Zellen mit zunehmender Glukosekonzentration (= Glukoseangebot) im Medium abnahm. Kelly-Zellen in PBS^{++} mit $0 \mu\text{mol Glukose/ml}$ wiesen eine Respirationsrate von $4,92 \pm 2,4 \text{ nmol } O_2/\text{min}$ (MW \pm SD) auf, in PBS^{++} mit $1 \mu\text{mol Glukose/ml}$ nur $3,92 \pm 1,87 \text{ nmol } O_2/\text{min}$ (MW \pm SD). Die Respirationsraten bei $0 \mu\text{mol Glukose/ml}$ und $1 \mu\text{mol Glukose/ml}$ waren signifikant unterschiedlich ($p = 0,0239$). Kelly-Zellen in PBS^{++} mit $5 \mu\text{mol Glukose/ml}$ zeigten

einen niedrigeren Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsansätzen ($2,96 \pm 1,86$ nmol O₂/min). Die Respirationsraten bei 1 µmol Glukose/ml und 5 µmol Glukose/ml sowie die Respirationsraten von Zellen in PBS⁺⁺ mit 0 und 5 µmol Glukose/ml waren signifikant unterschiedlich ($p = 0,0338$, bzw. $p = 0,0044$). Ebenfalls in Tab. 23 sind die Werte des Sauerstoffverbrauches der verschiedenen Versuchsansätze in Prozent dargestellt. Der Wert des Sauerstoffverbrauches von Kelly-Zellen in 5 µmol Glukose/ml wurde hierbei als 100 %-Wert gesetzt, da diese Glukosekonzentration näherungsweise der physiologischen Glukosekonzentration im Blut entspricht. Die Respirationsrate von Kelly-Zellen in PBS⁺⁺ mit 0 oder 1 µmol Glukose/ml wurde in % der Respirationsrate von Kelly-Zellen in PBS⁺⁺ mit 5 µmol Glukose/ml berechnet. Die Angaben in Prozent wurden in Abb. 17 verwendet, um den Unterschied zwischen den Respirationsraten von Kelly-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Glukosekonzentrationen im PBS⁺⁺ zu veranschaulichen.

Tabelle 23: Einfluss des Glukoseangebotes auf die Respirationsrate von Kelly-Zellen

Zellmedium:	PBS ⁺⁺					
	c(Glukose): 0 µmol/ml	1µmol/ml	5 µmol/ml	0 µmol/ml	1µmol/ml	5 µmol/ml
Versuch	Respirationsrate [O ₂ nmol/(min × 2×10 ⁶ Zellen)]			Prozentuale Respirationsrate [%]		
1	5,58	4,22	3,34	167,3	126,3	100
2	2,93	2,42	1,68	174,4	144	100
3	2,75	2,03	1,68	163,7	120,8	100
4	8,73	6,76	6,06	144,1	111,6	100
5	4,65	4,15	2,04	228,2	203,5	100
MW ± SD	4,92 ± 2,4	3,92 ±1,87	2,96 ± 1,86	175,5 ± 31,5	141,2 ± 36,8	100

Einfluss von 0, 1 und 5 µmol Glukose/ml im Zellmedium auf die Respirationsrate von 2×10⁶ Kelly- Zellen (n = 5). Bei der Darstellung der Versuchsergebnisse in Prozent wurde die Respirationsrate von Kelly-Zellen in PBS⁺⁺ mit 5 µmol/ml Glukose = 100% gesetzt, da diese Glukosekonzentration annähernd der physiologischen Glukosekonzentration entspricht. Die Respirationsrate von Kelly-Zellen in PBS⁺⁺ mit 0 oder 1 µmol Glukose/ml wurde in % der Respirationsrate von Kelly-Zellen in PBS⁺⁺ mit 5 µmol Glukose/ml berechnet.

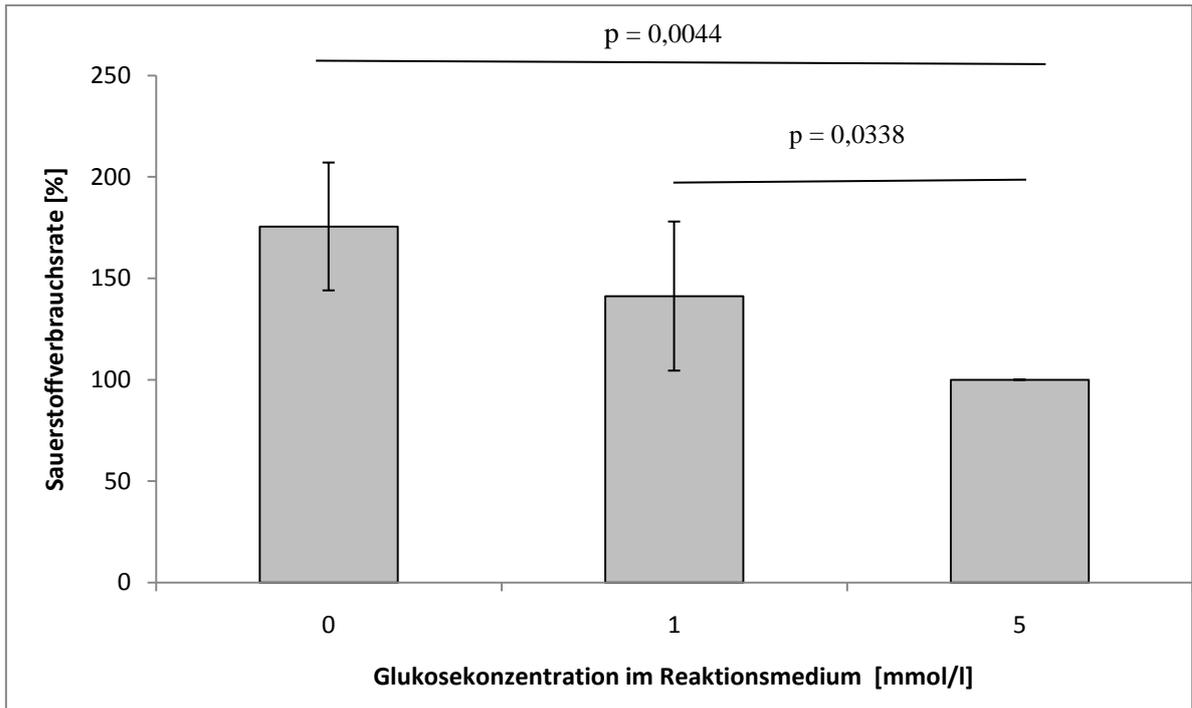


Abb. 17: Einfluss des Glukoseangebots auf den Sauerstoffverbrauch von Kelly-Zellen. Angabe der Werte in Prozent ($n=5$). Werte siehe Tab. 23, Erklärung siehe Text.

3.3.1.2. Glukose und Laktatstoffwechsel der Kelly-Zellen

Im Folgenden wird exemplarisch eine der bereits in Tab. 23 (Versuch 5) aufgeführten Sauerstoffverbrauchsmessungen mit parallel dazu durchgeführter Messung des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion dargestellt. Die dargestellten Respirationsraten, der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion beziehen sich auf 2×10^6 Zellen.

Tab. 24 zeigt die Sauerstoffverbrauchsrate pro Minute (siehe auch Tab. 23, Versuch 5). Die Glukose- und Laktatwerte wurden wiederholt (nach 30, 60, 120 und 240 min) über einen Zeitraum von 240 Minuten bestimmt (Wertetabellen siehe Anhang). Zur Auswertung wurden die Messwerte nach 30 min verwendet, da die Sauerstoffverbrauchsrate über diesen Zeitraum konstant blieb. Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte wurde aus den Glukose- bzw. Laktatwerten der Glukoseverbrauch [nmol/ml] bzw. Laktatproduktion [nmol/ml] pro Minute berechnet.

Die Respirationsrate nahm mit ansteigendem Glukoseangebot im PBS⁺⁺-Medium ab. Bei 0 µmol/ml Glukoseangebot lag die Respirationsrate bei 4,65 nmol O₂/min, bei einem Glukoseangebot von 1 µmol/ml im Reaktionsmedium wurde ein Sauerstoffverbrauch von 4,15 nmol O₂/min gemessen und bei 5 µmol/ml Glukose 2,04 nmol O₂/min. Der gemessene Glukoseverbrauch war bei einem Glukoseangebot von 1 µmol/ml im Medium höher (7 nmol Glukose/min) als bei einer Inkubation mit einer höheren Glukosekonzentration von 5 µmol/ml (4 nmol Glukose/min) im Reaktionsmedium. Die Laktatproduktion lag bei Inkubation mit 1 µmol Glukose/ml bei 5 nmol Laktat/min und bei Inkubation mit 5 µmol Glukose/ml bei 4 nmol Laktat/min. Bei 0 µmol Glukose/ml im Reaktionsmedium konnten erwartungsgemäß keine Laktat- oder Glukosewerte nachgewiesen werden. Findet nur die aerobe/anaerobe Glykolyse statt, wird aus 1 mol Glukose 2 mol Laktat. Bei Kelly-Zellen entstanden nach Inkubation mit 1 µmol Glukose/ml PBS⁺⁺ aus 7 nmol Glukose 5 nmol Laktat. Der theoretische Wert bei ausschliesslicher aerober Glykolyse wären 14 nmol Laktat gewesen. Die prozentuale Laktatausbeute betrug also 36 %. Bei Kelly-Zellen nach Inkubation mit 5 µmol Glukose pro ml entstanden aus 4 nmol Glukose 4 nmol Laktat, also 50 % vom theoretischen Wert (8 nmol).

Tabelle 24: Sauerstoffverbrauch, Glukoseverbrauch und Laktatproduktion bei Kelly-Zellen

c(Glukose) im PBS⁺⁺- Medium	Respirations- rate [nmol/ (min × 2×10⁶ Zellen)]	Glukose- verbrauch [nmol/(min × 2×10⁶ Zellen)]	Laktat- produktion[nm ol/(min × 2×10⁶ Zellen)]	Laktat- ausbeute der Glykolyse in % vom theoretisch en Wert
0 µmol/ml	4,65	0	0	0
1 µmol/ml	4,15	7	5	36
5 µmol/ml	2,04	4	4	50

3.3.2. Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von SK-N-SH-Zellen

3.3.2.1. Sauerstoffverbrauch

Tab. 25 zeigt, wie auch schon bei Kelly-Zellen in 3.3.1. zu beobachten war, die Abnahme der Respirationsrate bei SK-N-SH-Zellen mit zunehmendem Glukoseangebot im Medium. Die Respirationsraten beziehen sich auf 2×10^6 Zellen, die Versuchsdurchführung erfolgte mit $n = 5$. Zur Auswertung wurde ein gepaarter zweiseitiger t-Test durchgeführt. Bei $0 \mu\text{mol Glukose/ml}$ lag der Sauerstoffverbrauch bei $1,49 \pm 0,47 \text{ nmol O}_2/\text{min}$, bei $1 \mu\text{mol Glukose/ml}$ im Reaktionsmedium betrug die Respirationsrate $1,28 \pm 0,57 \text{ nmol O}_2/\text{min}$. Der Unterschied der Respirationsraten von Zellen in PBS^{++} ohne Glukosezusatz und PBS^{++} mit $1 \mu\text{mol Glukose/ml}$ war signifikant ($p = 0,0406$). Die Respirationsrate von SK-N-SH-Zellen bei Inkubation mit $5 \mu\text{mol Glukose/ml}$ lag bei $1,11 \pm 0,49 \text{ nmol O}_2/\text{min}$ und damit unter den Respirationsraten der Zellen ohne Glukoseinkubation und Inkubation mit $1 \mu\text{mol Glukose/ml}$. Die Respirationsraten von Zellen im Medium ohne Glukose im Vergleich zu Medium mit $5 \mu\text{mol Glukose/ml}$ war signifikant unterschiedlich ($p = 0,0039$). Beim Vergleich der Respirationsraten von Zellen nach Inkubation mit $1 \mu\text{mol Glukose/ml}$ und nach $5 \mu\text{mol Glukose/ml}$ konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,0809$). Zusätzlich sind in Tab.25 die Respirationsraten in Prozent dargestellt, wobei die Umrechnung in Prozent wie in 3.3.1.2. beschrieben erfolgte. Abb. 18 zeigt die Respirationsraten in Prozent, um die Abnahme der Respirationsrate bei steigendem Glukoseangebot im Zellmedium zu veranschaulichen.

Tabelle 25: Einfluss des Glukoseangebotes auf die Respirationsrate von SK-N-SH-Zellen

Zellmedium:	PBS ⁺⁺					
c(Glukose):	0 µmol/ml	1 µmol/ml	5 µmol/ml	0 µmol/ml	1 µmol/ml	5 µmol/ml
s	Respirationsrate [nmol/(min × 2×10 ⁶ Zellen)]			Prozentuale Respirationsrate [%]		
1	1,77	1,495	1,15	153,7	130	100
2	1,02	0,66	0,69	147,8	95,7	100
3	1,92	1,98	1,67	115	118,6	100
4	1,81	1,55	1,5	120,6	102,9	100
5	0,95	0,72	0,54	175,9	133,2	100
MW ± SD	1,49 ± 0,47	1,28 ± 0,57	1,11 ± 0,49	142,6 ± 25,1	116 ± 16,5	100

Einfluss von 0, 1 und 5 µmol Glukose/ml im Zellmedium auf die Respirationsrate von 2×10⁶ SK-N-SH-Zellen (n = 5). Bei der Darstellung der Versuchsergebnisse in Prozent wurde die Respirationsrate von SK-N-SH-Zellen in PBS⁺⁺ mit 5 µmol Glukose/ml = 100 % gesetzt, da diese Glukosekonzentration annähernd der physiologischen Glukosekonzentration entspricht. Die Respirationsrate von SK-N-SH-Zellen in PBS⁺⁺ mit 0 oder 1 µmol Glukose/ml wurde in % der Respirationsrate von SK-N-SH-Zellen in PBS⁺⁺ mit 5 µmol Glukose/ml berechnet.

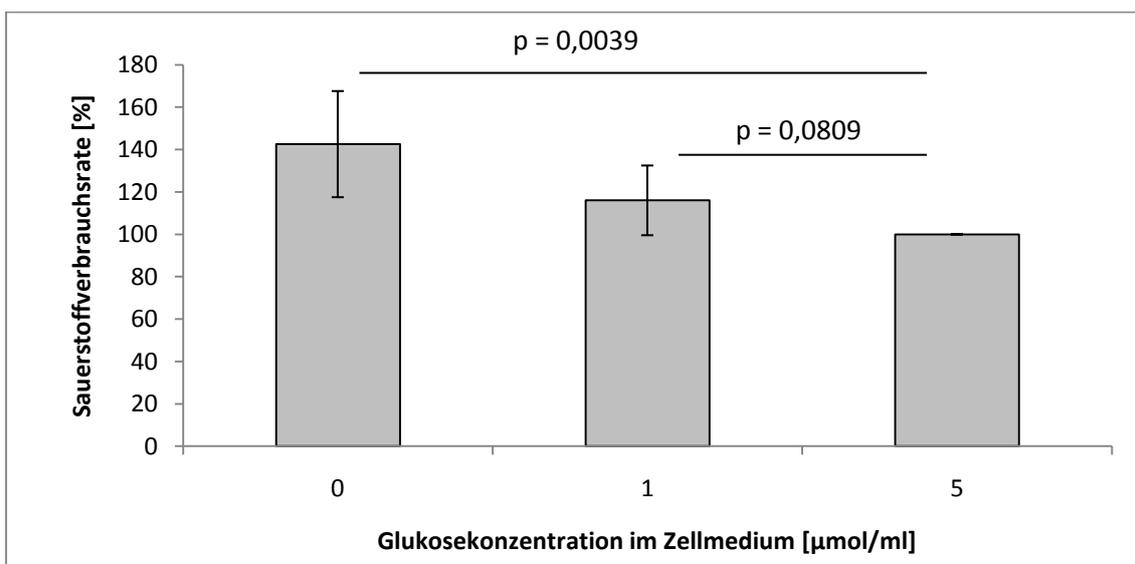


Abb. 18: Einfluss des Glukoseangebotes auf den Sauerstoffverbrauch von SK-N-SH-Zellen. Angaben der Werte in Prozent (n = 5). Werte siehe Tab. 25, Erklärung siehe Text.

3.3.2.2. Glukose und Laktatstoffwechsel der SK-N-SH-Zellen

Zu der in Tab. 25, Versuch 4, dargestellten Sauerstoffverbrauchsmessung wurde exemplarisch parallel eine Glukose- und Laktatbestimmung mit 4 Messungen (30 min, 60 min, 120 min, 240 min) innerhalb von 240 Minuten durchgeführt. Tab. 26 stellt die Ergebnisse des Sauerstoff- und Glukoseverbrauches sowie der Laktatproduktion dar. Zur Auswertung wurden aus den erhobenen Glukose- und Laktatwerten der Messwert nach 60 Minuten ausgewählt, da der Sauerstoffverbrauch während der Versuchsdurchführung über 60 Minuten konstant blieb. Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte wurde der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion auf nmol/ml pro Minute umgerechnet. Die Wertetabellen der Glukose und Laktatbestimmungen sind im Anhang aufgelistet. Alle Versuchswerte beziehen sich auf 2×10^6 Zellen.

Die Respirationsrate der Zellen in PBS^{++} lag bei $1,81 \text{ nmol O}_2/\text{min}$, die Respirationsrate von Zellen in Gegenwart von $1 \text{ } \mu\text{mol Glukose/ml}$ betrug $1,55 \text{ } \mu\text{mol O}_2/\text{min}$ und bei einer Glukosekonzentration von $5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ war der Sauerstoffverbrauch $1,5 \text{ nmol O}_2/\text{min}$. Der Glukoseverbrauch der SK-N-SH-Zellen bei einem Glukoseangebot von $1 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ lag mit $3 \text{ nmol O}_2/\text{min}$ etwas über dem Glukoseverbrauch ($2 \text{ nmol Glukose/min}$) von SK-N-SH-Zellen nach Inkubation mit $5 \text{ } \mu\text{mol Glukose/ml}$. Die Laktatproduktion war mit $3 \text{ nmol Laktat/min}$ bei Zellen im $5 \text{ } \mu\text{mol Glukose/ml PBS}^{++}$ Medium höher als bei Zellen im PBS^{++} Medium mit $1 \text{ } \mu\text{mol Glukose/ml}$, die bei $1 \text{ nmol Laktat/min}$ lag. Bei Zellen im PBS^{++} -Reaktionsmedium ohne Glukose konnte erwartungsgemäß kein Glukoseverbrauch oder Laktatproduktion nachgewiesen werden (Tab. 26). Die Berechnung der Laktatausbeute (Tab. 26) erfolgte wie in 3.3.1.2. beschrieben jeweils in Prozent der bei ausschliesslicher Glykolyse zu erwartenden Laktatproduktion von $2 \text{ mol Laktat/mol Glukose}$.

Tabelle 26: Sauerstoffverbrauch, Glukoseverbrauch und Laktatproduktion bei SK-N-SH-Zellen

c(Glukose) im PBS⁺⁺-Medium	Respirationsrate [nmol/(min × 2×10⁶ Zellen)]	Glukoseverbrauch [nmol/(min × 2×10⁶ Zellen)]	Laktatproduktion [nmol/(min × 2×10⁶ Zellen)]	Laktatausbeute der Glykolyse in % vom theoretischen Wert
0 µmol/ml	1,81	0*	0	0
1 µmol/ml	1,55	3	1	16,7
5 µmol/ml	1,5	2	3	75

*Die mit * bezeichneten Werte lagen < 1 nmol/min und sind daher auf Grund der biologischen Relevanz als „0“ angegeben.*

3.3.3. Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von LS-Zellen

3.3.3.1. Sauerstoffverbrauch bei LS-Zellen

Nach den Beobachtungen in den Versuchen 3.3.1. und 3.3.2 wurde für LS-Zellen ein vergleichbares Versuchsprotokoll konzipiert, um ihren Energiestoffwechsel nach Inkubation mit unterschiedlich hohen Glukosekonzentrationen zu untersuchen. Die erhobenen Werte wurden mit $n = 3$ durchgeführt und beziehen sich auf 2×10^6 Zellen. Zur Auswertung der Werte wurde ein gepaarter, zweiseitiger t-Test durchgeführt. Im Unterschied zu den bei Kelly- und SK-N-SH-Zellen ermittelten Respirationsraten in Gegenwart von Glukose, zeigte sich bei LS-Zellen ein parallel zum Glukoseangebot im Medium steigender Sauerstoffverbrauch von $3,1 \pm 1,08$ nmol O₂/min bei Zellen in glukosefreiem PBS⁺⁺ auf $5,64 \pm 1,43$ nmol O₂/min bei Zellen in PBS⁺⁺ mit c(Glukose) = 1 µmol/ml ($p = 0,0826$) (Tab. 27). In Abb. 19 sind die Respirationsraten in Prozent abgebildet, wobei die Respirationsrate von Zellen nach Inkubation mit Glukose 1 µmol/ml gleich 100 % gesetzt wurde und die Respirationsraten von Zellen ohne Glukoseinkubation in Abhängigkeit davon berechnet wurden (Umrechnung siehe Tab. 27). Der Versuch beinhaltete auch einen Ansatz mit LS-Zellen nach Inkubation mit 5

μmol Glukose/ml, die Ergebnisse mussten allerdings auf Grund von technischen Problemen bei der Versuchsdurchführung aus der Analyse genommen werden.

Tabelle 27: Einfluss des Glukoseangebotes auf die Respirationsrate von LS-Zellen

Zellmedium:	PBS ⁺⁺			
c(Glukose):	0 $\mu\text{mol/ml}$	1 $\mu\text{mol/ml}$	0 $\mu\text{mol/ml}$	1 $\mu\text{mol/l}$
Versuch	Respirationsrate [nmol/(min \times 2×10^6 Zellen)]		Respirationsrate [%]	
1	2,9	6,98	41,55	100
2	4,27	5,8	73,82	100
3	2,13	4,13	51,57	100
MW \pm SD	3,1 \pm 1,08	5,64 \pm 1,43	55,65 \pm 16,52	100

Einfluss von 0 und 1 μmol Glukose/ml im Zellmedium auf die Respirationsrate von 2×10^6 LS-Zellen ($n = 3$). Bei der Darstellung der Versuchsergebnisse in Prozent wurde die Respirationsrate von LS-Zellen in PBS⁺⁺ mit 1 μmol Glukose/ml = 100% gesetzt. Die Respirationsrate von LS-Zellen in glukosefreiem PBS⁺⁺ wurde in % der Respirationsrate der LS-Zellen in PBS⁺⁺ mit 1 μmol Glukose/ml berechnet.

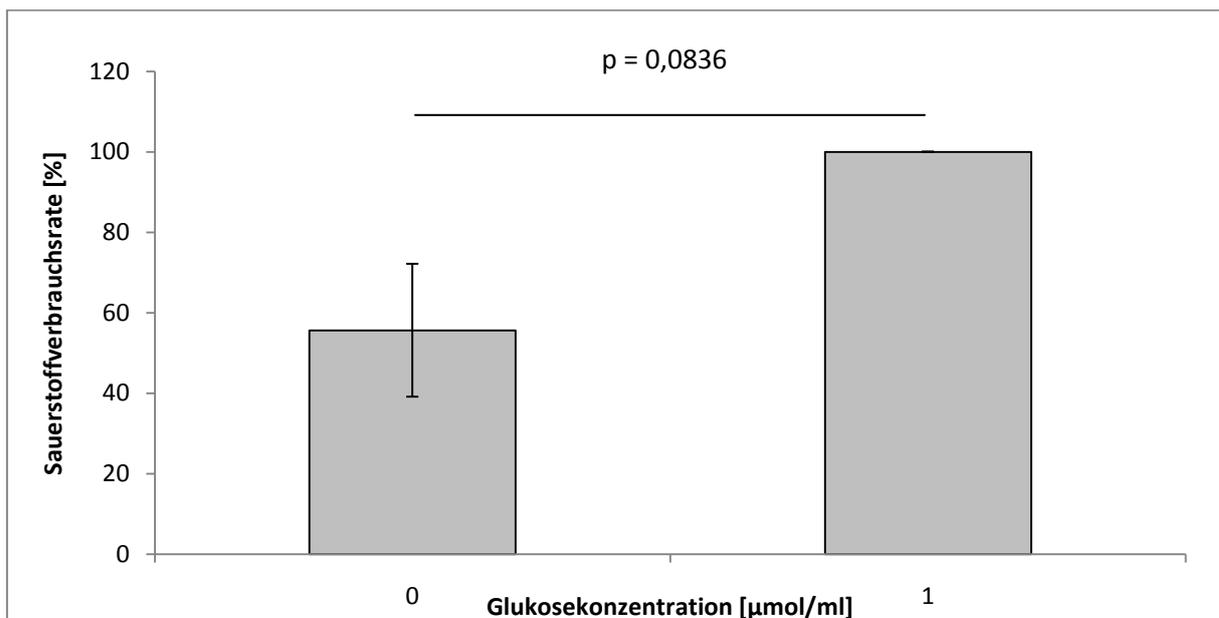


Abb. 19: Einfluss des Glukoseangebotes auf die Respirationsrate von LS-Zellen. Angabe der Ergebnisse in Prozent ($n=3$). Werte siehe Tab. 27, Erklärung siehe Text.

3.3.3.2. Glukose und Laktatstoffwechsel bei LS-Zellen

Zu den in Tab. 27 dargestellten Sauerstoffverbrauchsmessungen wurden parallel Glukose- und Laktatbestimmungen mit Messungen zur 0. und 60. Minute durchgeführt (n = 3). Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte wurden der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion auf nmol/ml pro Minute umgerechnet. Tab. 28 stellt die MW \pm SD der Versuchsergebnisse des Sauerstoffverbrauchs (Ergebnisse siehe Tab. 27), Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion (Ergebnisse siehe Anhang) im Vergleich dar. Alle Werte beziehen sich auf 2×10^6 Zellen. Zur statistischen Auswertung der Glukose- und Laktatwerte wurde ein zweiseitiger gepaarter t-Test verwendet.

Wie Tab. 28 zeigt, lag die Respirationsrate bei Zellen in glukosefreiem PBS⁺⁺ bei $3,1 \pm 1,08$ nmol O₂/min, wie erwartet konnte kein Glukoseverbrauch oder Laktatproduktion nachgewiesen werden (Werte < 1 nmol/min wurden vernachlässigt). Bei Inkubation mit 1 μ mol Glukose/ml lag die Respirationsrate bei $5,64 \pm 1,43$ nmol O₂/min, der Glukoseverbrauch war mit $5,43 \pm 1,59$ nmol Glukose/min niedriger als nach Inkubation mit 5 μ mol Glukose/ml ($9 \pm 2,42$ nmol Glukose/min). Der Unterschied des Glukoseverbrauchs bei 1 μ mol/ml und 5 μ mol/ml Glukoseangebot war signifikant (p = 0,0485). Die Laktatproduktion lag bei 1 μ mol/ml Glukoseangebot im PBS⁺⁺-Medium bei $5,93 \pm 1,85$ nmol Laktat/min, bei 5 μ mol/ml Glukoseangebot im PBS⁺⁺-Medium lag sie bei $12,26 \pm 3,61$ nmol Laktat/min. Die dargestellte Laktatproduktion bei 1 oder 5 μ mol/ml Glukoseangebot war signifikant unterschiedlich (p = 0,0375). Bei Kelly- und SK-N-SH-Zellen war mit steigendem Glukoseangebot der Sauerstoffverbrauch gesunken und die Laktatausbeute der Glykolyse gestiegen (siehe Tab. 24 und 26). Bei LS-Zellen stieg der Sauerstoffverbrauch parallel zur Laktatausbeute der Glykolyse bei steigendem Glukoseangebot im Medium (Tab. 28).

Tabelle 28: Sauerstoffverbrauch, Glukoseverbrauch und Laktatproduktion bei LS-Zellen

c(Glukose) im PBS⁺⁺ Medium	Respirationsrate [nmol O₂/(min × 2×10⁶ Zellen)] MW ± SD	Glukoseverbrauch [nmol/(min × 2×10⁶ Zellen)] MW ± SD	Laktatproduktion [nmol/(min × 2×10⁶ Zellen)] MW ± SD	Laktat- ausbeute der Glykolyse in % vom theoretischen Wert
0 µmol/ml	3,1 ± 1,08	0*	0*	0
1 µmol/ml	5,64 ± 1,43	5,43 ± 1,59	5,93 ± 1,85	54,6
5 µmol/ml	Fehlt	9 ± 2,42	12,26 ± 3,61	68,1

*Die mit * bezeichneten Werte lagen < 1 nmol/min und sind daher auf Grund der biologischen Relevanz als „0“ angegeben.*

3.4. Sauerstoffverbrauch von Neuroblastomzellen im normalen Zellkulturmedium (RPMI 1640*)

Bei den in 3.2. dargestellten Versuchsreihen wurde eine Abhängigkeit der Respirationsrate von der Glukosekonzentration im Reaktionsmedium beschrieben. Um auch den möglichen Einfluss anderer Mediumkomponenten zu analysieren, wurden die Sauerstoffverbrauchsraten von Kelly und SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640* untersucht. RPMI 1640* enthält 2 g Glukose/l, d.h. besitzt eine Glukosekonzentration von 11,1 µmol/ml. Dieses Medium wurde mit PBS⁺⁺ + 10 µmol Glukose/ml und glukosefreiem PBS⁺⁺ verglichen (Produktinformation zur Zusammensetzung von RPMI 1640 und PBS⁺⁺ sind im Anhang aufgeführt).

3.4.1. Sauerstoffverbrauch von Kelly-Zellen in RPMI 1640*

In Tab. 29 und Abb. 20 sind die Versuchsergebnisse von Kelly-Zellen in RPMI 1640*, PBS⁺⁺ + 10 mmol Glukose/ml und glukosefreiem PBS⁺⁺ im Vergleich dargestellt. Die Bestimmung der Respirationsrate wurde mit n = 3 durchgeführt und bezieht sich auf

2×10^6 Zellen. Die statistische Auswertung erfolgt mittels des zweiseitigen, ungepaarten t-Tests.

Im Vergleich liegt der Sauerstoffverbrauch von Zellen in RPMI 1640* über dem von Zellen in PBS⁺⁺ mit 10 μmol Glukose/ml ($1,62 \pm 0,32 \text{ nmol O}_2/\text{min}$), allerdings war der Unterschied nicht signifikant ($p = 0,0736$). Kelly-Zellen in RPMI 1640* wiesen eine signifikant niedrigere Respirationsrate ($2,23 \pm 0,3 \text{ nmol O}_2/\text{min}$) auf als Kelly-Zellen in glukosefreiem PBS⁺⁺ ($3,21 \text{ nmol O}_2/\text{min}$) ($p = 0,0074$) (Tab. 29, Abb. 20).

Tabelle 29: Sauerstoffverbrauch von Kelly-Zellen in RPMI 1640* im Vergleich zu PBS⁺⁺ \pm Glukose

Reaktionsmedium:	RPMI 1640* c(Glukose) = 11,1 $\mu\text{mol/ml}$	PBS ⁺⁺ c(Glukose) = 10 $\mu\text{mol/ml}$	PBS ⁺⁺ ohne Glukosezusatz
Versuch	Respirationsrate [$\text{nmol O}_2/(\text{min} \times 2 \times 10^6 \text{ Zellen})$]		
1	2,5	1,85	3,35
2	2,27	1,75	3,25
3	1,91	1,25	3,03
MW \pm SD	$2,23 \pm 0,3$	$1,62 \pm 0,32$	$3,21 \pm 0,16$

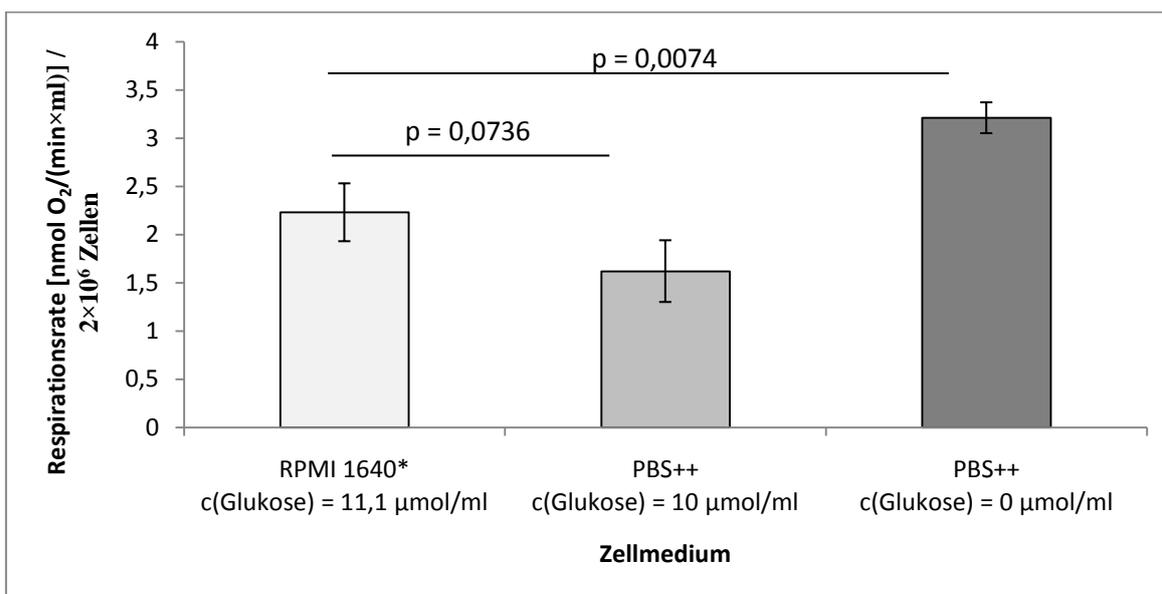


Abb. 20: Sauerstoffverbrauch von Kelly-Zellen in RPMI 1640* im Vergleich zu PBS⁺⁺ \pm Glukose. MW \pm SD. Werte siehe Tab. 29.

3.4.2. Sauerstoffverbrauch von SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640*

Der bereits in 3.4.1. beschriebene Versuchsaufbau wurde identisch für 2×10^6 SK-N-SH-Zellen je Ansatz mit $n = 3$ durchgeführt. Der Vergleich der 3 Versuchsansätze (siehe Tab. 30 und Abb. 21) zeigte bei SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640* Medium eine etwas höhere Respirationsrate ($0,96 \pm 0,03$ nmol O_2 /min) als bei SK-N-SH-Zellen in PBS^{++} mit $c(\text{Glukose}) = 10$ $\mu\text{mol/ml}$ ($0,87 \pm 0,06$ nmol O_2 /min), jedoch war der Unterschied nicht signifikant ($p = 0,0772$, ungepaarter zweiseitiger t-Test). Die Zellen wiesen in glukosefreiem PBS^{++} ($1,16 \pm 0,22$ nmol O_2 /min) eine höhere Respirationsrate auf als in RPMI 1640* ($p = 0,2659$, ungepaarter t-Test, Welch corrected, Unterschied nicht signifikant).

Tabelle 30: Sauerstoffverbrauch von SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640* im Vergleich zu $PBS^{++} \pm$ Glukose

Zellmedium:	RPMI 1640* c(Glukose) = 11,1 $\mu\text{mol/ml}$	PBS^{++} c(Glukose) = 10 $\mu\text{mol/ml}$	PBS^{++} ohne Glukosezusatz
Versuch	Respirationsrate [nmol O_2/(min$\times 2 \times 10^6$ Zellen)]		
1	0,958	0,795	1,398
2	0,932	0,885	0,968
3	0,988	0,916	1,1
MW +/- SD	$0,96 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,06$	$1,16 \pm 0,22$

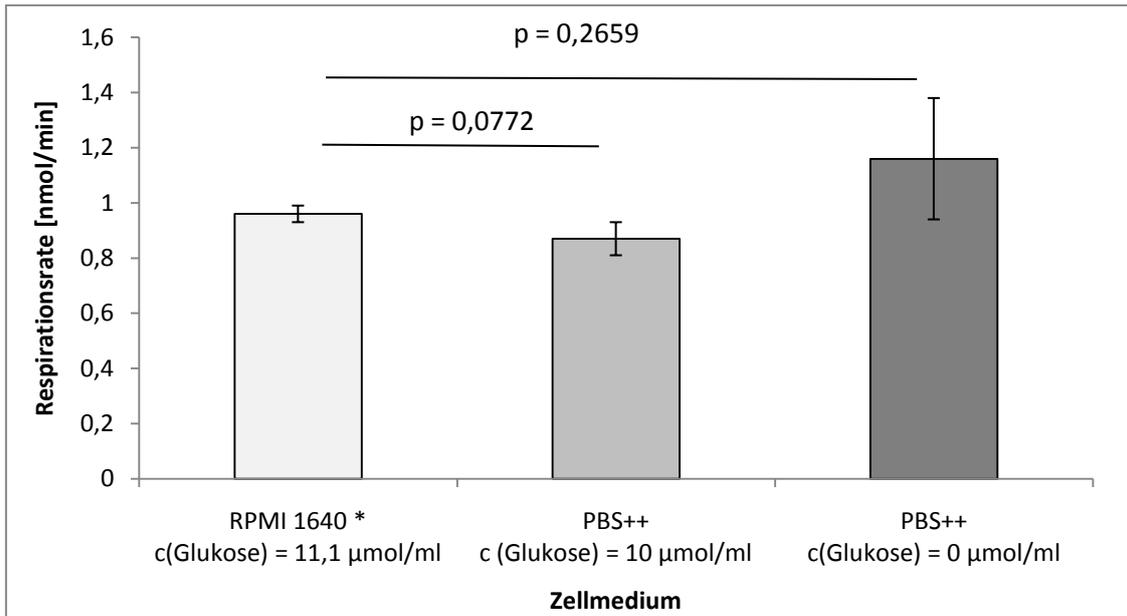


Abb. 19: Sauerstoffverbrauch von SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640* im Vergleich zu PBS⁺⁺ ± Glukose (n=3). MW ± SD. Werte siehe Tab. 30.

3.5. Einfluss der Gegenwart von 2-deoxy-D-Glukose auf die Respirationsrate von Neuroblastomzellen

In den vorhergehenden Versuchsreihen wurde festgestellt, dass Neuroblastomzellen auf verschieden hohe Glukoseangebote mit unterschiedlichen Respirationsraten reagieren. 2-deoxy-D-Glukose (2DG) hemmt die glykolytische Energiegewinnung und somit folgt ein geringerer Glukoseumsatz bei Zellen in Gegenwart von 2DG (Brown, 1962).

3.5.1. Einfluss der Gegenwart von 2-deoxy-D-Glukose auf die Respirationsrate von Kelly-Zellen

In diesem Versuchsansatz wurde exemplarisch der Einfluss von 2DG auf den Energiestoffwechsel von Kelly-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Respirationsraten nach Inkubation in RPMI 1640* mit Zusatz von 1 µmol 2DG/ml bestimmt und parallel dazu eine Kontrolle mit RPMI 1640* ohne 2DG Zusatz mitgeführt. In dem hier

verwendeten Zellkulturmedium RPMI 1640* sind laut Produktinformation (siehe Anhang) 11,1 μmol Glukose/ml enthalten. Die Versuchsergebnisse zeigten eine Erhöhung der Respirationsrate der Zellen in RPMI 1640* mit 2DG Zusatz (2,51 $\text{nmol O}_2/\text{min}$) im Vergleich zur Kontrolle (2,28 $\text{nmol O}_2/\text{min}$).

Tabelle 31: Respirationsrate von Kelly-Zellen in RPMI 1640* Medium \pm 1 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 2DG

Zellmedium	Respirationsrate [$\text{nmol O}_2/(\text{min} \times 2 \times 10^6 \text{ Zellen})$]
RPMI 1640*	2,28
RPMI 1640* c(2DG) = 1 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	2,51

3.5.2. Einfluss der Gegenwart von 2-deoxy-D-Glukose auf die Respirationsrate von SK-N-SH-Zellen

Der bereits in 3.5.1. beschriebene Versuch wurde ebenfalls für SK-N-SH-Zellen durchgeführt. Aus Tab. 32 ist ersichtlich, dass bei SK-N-SH-Zellen anders als bei Kelly-Zellen nach Inkubation mit 2DG die Respirationsrate niedriger (0,698 $\text{nmol O}_2/\text{min}$) war als bei der Kontrolle (1,11 $\text{nmol O}_2/\text{min}$).

Tabelle 32: Respirationsrate von SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640* Medium \pm 2DG

Zellmedium	Respirationsrate [$\text{nmol O}_2/(\text{min} \times 2 \times 10^6$
RPMI 1640*	1,11
RPMI 1640* c(2DG) = 1 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	0,698

3.6. Einfluss von Dichloracetat auf Neuroblastomzellen

DCA wirkt inhibitorisch auf die Pyruvat Dehydrogenase Kinase und stimuliert somit indirekt die Pyruvat Dehydrogenase. Dies könnte eine Verschiebung des Zellstoffwechsels von der Glykolyse hin zu OXPHOS verursachen. In den folgenden Versuchsreihen wurde exemplarisch untersucht, welchen Einfluss DCA (f.c.: 1 mmol/l) auf das Wachstum und den Energie-/Glukosestoffwechsel der drei

Neuroblastomzelllinien Kelly, SK-N-SH und LS hat. Es wurde auf Grund des Wirkungsmechanismus von DCA eine Abnahme der Laktatproduktion und des Glukoseverbrauches, sowie eine Zunahme der Respirationsrate von Zellen unter Einfluss von DCA erwartet.

Aus Vorversuchen an Kelly-Zellen (MTT-Test, siehe Abb. 22) war bekannt, dass DCA im Konzentrationsbereich 250-2000 $\mu\text{mol/l}$ die Vitalität (lebende Zellpopulation) um ca. 20 % hemmt. Daher wurde zusätzlich zur Respirationsrate, dem Glukoseverbrauch und der Laktatproduktion auch die Proliferation von Kelly, SK-N-SH und LS-Zellen in 750 ml Zellkulturflaschen bestimmt. Die Neuroblastomzellen wurden mit $1\mu\text{mol}$ DCA/ml über 3 Tage in RPMI 1640* in 750 ml Zellkulturflaschen bei 37°C im Brutschrank inkubiert und die oben genannten Bestimmungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (siehe auch Material und Methoden, Tab. 17). Vergleichend dazu wurde von jeder Zelllinie eine Kontrolle von Zellen in Abwesenheit von DCA-Zusatz im RPMI 1640* Medium mitgeführt.

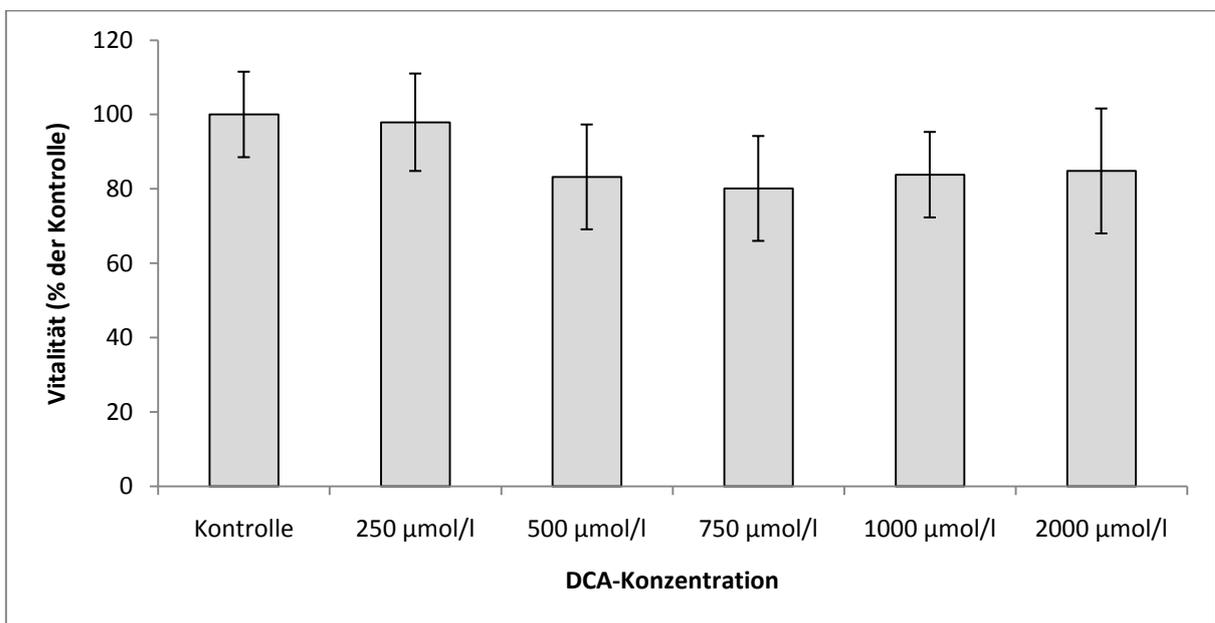


Abb. 22: MTT-Test, in dem die Vitalität von Kelly-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen DCA Konzentrationen (250 $\mu\text{mol/l}$ bis 2000 $\mu\text{mol/l}$) im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle untersucht wurde. Die Vitalität der Zellen der verschiedenen Ansätze ist in % der Kontrolle angegeben ($n=2$).

3.6.1. Entwicklung des Zellwachstums unter Dichloracetat Einfluss

Es ließ sich bei allen drei Zelllinien beobachten, dass in Gegenwart von DCA die Zellzahl weniger stark zunimmt als im RPMI 1640* Medium ohne DCA-Zusatz (Abb. 23-25). Bei Kelly-Zellen betrug die Ausgangszellzahl/Zellkulturflasche $7,5 \times 10^6$ Zellen. Nach 73h lag die Zellzahl der mit DCA inkubierten Kelly-Zellen bei $31,4 \times 10^6$ Zellen/Zellkulturflasche, die Zellzahl der Kontrolle lag bei $35,4 \times 10^6$ Zellen/Zellkulturflasche (Abb. 23). Die Ausgangszellzahl/Zellkulturflasche bei SK-N-SH-Zellen lag bei $2,34 \times 10^6$ Zellen. Nach 76,5h Inkubation mit DCA lag die Zellzahl bei $9,84 \times 10^6$ Zellen, die Zellzahl der Kontrolle betrug $12,48 \times 10^6$ Zellen pro Zellkulturflasche (Abb. 24). Bei LS-Zellen lag die Zellzahl bei Stunde 0 in beiden Zellkulturflaschen jeweils bei $1,83 \times 10^6$ Zellen. Nach 67,25h Inkubation mit DCA war die Zellzahl 12×10^6 Zellen/Zellkulturflasche, die Zellzahl der Kontrolle war $14,16 \times 10^6$ Zellen/Zellkulturflasche (Abb. 25).

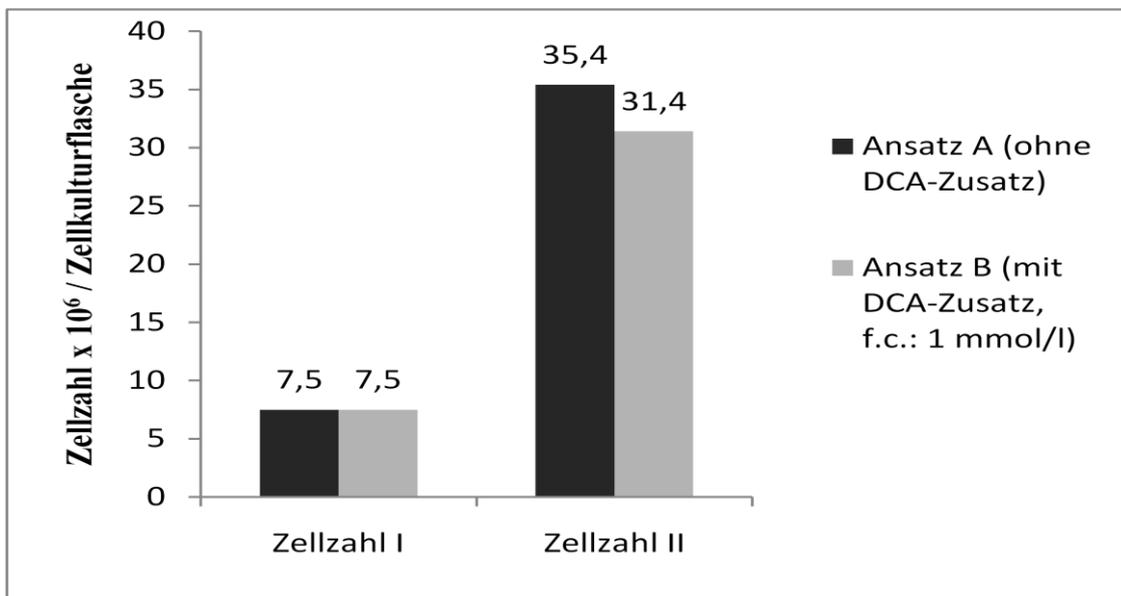


Abb. 23: Zellzahlentwicklung Kelly-Zellen mit und ohne DCA Inkubation in RPMI 1640* bei 37°C. Bestimmung der Zellzahl nach 0 Stunden (Zellzahl I) und 73 Stunden (Zellzahl II).

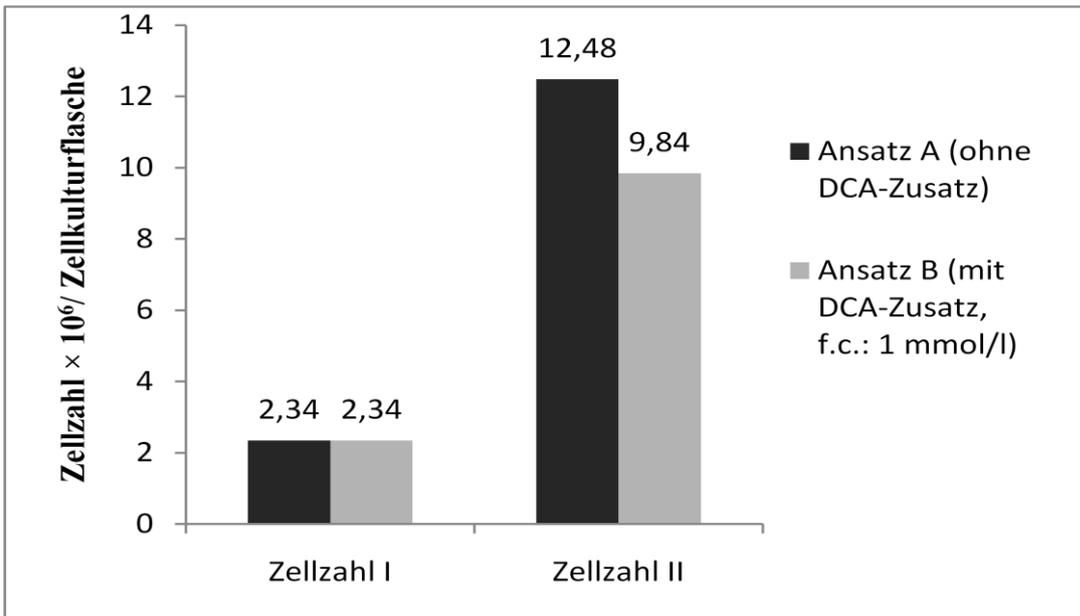


Abb. 24: Zellzahlentwicklung SK-N-SH-Zellen mit und ohne DCA Inkubation in RPMI 1640* bei 37°C. Bestimmung der Zellzahl nach 0 Stunden (Zellzahl I) und 76,5 Stunden (Zellzahl II).

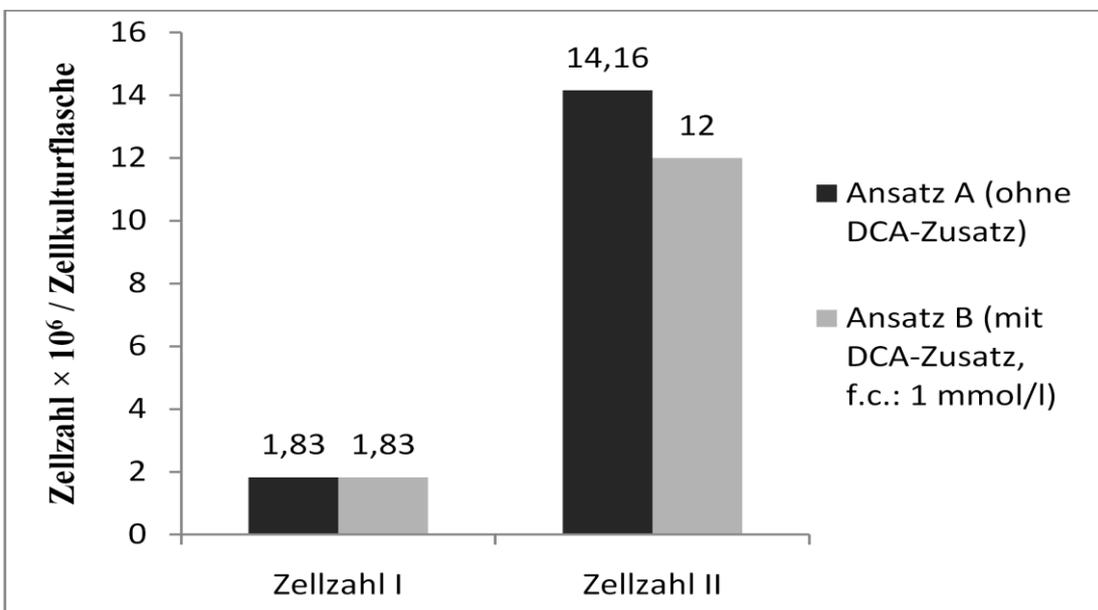


Abb. 25: Zellzahlentwicklung LS-Zellen mit und ohne DCA Inkubation in RPMI 1640* bei 37°C. Bestimmung der Zellzahl nach 0 Stunden (Zellzahl I) und 67,25 Stunden (Zellzahl II).

3.6.2. Einfluss von Dichloracetat auf die Respirationsrate, den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion von Kelly-Zellen

Bei Kelly-Zellen war die Respirationsrate nach 3 Tagen Inkubation mit 1 $\mu\text{mol/ml}$ DCA f.c. höher (2,78 $\text{nmol O}_2/\text{min}$ pro 2×10^6 Zellen) als bei der Kontrolle (RPMI 1640* ohne DCA Zusatz), hier lag die Respirationsrate bei 2,05 $\text{nmol O}_2/\text{min}$ pro 2×10^6 Zellen.

Zur Auswertung der Glukose- und Laktatwerte (Wertetabellen siehe Anhang), die während der Inkubation zu verschiedenen Zeitpunkten erhoben wurden (Beschreibung siehe Tab. 17 in Material und Methoden), wurde jeweils eine Graphik der Werteentwicklung (Abb. 26 und 27) erstellt. Auf Grund des offensichtlich linearen Verlaufes der Glukoseabnahme bzw. Laktatzunahme im Inkubationsmedium wurde jeweils eine Ausgleichgeraden jeder Wertegruppe gebildet. Mit Hilfe dieser Ausgleichsgeraden (Formeln im Anhang aufgelistet) wurden der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion pro Minute am Ende der Inkubationszeit (Tab. 32) berechnet (Rechenbeispiel siehe Anhang).

Der Glukoseverbrauch war in Gegenwart von DCA etwas niedriger (1,66 nmol Glukose/ml pro Minute) als bei der Kontrolle (1,94 nmol Glukose/ml pro Minute) (Tab. 32). Die Laktatproduktion pro Minute lag ebenfalls etwas niedriger in Gegenwart von DCA (1,7 nmol Laktat/ml pro Minute, siehe Tab. 32) als bei der Kontrolle (2,4 nmol Laktat/ml pro Minute).

Die Abnahme der Glukosekonzentration als auch die Zunahme der Laktatproduktion in der Zellflasche über 73 Stunden war in Gegenwart von DCA geringer als bei der Kontrolle (Abb. 26, Werttabelle siehe Anhang).

Tabelle 32: Sauerstoffverbrauch \pm DCA, Glukoseverbrauch \pm DCA und Laktatproduktion \pm DCA bei Kelly-Zellen

Zellmedium	Respirationsrate [nmol O ₂ /(min \times 2 \times 10 ⁶ Zellen)]	Glukoseverbrauch [nmol/(min \times ml)]	Laktatproduktion [nmol/(min \times ml)]	Laktatausbeute der Glykolyse in % vom theoretischen Wert
Ansatz A ohne DCA	2,05	1,94	2,4	61,9
Ansatz B mit DCA (f.c.: 1 μ mol/ml)	2,78	1,66	1,7	51,2

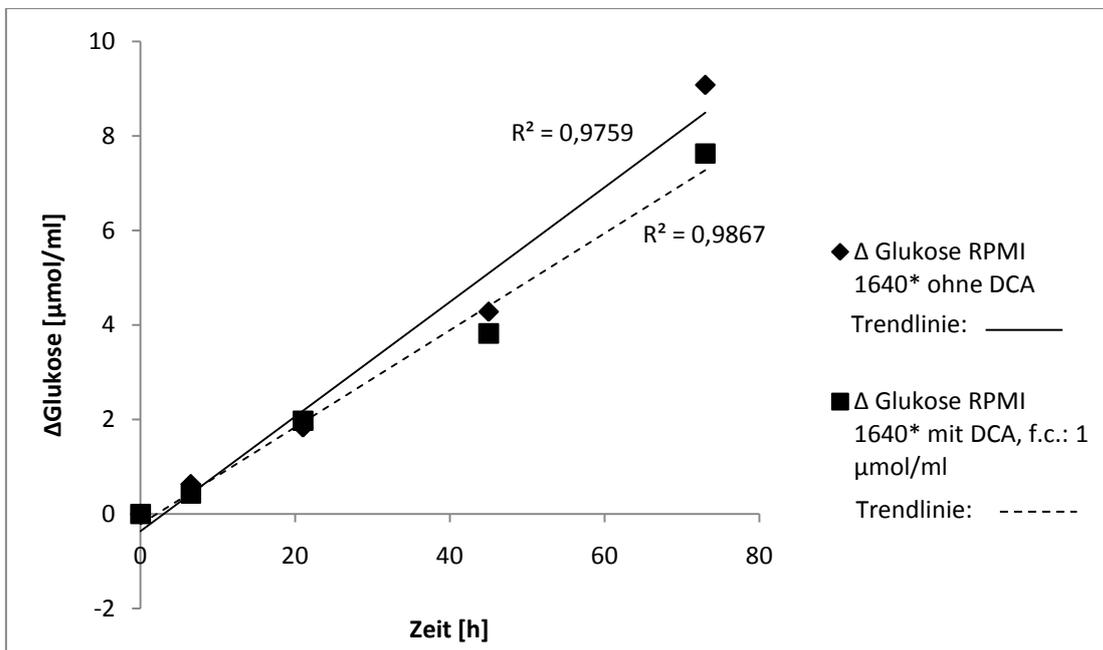


Abb. 26: Glukoseverbrauch von Kelly-Zellen mit und ohne DCA-Inkubation (f.c.: 1 μ mol/ml), Abnahme der Glukosekonzentration über 73 Stunden. $R^2 =$ Bestimmtheitsmaß.

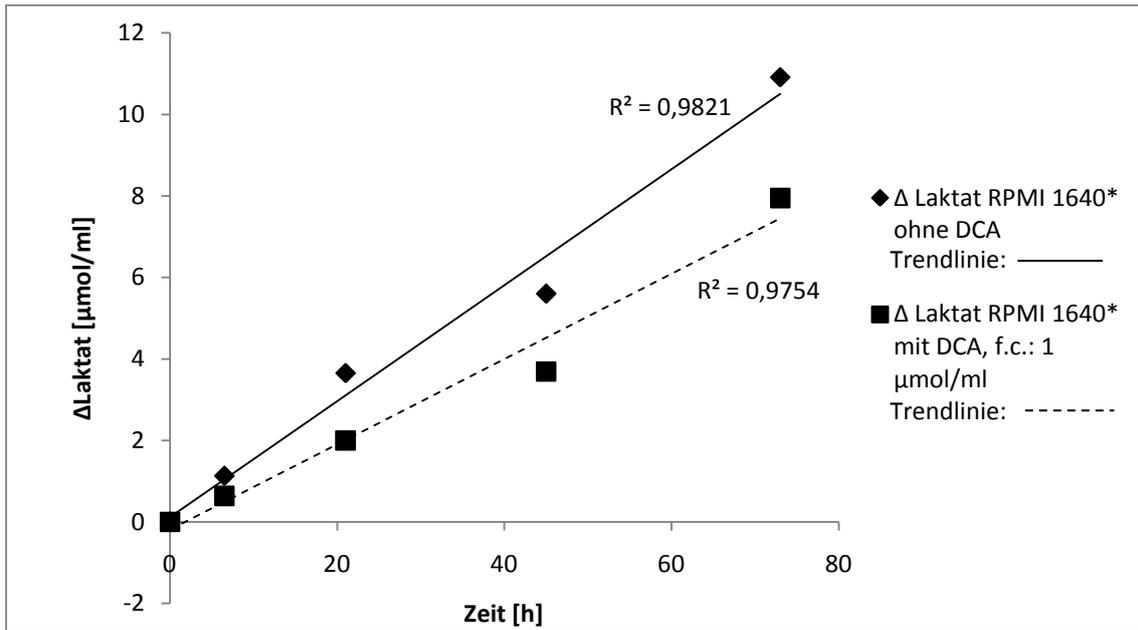


Abb. 27: Laktatproduktion von Kelly-Zellen mit und ohne DCA-Inkubation (f.c.: 1 $\mu\text{mol/ml}$), Zunahme der Laktatwerte über 73 Stunden. R^2 = Bestimmtheitsmaß.

3.6.3. Einfluss von Dichloracetat auf die Respirationsrate, den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion von SK-N-SH-Zellen

Die Respirationsrate von 2×10^6 Zellen war nach 3 Tagen Inkubation mit 1 μmol DCA/ml nur geringfügig niedriger [(2,56 O_2 nmol/(min \times 2×10^6 Zellen))] als bei der Kontrolle (2,76 nmol O_2 /(min \times 2×10^6 Zellen)] (Tab. 33). Die Auswertung der Glukose- und Laktatbestimmungen erfolgte wie in 3.6.2. beschrieben. Der Glukoseverbrauch pro Minute war in der Zellkulturflasche mit 1 μmol DCA-Zusatz/ml [0,49 nmol Glukose/(min \times ml)] leicht erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle [0,6 Glukose/(min \times ml)] (Tab. 33). Die Laktatproduktion pro Minute lag bei Zellen nach DCA Inkubation bei 1,05 nmol Laktat/(min \times ml) und damit etwas unter der Laktatproduktion der Kontrolle [1,31 nmol Laktat/(min \times ml)] (Tab. 33). Die Abnahme der Glukosekonzentration als auch die Zunahme der Laktatproduktion in der Zellflasche über 77 Stunden war in Gegenwart von DCA geringer als bei der Kontrolle (Abb. 28 und 29, Wertetabelle siehe Anhang). In Abb. 28 und Abb. 29 wurde auf Grund einer Fehlmessung der

Glukosemesswert zur 0. Stunde nicht mit in die Auswertung aufgenommen. Δ Glukose berechnet sich für SK-N-SH-Zellen daher in Bezug auf den Messwert zur 6,5 Stunde.

Tabelle 33: Sauerstoffverbrauch \pm DCA, Glukoseverbrauch \pm DCA und Laktatproduktion \pm DCA bei SK-N-SH-Zellen

Zellmedium	Respirationsrate [nmol/(min \times 2×10^6 Zellen)]	Glukoseverbrauch [nmol/(min \times ml)]	Laktatproduktion [nmol/(min \times ml)]	Laktat- ausbeute der Glykolyse in % vom theoretischen Wert
Ansatz A ohne DCA	2,76	0,6	1,31	109,2
Ansatz B mit DCA (f.c.: 1 μ mol/ml)	2,56	0,49	1,05	107,1

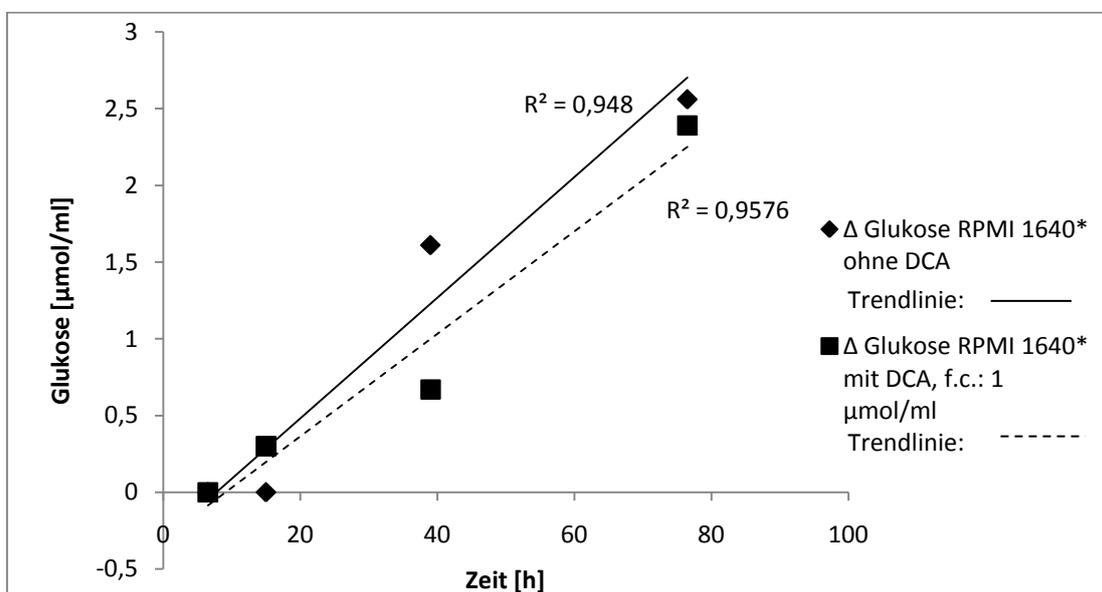


Abb. 28: Glukoseverbrauch von SK-N-SH-Zellen mit und ohne DCA-Inkubation (f.c.: 1 μ mol/ml). Abnahme der Glukosekonzentration über 77 Stunden. Der Glukoseverbrauch zur 0. Minute wurde auf Grund einer Fehlmessung vernachlässigt, die Werte für Δ Glukose berechnen sich bezüglich des Glukosemesswertes zur 6,5 Stunde. R^2 =Bestimmtheitsmaß.

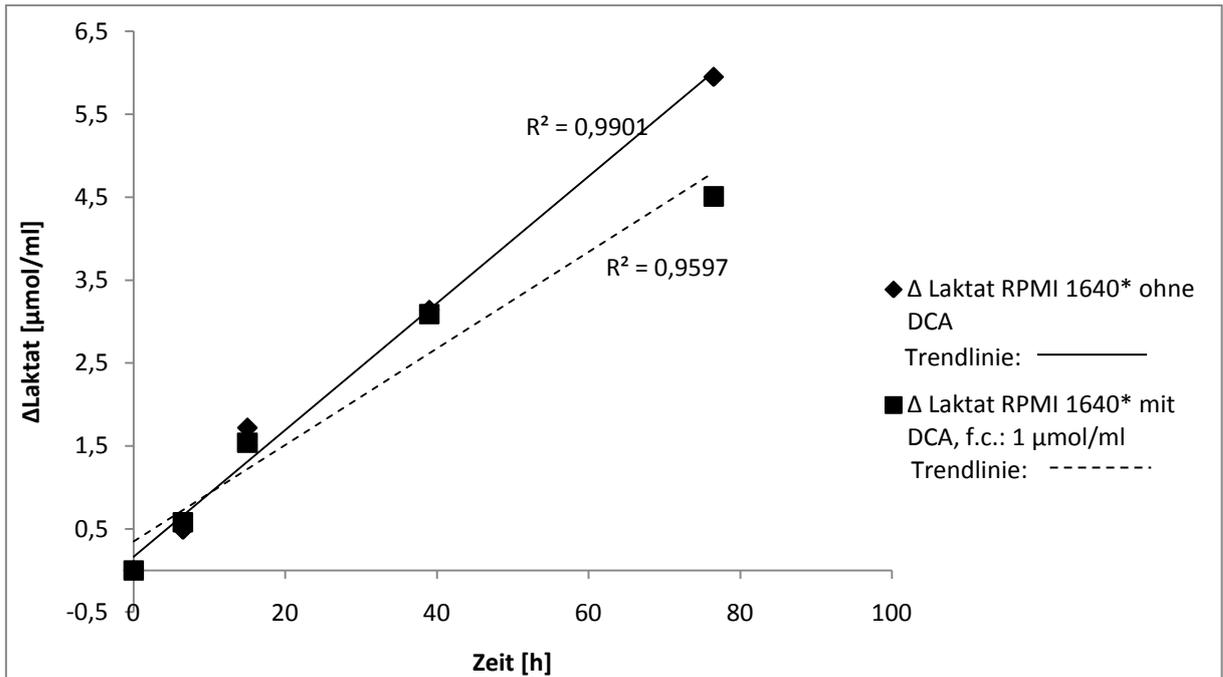


Abb. 29: Laktatproduktion von SK-N-SH-Zellen mit und ohne DCA Inkubation (f.c.: 1 $\mu\text{mol/ml}$),. Zunahme der Laktatwerte im Zellmedium über 77 Stunden.

3.6.4. Einfluss von Dichloracetat auf die Respirationsrate, den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion von LS-Zellen

Bei der Respirationsrate von 2×10^6 Zellen LS-Zellen war nach DCA Inkubation (f.c. : 1 $\mu\text{mol/ml}$) kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle feststellbar (Tab. 34).

Die Auswertung der Glukose- und Laktatbestimmungen erfolgte wie in 3.6.2. beschrieben. Der Glukoseverbrauch pro Minute lag bei DCA-inkubierten Zellen unter dem der Kontrolle (1,82 nmol Glukose/ml im Vergleich zu 2,48 nmol Glukose/min), ebenso war die Laktatproduktion pro Minute niedriger (1,21 nmol Laktat/ml im Vergleich zu 2,44 nmol Laktat/ml) (Tab. 34).

Die Abnahme der Glukosekonzentration als auch die Zunahme der Laktatproduktion in der Zellflasche über 67,25 Stunden war in Gegenwart von DCA geringer als bei der Kontrolle (Abb. 30 und 31).

Tabelle 34: Sauerstoffverbrauch \pm DCA, Glukoseverbrauch \pm DCA und Laktatproduktion \pm DCA bei LS-Zellen

Zellkultur-medium	Respirationsrate [nmol O ₂ /min \times 2 \times 10 ⁶ Zellen]	Glukoseverbrauch [nmol/(min \times ml)]	Laktatproduktion [nmol/(min \times ml)]	Laktat-ausbeute der Glykolyse in % vom theoretischen Wert
Ansatz A: ohne DCA	4,23	2,48	2,44	49,2
Ansatz B: mit DCA (f.c.: 1 μ mol/ml)	4,21	1,82	1,21	33,2

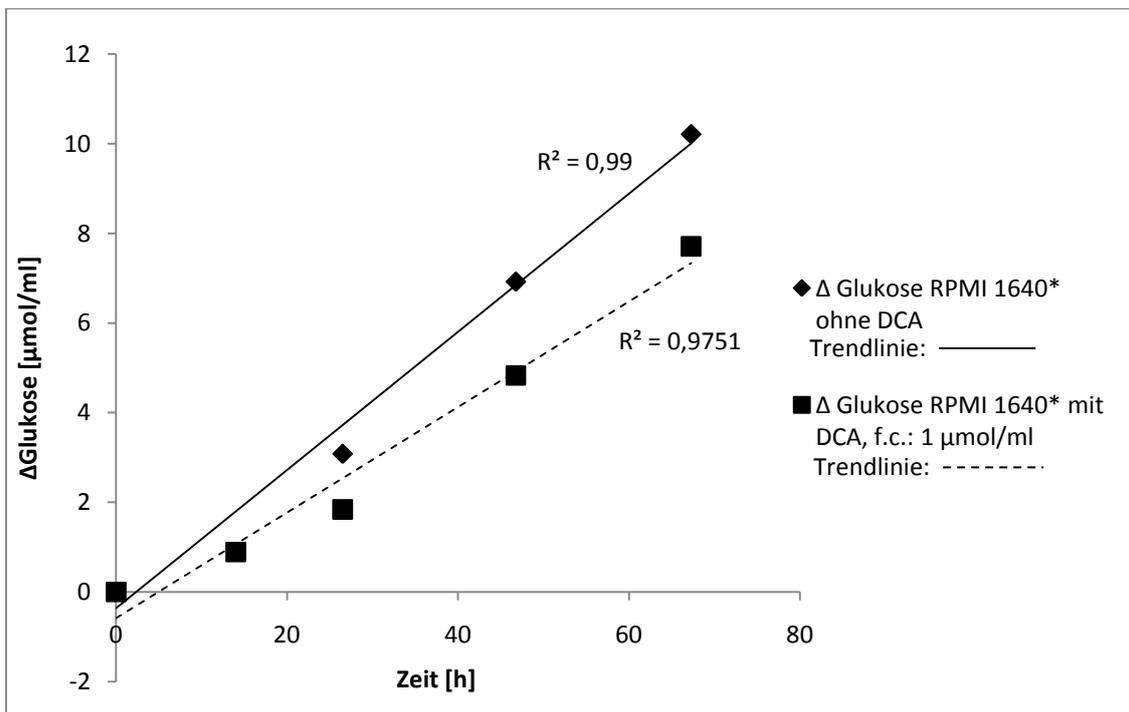


Abb. 30: Glukoseverbrauch von LS-Zellen mit und ohne DCA Inkubation (f.c.: 1 μ mol/ml). Abnahme der Glukosekonzentration über 67,25 Stunden. Der Wert für Δ Glukose Zellmedium A (ohne DCA) bei 14 Stunden wurde auf Grund einer Fehlmessung vernachlässigt. R^2 = Bestimmtheitsmaß.

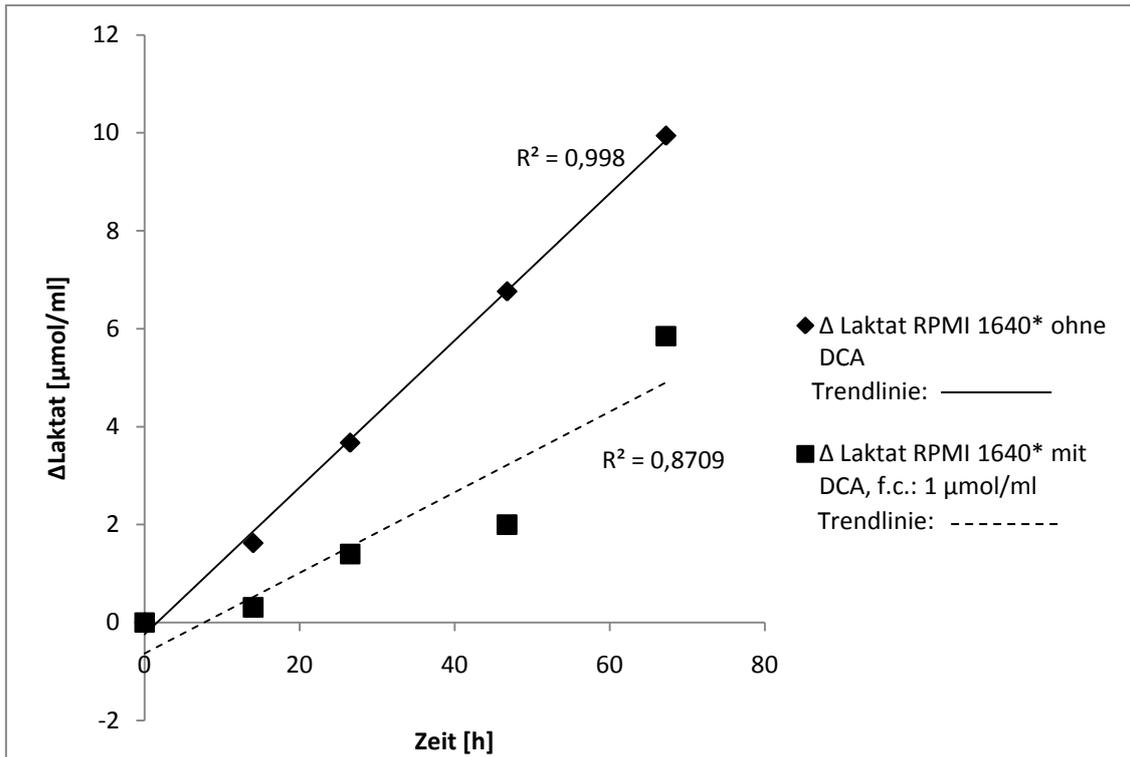


Abb. 31 : Laktatproduktion von LS-Zellen mit und ohne DCA Inkubation (f.c.: 1 $\mu\text{mol/ml}$). Zunahme der Laktatkonzentration im Zellmedium über 67,25 Stunden

3.6.5. Zusammenfassender Vergleich des Sauerstoff- und Glukoseverbrauchs sowie der Laktatproduktion von Neuroblastomzellen in Abwesenheit und Gegenwart von Dichloracetat

Die Sauerstoffverbrauchsrate von Zellen, die zuvor für 70-80 Stunden in Abwesenheit bzw. Gegenwart von DCA inkubiert wurden, war bei Kelly-Zellen bei DCA-inkubierten Zellen höher [$2,78 \text{ nmol}/(\text{min} \times 2 \times 10^6 \text{ Zellen})$] als bei Zellen im Normalmedium [$2,05 \text{ nmol}/(\text{min} \times 2 \times 10^6 \text{ Zellen})$]. Bei SK-N-SH-Zellen war nach DCA-Inkubation kein nennenswerter Unterschied der Respirationsrate im Vergleich zur Kontrolle erkennbar, die Respirationsrate bei Zellen nach DCA Inkubation lag mit $2,76 \text{ nmol}/(\text{min} \times 2 \times 10^6 \text{ Zellen})$ etwas höher als bei der mitgeführten Kontrolle [$2,56 \text{ nmol}/(\text{min} \times 2 \times 10^6 \text{ Zellen})$]. Bei LS war die Respirationsrate der DCA-inkubierten Zellen ebenfalls fast gleichbleibend im Vergleich zu Zellen in RPMI 1640* ohne DCA-Zusatz [$4,23$ und $4,21 \text{ nmol}/(\text{min} \times 2 \times 10^6 \text{ Zellen})$] (Tab. 35). In Gegenwart von DCA war bei allen 3

Zelllinien der Glukoseverbrauch pro Minute geringer als bei der jeweiligen Kontrolle (Tab. 35). Die Laktatproduktion pro Minute war bei allen Zelllinien nach DCA-Inkubation deutlich niedriger (Tab. 35).

Tabelle 35: Zusammenfassender Vergleich des Sauerstoffverbrauchs, Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion von Kelly-, SK-N-SH- und LS-Zellen in Abwesenheit und Gegenwart von DCA

Zelllinie	Zellkultur-medium	Respirationsrate [nmol/(min × 2×10 ⁶ Zellen)]	Glukoseverbrauch [nmol/(ml × min)]	Laktatproduktion [nmol/(ml × min)]	Laktat- ausbeute der Glykolyse in % vom theoretischen Wert
Kelly	RPMI 1640*	2,05	1,94	2,4	61,9
	RPMI 1640* DCA 1µmol/ml f.c.	2,78	1,66	1,7	51,2
SK-N-SH	RPMI 1640*	2,76	0,6	1,31	109,2
	RPMI 1640* DCA 1µmol/ml f.c.	2,56	0,49	1,05	107,1
LS	RPMI 1640*	4,23	2,48	2,44	49,2
	RPMI 1640* DCA 1µmol/ml f.c.	4,21	1,82	1,21	33,2

3.7. Sauerstoffverbrauch von Neuroblastom-Mitochondrien

In diesen Versuchsreihen wurde der Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien von Neuroblastomzellen (Zelllinien: Kelly, LS und SK-N-SH) untersucht. Hierzu wurden die Mitochondrien isoliert und ihre basale Respirationsrate sowie die Respirationsraten nach Zugabe von Succinat (f.c.: 80 µmol/ml) und ADP (f.c.: 0,4 µmol/ml) bestimmt. In jedem Mitochondrienisolat wurde die Proteinmenge mittels der Lowry-Methode

bestimmt, um diese als ungefähres Bezugssystem für die Auswertung der Sauerstoffsverbrauchsmessungen zu verwenden. Es konnte nicht von einem genauem Bezugssystem ausgegangen werden, da, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrienisolaten (Abb. 36-38) zeigten, diese Kontaminationen mit anderen Zellbestandteilen aufwiesen, die wahrscheinlich einen Einfluss auf die Proteinbestimmungen hatten. Zur Auswertung der Versuchsergebnisse wurde zunächst eine Eichkurve mit einer BSA-Standard-Lösung in Storage Buffer erstellt (siehe Abb. 32). Anhand dieser Eichkurve wurden die Extinktionswerte der Proteinbestimmung in μg umgerechnet.

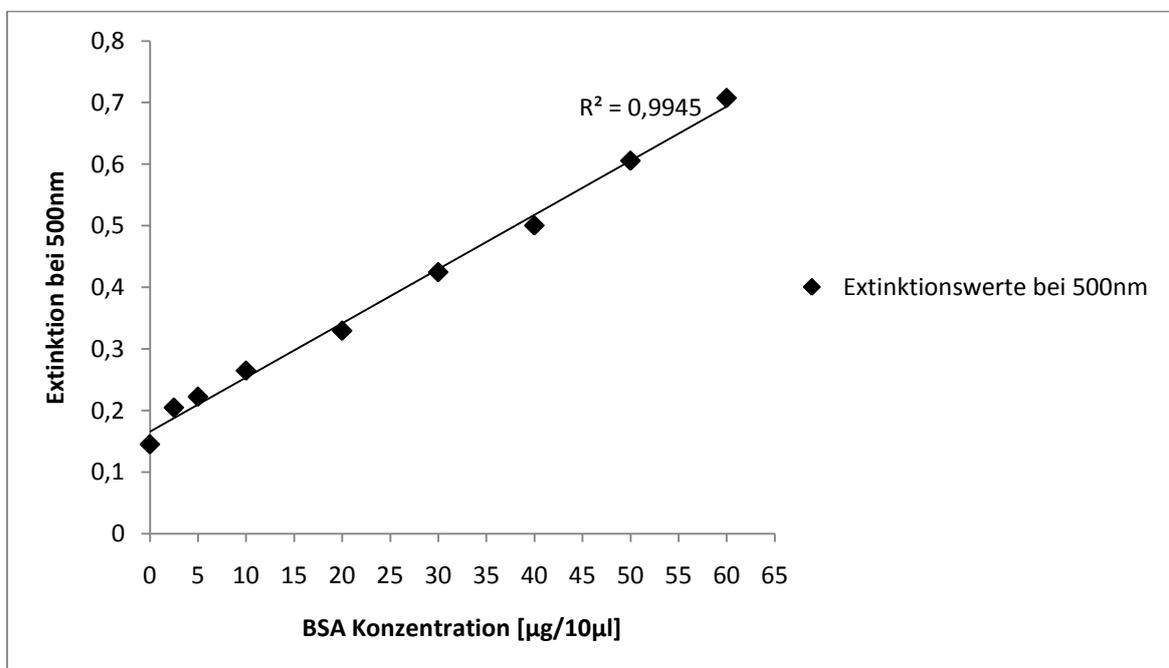


Abb. 30: BSA Standard Eichkurve mit *Qproteome Mitochondrien Isolation Kit Storage Buffer* als Lösungsmittel. R^2 =Bestimmtheitsmaß. Wertetabelle siehe Anhang.

In Tab. 36 sind die Respirationsraten der Mitochondrien und die mit Hilfe der in Abb. 32 dargestellten Eichkurve ermittelten Proteinkonzentrationen in $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Mitochondriensuspension angegeben. Mit Hilfe dieser Werte wurden die Respirationsraten pro 100 μg Protein berechnet (Tab. 36). In Tab. 36 sind nur die basale Respirationsrate sowie die Respirationsrate nach Succinatzugabe aufgelistet. Es konnte in keiner der Versuchsreihen eine Steigerung der Respirationsrate nach ADP-Zugabe

verzeichnet werden (Respirationsraten nach Zugabe von ADP: Siehe Anhang). Bei Kelly-Mitochondrien stieg die Respirationsrate nach Succinat Zugabe von $0,13 \pm 0,06$ auf $0,29 \pm 0,03$ nmol O_2 /(min \times 100 μ g Protein). Der Unterschied zwischen den ermittelten basalen Respirationsraten und den Respirationsraten nach Succinat Zugabe war signifikant ($p = 0,0152$, zweiseitiger, ungepaarter t-Test) (Tab. 36). Die Respirationsrate der SK-N-SH Mitochondrien stieg nach Succinatzugabe von $0,37 \pm 0,18$ auf $1,93 \pm 0,84$ nmol O_2 /(min \times 100 μ g Protein). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Raten vor und nach Succinatzugabe festgestellt werden ($p = 0,0879$, zweiseitiger, ungepaarter t-Test mit Welch Korrektur). LS-Mitochondrien wiesen eine Steigerung der Respirationsrate von $0,18 \pm 0,03$ auf $0,55 \pm 0,035$ nmol O_2 /(min \times 100 μ g Protein) auf. Die statistische Auswertung der Ergebnisse ergab einen signifikanten Unterschied der Respirationsraten von LS-Mitochondrien vor und nach Zugabe von Succinat ($p < 0,0001$, zweiseitiger, ungepaarter t-Test). Die Respirationsrate nach Succinat-Zugabe lag insgesamt bei allen drei Zelllinien (Kelly, SK-N-SH und LS) über der basalen Respirationsrate (Tab. 36).

Abb. 33 veranschaulicht die in Tab. 36 aufgelisteten Respirationsraten. Zur besseren Übersicht wurde die Respirationsrate nach Succinatzugabe in % der basalen Respirationsrate angegeben. Die in Abb. 33 dargestellten Werte sind MW \pm SD.

Tabelle 36: Sauerstoffverbrauchsmessung bei isolierten Mitochondrien

Zelllinie	basale Respirations-rate [nmol O ₂ / (min×ml)]	Succinat-induzierte Respirations-rate [nmol O ₂ / (min×ml)]	c(Protein) [µg/100 µl]	basale Respirations-rate [nmol O ₂ / (min×100 µg Protein)]	Succinat-induzierte Respirationsrate [nmol O ₂ / (min×100 µg Protein)]
Kelly	0,274	1,16	416,3	0,066	0,279
Kelly	0,677	1,46	541,5	0,125	0,27
Kelly	0,11	0,19	57,2	0,192	0,325
MW ±	0,35 ± 0,29	0,94 ± 0,67		0,13 ± 0,06	0,29 ± 0,03
SK-N-SH	1,28	6,93	368,4	0,347	1,881
SK-N-SH	0,31	1,5	53,9	0,566	2,783
SK-N-SH	0,55	2,95	264,8	0,208	1,114
MW ±	0,71 ± 0,54	3,79 ± 2,8		0,37 ± 0,18	1,93 ± 0,84
LS	0,53	1,8	343	0,155	0,525
LS	0,997	2,87	561,5	0,178	0,511
LS	0,97	3,46	621,6	0,155	0,557
LS	0,43	1,12	189,9	0,23	0,59
MW ±	0,73 ± 0,25	2,31 ± 0,91		0,18 ± 0,03	0,55 ± 0,035

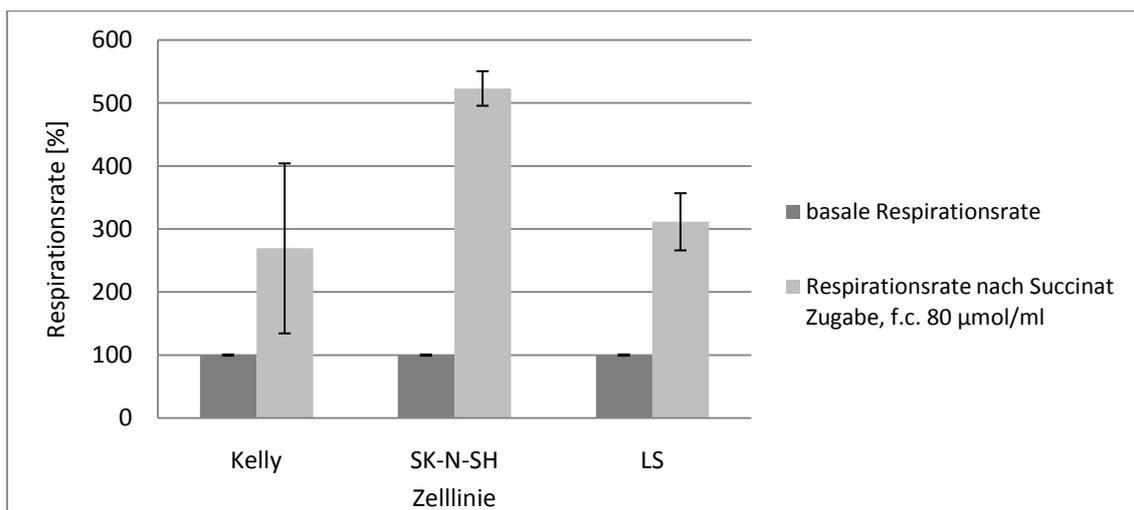


Abb. 33: Darstellung der Respirationsraten bezogen auf die Proteinkonzentration von Mitochondrien, isoliert aus Kelly, SK-N-SH und LS-Zellen, vor und nach Succinatzugabe (f.c.: 80 µmol/ml). Die basale Respirationsrate wurde jeweils als 100% gesetzt.

3.8. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrienisolationen

Es wurden von jeder Zelllinie (SK-N-SH, Kelly und LS) elektronenmikroskopische Aufnahmen von jeweils einem der in Tab. 36 dargestellten Mitochondrienisolat erstellt (Abb. 36-38). Zur Übersicht sind die parallel zu den elektronenmikroskopischen Aufnahmen erhobenen Proteinwerte und Respirationsraten noch mal in Tab. 37 aufgeführt.

Hiermit sollte einerseits die mitochondriale Morphologie veranschaulicht werden, zum Anderen sollte überprüft werden, ob eine höhere Mitochondriendichte mit einer höheren Proteinkonzentration einhergeht. In Abb. 34 sind die in Tab. 37 aufgeführten Ergebnisse graphisch veranschaulicht, wobei die Respiationsraten, wie auch für Abb. 33 beschrieben, in Prozent umgerechnet wurden.

Tabelle 37: Sauerstoffverbrauchsmessung bei Mitochondrienisolaten parallel zu elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Zelllinie	basale Respirations-rate[nmol O ₂ /(min×ml)]	Succinat-induzierte Respirations-rate[nmol O ₂ /(min×ml)]	c(Protein) [µg/100 µl]	basale Respirations rate[nmol O ₂ /(min×100 µg Protein)]	Succinat-induzierte Respirations -rate[nmol O ₂ (min×100 µg Protein)]
SK-N-SH	0,55	2,95	264,8	0,21	1,11
Kelly	0,11	0,19	57,2	0,19	0,33
LS	0,43	1,12	189,9	0,23	0,59

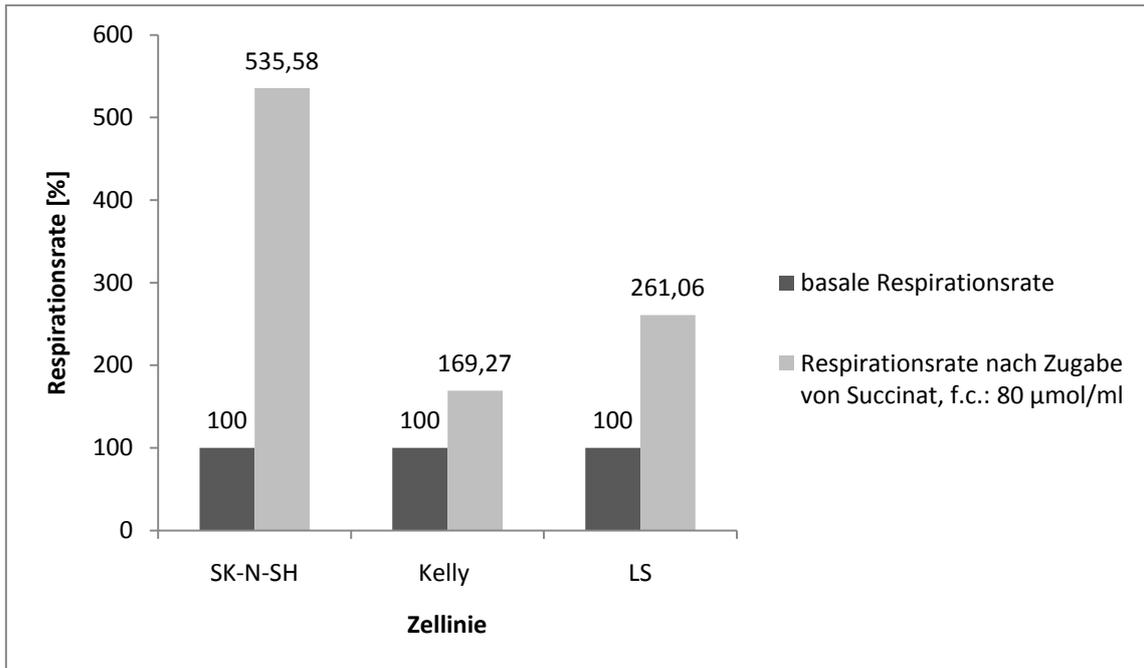


Abb. 34: Darstellung der Respirationsraten bezogen auf die Proteinkonzentration von Mitochondrien, isoliert aus Kelly-, SK-N-SH- und LS- Zellen, vor und nach Succinatzugabe (f.c.: 0,08 mmol/ml). Die Respirationsrate der unstimulierten Mitochondrien wurde jeweils als 100 % gesetzt.

Abb. 35 zeigt zur Übersicht die elektronenmikroskopische Aufnahme einer SK-N-SH-Zelle.

Abb. 36a-b zeigen zwei Vergrößerungen des SK-N-SH-Mitochondrienisolats. Die dargestellten Mitochondrien besitzen im Vergleich zu den Aufnahmen der LS Zellreihe (Abb. 38a-b) eine dichtere Mitochondrienmatrix, der Cristaeraum hingegen ist weniger dicht. Insgesamt enthält das Isolat im Vergleich zum LS-Mitochondrienisolat (Abb. 38a-b) mehr Verunreinigungen.

Der Proteingehalt dieser SK-N-SH-Mitochondriensuspension lag bei 264,8 µg/100 µl, die Respirationsrate stieg nach Stimulation der Mitochondrien mit Succinat von 0,21 auf 1,11 nmol O₂/(min×100 µg Protein) (Tab. 37).

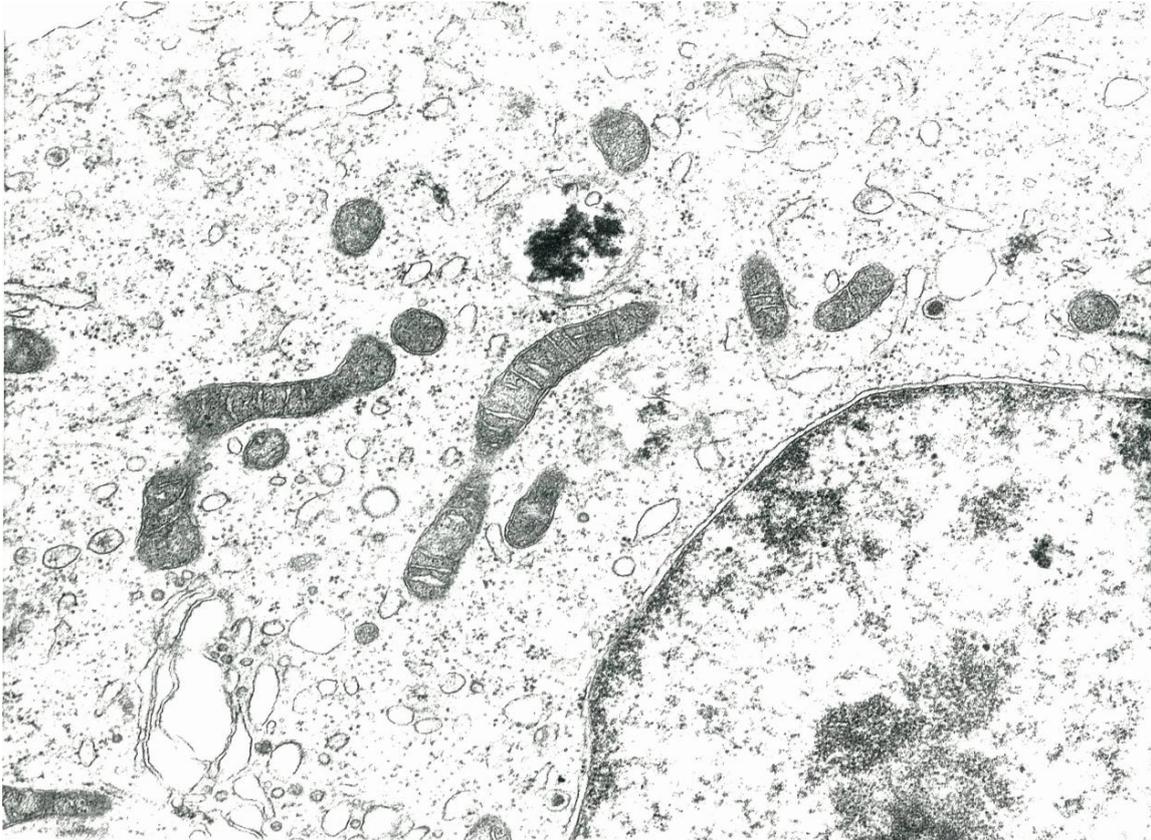


Abb. 35: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer SK-N-SH-Zelle, Vergrößerung: $20\ 000 \times 2,5$. Freundliche Bereitstellung durch Prof. Wolburg, Pathologisches Institut, Universität Tübingen.

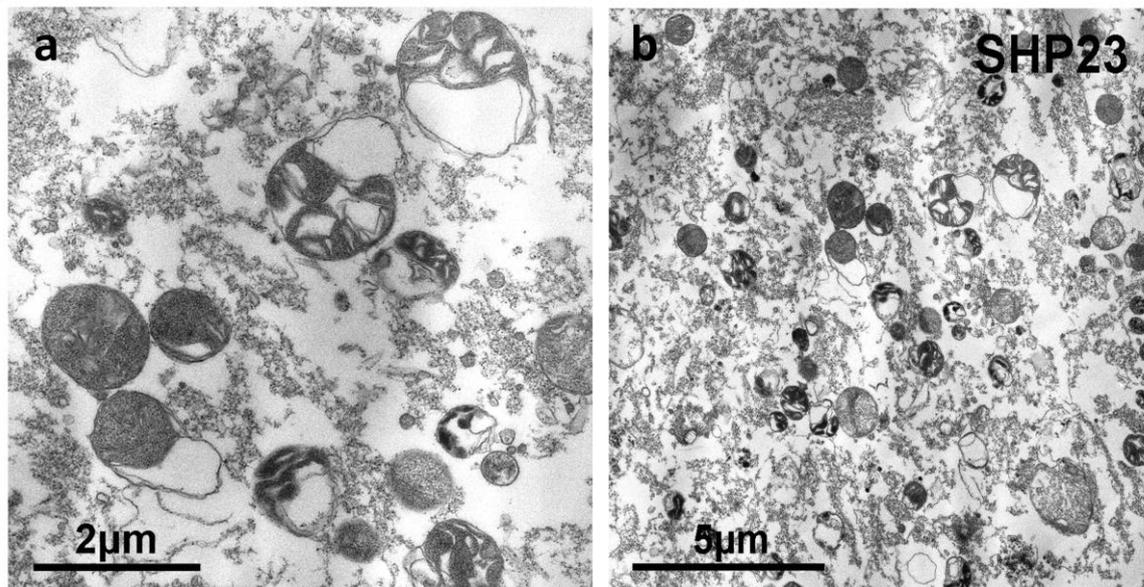


Abb. 36a-b: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Mitochondrienisolats der SK-N-SH-Zellen. Freundliche Bereitstellung durch Prof. Wolburg, Pathologisches Institut, Universität Tübingen.

Das Mitochondrienisolat der Kelly-Zellen (Abb. 37a-b) zeigt Mitochondrien, die morphologisch denen der SK-N-SH-Zellen ähneln und ebenfalls einen dichteren Matrixraum und einen aufgelockerten Cristaeraum im Vergleich zu den LS-Mitochondrien (Abb. 38a-b) aufweisen. Insgesamt ist in diesem Bildabschnitt eine geringere Anzahl an Mitochondrien sichtbar als in der SK-N-SH-Mitochondriensuspension. Die Proteinkonzentration lag unter dem des SK-N-SH-Mitochondrienisolats (57,2 µg/100 µl Mitochondriensuspension). Die Respirationsrate der Kelly-Mitochondrien stieg von 0,19 auf 0,33 nmol O₂/(min×100 µg Protein) und lag insgesamt unter der Respirationsrate der SK-N-SH-Zellen. Die LS-Mitochondrienisolat wiesen in der elektronenmikroskopischen Untersuchung eine höhere Mitochondriendichte auf (Abb. 38a-b) als die Isolate der SK-N-SH- und Kelly-Zellen (Abb. 36-37). Die LS-Mitochondrien sind in den Abb. 37a und 37b in unterschiedlichen Ebenen angeschnitten und wiesen morphologisch einen verdichteten Cristaeraum und eine aufgelockerte Matrix auf im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien auf. Der Proteingehalt des LS-Mitochondrienisolats lag mit 189,9 µg/100 µl über dem der Kelly-Mitochondriensuspension und unter dem des SK-N-SH-Mitochondrienisolats. Die Kontamination des LS-Mitochondrienisolats schien im Vergleich zu den Mitochondrienisolaten der beiden anderen Zelllinien geringer zu sein. Die basale Respirationsrate der LS-Mitochondrien lag bei 0,23 nmol O₂/(min×100 µg Protein) und stieg nach Succinatzugabe auf 0,59 nmol O₂/(min×100 µg Protein). Sie lag somit unter dem der SK-N-SH-Mitochondrien aber über dem der Kelly-Mitochondrien.

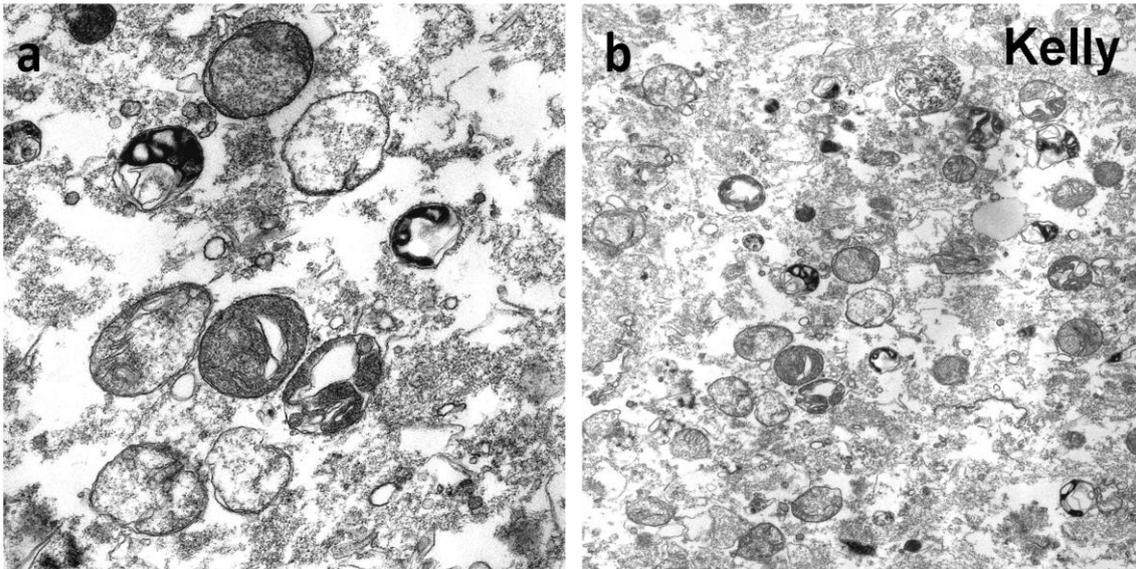


Abb. 37a-b: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Mitochondrienisolats der Kelly-Zellen. Freundliche Bereitstellung durch Prof. Wolburg, Pathologisches Institut, Universität Tübingen.

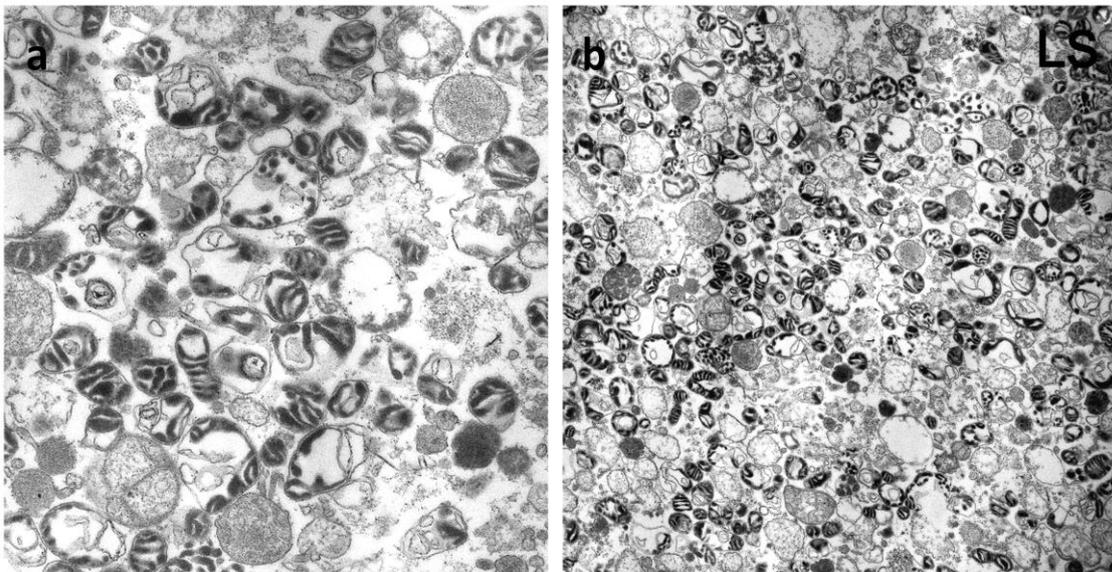


Abb. 38a-b: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Mitochondrienisolats der LS-Zellen. Freundliche Bereitstellung durch Prof. Wolburg, Pathologisches Institut, Universität Tübingen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Sauerstoffverbrauchsmessungen bei humanen Neuroblastomzellen (Zelllinien: Kelly, LS, SK-N-SH) und ihren isolierten Mitochondrien durchgeführt. Der Sauerstoffverbrauch wurde dabei in Beziehung zum Glukoseumsatz gebracht. Es sollte zusätzlich festgestellt werden, in welchem Ausmaß die hier ausgewählten Neuroblastomzelllinien Glukose zu Laktat umsetzen (aerobe Glykolyse, Warburg Effekt).

Es gibt Hinweise dafür, dass der Warburg Effekt bei Neuroblastomzellen eine Rolle spielt. So wird auf Grund ihres erhöhten Glukoseumsatzes bei Neuroblastomen erfolgreich die PET-Diagnostik mit Fluordesoxyglukose angewendet (Kushner et al., 2001). Hypoglykämie kann bei Neuroblastomzellen nekrotischen Zelltod auslösen, Hypoxie jedoch nicht (Kögel et al., 2006). Dazu passt, dass Neuroblastomzellen den anaeroben Zustand vorzuziehen scheinen (Mazzio und Soliman, 2004). Das myc-Onkogen ist in Zusammenhang mit dem Warburg Effekt gebracht worden (Boon et al., 2001; Huang, 2008; Kim und Dang, 2005). Da bei einigen Neuroblastomzelllinien eine N-myc-Amplifikation vorliegt, ist dies ein weiterer Hinweis für das Vorliegen der aeroben Glykolyse bei Neuroblastomzellen. Smith et al., 2008 hatten allerdings in Neuroblastomzellen mit N-myc-Amplifikation keine Korrelation zwischen N-myc-Expression und dem Warburg Effekt feststellen können.

Kelly- und SK-N-SH-Zellen sind seit langem etablierte Zelllinien für in vitro Untersuchungen an Neuroblastomzellen (Preis et al., 1988; Biedler et al., 1973). Die Charakteristika beider Zelllinien sind in mehreren Arbeiten ausführlich untersucht worden (Kuçi et al., 2002; Biedler et al., 1973; Preis et al., 1988). Für die hier vorliegende Arbeit wurden Kelly- und SK-N-SH-Zellen ausgewählt, da sie unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten besitzen. Außerdem weisen Kelly-Zellen eine N-myc-Amplifikation auf, während SK-N-SH-Zellen keine N-myc-Amplifikation aber eine vermehrte N-myc-Expression aufweisen (Schwab et al., 1983). Die N-myc-Amplifikation ist mit aggressiven Tumorverhalten und schlechter Prognose korreliert worden (Bordow et al., 1998; Brodeur et al. 1984; Norris et al., 2000). Tang et al., 2006 stellten jedoch in einer Studie von Neuroblastomzellen mit unterschiedlicher

N-myc-Amplifikation fest, dass eine hohe N-myc-Expression von Neuroblastomzellen, die keine N-myc-Amplifikation aufweisen, mit einem benignen Phänotyp einherging. Sie vermuteten, dass bei diesen Neuroblastomzellen die Apoptose-induzierende Funktion von N-myc dominiert (Tang et al., 2006). Somit zeigen diese beiden Zelllinien grundlegende Unterschiede, die sie als geeignete Versuchssysteme zur Untersuchung des Warburg Effektes bei Neuroblastomzellen ausweisen.

Zusätzlich zu den Kelly- und SK-N-SH-Zellen wurden für die nachfolgend dargestellten Versuchsreihen LS-Zellen verwendet. LS-Zellen gehören einem aggressiven Tumorphänotyp an und weisen eine N-myc-Amplifikation auf (Rudolph et al., 1991). Für die durchgeführten Untersuchungen wurden also zwei Zelllinien (Kelly und LS) verwendet, die dem N-myc amplifizierten, aggressiven Tumorphänotyp angehören. Als Gegenbeispiel gehören SK-N-SH-Zellen einem nicht N-myc-amplifizierten Phänotyp an (Schwab et al., 1983).

4.1. Zusammenhang zwischen Zellzahl bzw. Zellproteinmenge und der zellulären Respirationsrate

Die Respirationsraten der Kelly- und der SK-N-SH-Zellen waren unterschiedlich. Bei Kelly Zellen lag der Sauerstoffverbrauch bei 1,73 nmol O₂/min/10⁶ Zellen (in PBS⁺⁺ ohne Glukose) und 1,25 nmol O₂/min/10⁶Zellen (in RPMI 1640*). SK-N-SH-Zellen verbrauchten 0,83 nmol O₂/min/10⁶Zellen (PBS⁺⁺) und 0,45 nmol O₂/min/10⁶Zellen (RPMI 1640*).

Die hier ermittelten Respirationsraten sind ähnlich hoch wie die zellulären Respirationsraten, die ebenfalls mit Hilfe der Clark-Elektrode bei anderen Tumorzelllinien festgestellt wurden (Wu et al., 2006; Schulz et al. 2006; Fantin et al., 2006; Rossignol et al., 2004). In dieser Arbeit wurde die Darstellung der Respirationsraten in nmol O₂/min/Zellzahl gewählt, da eine genaue Zellzahleinstellung pro Messkammer möglich war.

In einigen Arbeiten sind die mittels Clark Elektroden erhobenen Respirationsraten von Neuroblastomzellen auf die Zellproteinkonzentration bezogen worden (Smith et al., 2008; Stolze et al., 2002). Daher wurden die Respirationsraten von 1×10⁶ Kelly-Zellen

und von 1×10^6 SK-N-SH-Zellen exemplarisch auf $\text{nmol O}_2/\text{min}$ pro $100 \mu\text{g}$ Protein bezogen. Bei Kelly-Zellen lag sie bei $0,74 \text{ nmol O}_2/\text{min}$ pro $100 \mu\text{g}$ Protein (Zellen in PBS^{++}) und $0,54 \text{ nmol O}_2/\text{min}$ pro $100 \mu\text{g}$ Protein (Zellen in RPMI 1640*). Bei SK-N-SH-Zellen lagen die so bestimmten Respirationswerte bei $0,49 \text{ nmol O}_2/\text{min}$ pro $100 \mu\text{g}$ Protein (Zellen in PBS^{++}) und $0,26 \text{ nmol O}_2/\text{min}$ pro $100 \mu\text{g}$ Protein (Zellen in RPMI 1640*). Smith et al, 2008 ermittelten bei der Neuroblastomzelllinie BE(2)-C eine Respirationsrate von ca. $7,5 \text{ nmol O}_2/\text{min}/\text{mg}$ Protein, bei NBL-S ca. $3,3 \text{ nmol O}_2/\text{min}/\text{mg}$ Protein und bei SH-EP ca. $1,5 \text{ nmol O}_2/\text{min}/\text{mg}$ (Die Zellen waren für die Messungen inkubiert in TD buffer enthaltend 137 mM NaCl , 5 mM KCl , $0,7 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $25 \text{ mM Tris}\cdot\text{HCl}$ pH 7.4). Auf $100 \mu\text{g}$ Protein bezogen liegen sie in einem vergleichbaren Bereich wie die hier erhobenen Respirationsraten von Kelly- und SK-N-SH-Zellen. BE(2)-C ist eine Zelllinie mit N-myc-Amplifikation; NBL-S und SH-EP zeigen beide keine N-myc-Amplifikation. Die Zelllinie mit der N-myc-Amplifikation (BE(2)-C) wies bei Smith et al., 2008 den höchsten Sauerstoffverbrauch auf. Bei den Ergebnissen dieser Arbeit zeigten Kelly-Zellen, die im Gegensatz zu den SK-N-SH-Zellen eine N-myc-Amplifikation aufweisen, einen höheren Sauerstoffverbrauch als SK-N-SH-Zellen. Da Smith et al., 2008 eine andere Form der Zellproteinbestimmung verwendeten, sind die Sauerstoffverbrauchsraten allerdings nur bedingt vergleichbar. In den vorliegenden Ergebnissen der Respirationsraten von Kelly und SK-N-SH-Zellen (Tab. 21) konnte ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Respirationsrate und der eingesetzten Zellzahl gezeigt werden: Unabhängig vom Reaktionsmedium hatten bei beiden Zelllinien 1×10^6 Zellen die niedrigste Respirationsrate und 3×10^6 Zellen wiesen die höchste Respirationsrate auf. Der Anstieg der Respirationsrate bezogen auf die Zellzahl verlief linear (siehe Abb. 14). Im Vergleich der Respirationsraten zeigte sich bei beiden eingesetzten Zelllinien die gleiche Tendenz: Bei Kelly-Zellen lag die Respirationsrate über dem der SK-N-SH-Zellen, sowohl in PBS^{++} ($c(\text{Glukose}) = 0 \text{ mmol/l}$) als auch in RPMI 1640* ($c(\text{Glukose}) = 11,1 \text{ mmol/l}$).

Der verschieden hohe Sauerstoffverbrauch der beiden Zelllinien könnte in der unterschiedlichen Wachstumsrate begründet sein. Kelly-Zellen weisen eine höhere Wachstumsrate auf als SK-N-SH-Zellen (Preis et al., 1988). Somit könnten Kelly-Zellen einen höheren Energiebedarf aufweisen und somit eine höhere Respirationsrate. Es konnte insgesamt gezeigt werden, dass Neuroblastomzellen in glukosefreiem

PBS⁺⁺ eine höhere Respirationsrate aufweisen als in RPMI 1640*. Zudem unterschieden sich die Respirationsraten der Zellen bei verschieden hohem Glukoseangebot im Medium. Diese Effekte wurden in anschließenden Versuchen genauer untersucht und werden im Folgenden diskutiert.

4.2. Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen

Aufgrund der hohen Zellwachstumsrate in Tumoren entstehen Tumorregionen, die weit vom versorgenden Blutgefäß entfernt sind (Gatenby und Gillies, 2004). In dieser Situation sinkt die Glukosekonzentration im Gewebe langsamer als der pO₂ (Helmlinger et al., 1997). Somit entstehen hypoxische Regionen, die Zellen einen Überlebensvorteil bieten, die ihren Energiebedarf vor allem über die Glykolyse decken. Ein Vorteil des Warburg Effektes ist, dass der glykolytische Phänotyp Tumorzellen vor Hypoxie schützt (Graeber et al., 1996), die bei Normalzellen letztendlich zur Einleitung von Apoptose oder Nekrose führt (Papandreou et al., 2005). Allerdings ist der Zellstoffmetabolismus von Tumorzellen vermehrt von Glukose abhängig, da bei der Glykolyse (Glukose → Laktat) pro mol Glukose weniger ATP (2 mol ATP/mol Glukose) produziert wird als bei der OXPHOS (> 30 mol ATP/mol Glukose) (Löffler und Petrides, 2003). Dies wird bei Tumorzellen des glykolytischen Phänotyps durch eine vermehrte Glukoseaufnahme kompensiert, welche die Grundlage der PET-Diagnostik mit [¹⁸F] 2-Fluordesoxyglukose darstellt (Kunkel et al., 2003; Macheda et al., 2001; Younes et al., 1996). Außerdem kann Glukosedepriuation bei vielen Tumorzellen zur Apoptose führen (Shim et al., 1998). Bei Neuroblastomzellen ist ebenfalls eine erhöhte Glukoseaufnahme (Kushner et al., 2001) sowie Apoptose bei Hypoglykämie nachgewiesen worden (Kögel et al., 2006).

4.2.1. Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von Kelly-Zellen

Es wurden die Respirationsraten von 2×10^6 Kelly-Zellen in glukosefreiem PBS⁺⁺, in PBS⁺⁺ mit 1 µmol Glukose/ml und 5 µmol Glukose/ml miteinander verglichen. Die

Zellzahl wurde ausgewählt aufgrund des vorher festgestellten linearen Zusammenhangs zwischen Zellzahl und Respirationsrate, um bei eventuellen Schwankungen der Respirationsraten in einem gut messbaren Bereich zu bleiben. Bei den hier untersuchten Kelly-Zellen fanden sich signifikant niedrigere Respirationsraten von Zellen in PBS⁺⁺ Medium mit 5 μmol Glukose/ml im Vergleich zu Zellen, die in PBS⁺⁺ Medium mit 1 μmol Glukose/ml ($p = 0,0338$) oder in glukosefreiem PBS⁺⁺ ($p = 0,0044$) kultiviert worden waren. Zudem war die Respirationsrate von Zellen in PBS⁺⁺ mit 1 μmol Glukose/ml signifikant niedriger als von Zellen in glukosefreiem PBS⁺⁺ ($p = 0,0239$). Die Daten zeigen also bei Kelly-Zellen eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs in Gegenwart von Glukose. Die Inhibierung der Zellatmung durch Glukose wird als Crabtree Effekt bezeichnet (Crabtree, 1929). Die im Vergleich zu den Respirationsraten erhobenen Glukoseverbrauch- und Laktatproduktionsbestimmungen zeigten, dass ein erhöhtes Glukoseangebot bei Kelly-Zellen zu einer vermehrten Glykolyse führt. Bei einem nur über die Glykolyse stattfindenden Energiemetabolismus wird 1 mol Glukose zu 2 mol Laktat abgebaut. Bei einem Glukosemetabolismus ausschließlich über die OXPHOS sollte keine Laktatproduktion nachweisbar sein. Es wurde festgestellt, dass 2×10^6 Zellen pro Minute bei einem Glukoseangebot von 1 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 7 nmol Glukose zu 5 nmol Laktat abbauen (Tab. 24). Dies entspricht einer Laktatausbeute von 36 % der theoretisch möglichen Laktatausbeute von 14 nmol. Bei einem Glukoseangebot von 5 μmol verstoffwechselten 2×10^6 Zellen pro Minute 4 nmol Glukose zu 4 nmol Laktat; die Laktatausbeute lag damit bei 50 %. Bei steigendem Glukoseangebot wurde also pro mol Glukose mehr Laktat produziert. Da Laktat das Endprodukt der aeroben/anaeroben Glykolyse darstellt, lässt dies auf eine erhöhte Glykolyserate schließen. Parallel dazu war der Sauerstoffverbrauch von 2×10^6 Zellen bei einem Glukoseangebot von 5 μmol Glukose niedriger als bei einem Glukoseangebot von 1 μmol (Tab. 24). Die hier vorliegenden Daten zeigen, dass bei Kelly-Zellen durch das vermehrte Glukoseangebot die Glykolyse stimuliert und der Sauerstoffverbrauch gehemmt wird. Passend dazu ist festgestellt worden, dass die Expression des Akt-Onkogens zu einer vermehrten Glykolyserate führt, ohne die oxidativen Phosphorylierung zu steigern (Elstrom et al., 2004).

Auffällig war die hohe Respirationsrate von Kelly-Zellen in glukosefreiem PBS⁺⁺ im Vergleich mit Zellen in PBS⁺⁺ mit Glukosezusatz. PBS⁺⁺ enthält weder Glukose noch

Glutamin-Zusätze (siehe Anhang). Glukose und Glutamin sind als bevorzugte Substrate des Energiestoffwechsels von Tumorzellen bekannt (Reitzer et al., 1979; Wise et al., 2008). Des Weiteren enthält PBS⁺⁺ keine Substrate, die für den Energiestoffwechsel in Betracht gezogen werden könnten. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Zellen im Fall der Glukosedepriuation Substrate für den Energiestoffwechsel aus endogenen Glykogenspeichern gewinnen. Glykogen lässt sich, mit Ausnahme von Erythrozyten, in allen Zellen des menschlichen Organismus finden (Löffler und Petrides, 2003). Allerdings besitzen Zellen des zentralen Nervensystems nur geringe Glykogenspeicher (Löffler und Petrides, 2003). Dies passt zu der Annahme, dass Tumorzellen ihren Energiebedarf über die Glykolyse nur dann decken können, wenn ihnen ausreichend Glukose zur Verfügung steht (Gillies und Gatenby, 2007; Vander Heiden et al., 2009).

Insgesamt legen die hier gemachten Beobachtungen nahe, dass Kelly-Zellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu einer Steigerung ihres Sauerstoffverbrauchs im Rahmen der OXPHOS in der Lage sind. Dies widerspricht der von Warburg ursprünglich aufgestellten Hypothese, dass die aerobe Glykolyse aufgrund einer geschädigten mitochondrialen Funktion entsteht (Warburg, 1956a). Es ist allerdings inzwischen gezeigt worden, dass verschiedene Tumorzellen tatsächlich Störungen der mitochondrialen Funktion aufweisen (Denko, 2008; Lopez-Rios et al., 2007), z.B. Verlust der Tumorsuppressorgene, die für die Succinat Dehydrogenase bzw. Fumarat Hydratase, zwei wichtige Enzyme des Citratstoffwechsels, kodieren (Selak et al., 2005). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Kelly-Zellen in Gegenwart von Sauerstoff, solange Glukose zur Verfügung steht, vermehrt aerobe Glykolyse zur ATP-Gewinnung verwenden. Im Falle der Glukosedepriuation greifen die Zellen vermehrt auf die Energiegewinnung über die OXPHOS zurück.

4.2.2. Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von SK-N-SH-Zellen

Es wurden die Respirationsraten von 2×10^6 SK-N-SH Zellen in glukosefreiem PBS⁺⁺, PBS⁺⁺ mit 1 μ mol Glukose/ml und PBS⁺⁺ mit 5 μ mol Glukose/ml miteinander verglichen.

Bei den untersuchen SK-N-SH-Zellen fand sich, wie bereits bei Kelly-Zellen

beschrieben, eine signifikant niedrigere Respirationsrate von Zellen in PBS⁺⁺ Medium mit 5 µmol Glukose/ml im Vergleich zu Zellen in glukosefreiem Medium ($p = 0,0039$). Im Vergleich zu Zellen in PBS⁺⁺ Medium mit einer niedrigeren Glukosekonzentration (1 µmol/ml) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,0809$). Bei SK-N-SH-Zellen lag, anders als bei Kelly-Zellen, keine signifikante Verminderung der Respirationsrate bei einer Erhöhung der Glukosekonzentration von 1 auf 5 µmol/ml vor (Tab. 25, Abb.18). Die Anwesenheit von Glukose vermag also bei SK-N-SH-Zellen nicht in dem Ausmaß den Sauerstoffverbrauch zu reduzieren wie bei Kelly-Zellen. SK-N-SH-Zellen wiesen wie Kelly-Zellen in glukosefreiem Medium den höchsten Sauerstoffverbrauch auf (Tab. 25). Wie bereits bei Kelly-Zellen diskutiert wurde (siehe 4.2.1.), könnte dies auf einen Abbau intrazellulärer Glykogenspeicher zurück zu führen sein.

Bei SK-N-SH-Zellen wurde ebenfalls in einem Versuchsansatz der Sauerstoffverbrauch parallel zum Glukoseverbrauch und zur Laktatproduktion bestimmt (Tab. 26). Es zeigte sich, dass 2×10^6 SK-N-SH-Zellen, die einer Glukosekonzentration von 1 µmol/ml ausgesetzt waren, bei einem Glukoseverbrauch von 3 nmol Glukose nur 1 nmol Laktat produzierten, also eine Laktatausbeute der Glykolyse von 16,7 % stattfand. Bei einer Glukosekonzentration von 5 µmol/ml wurde bei einem Glukoseverbrauch von 2 nmol Glukose eine Laktatproduktion von 3 nmol Laktat festgestellt. Die Laktatausbeute lag hier also bei 75 % des theoretisch möglichen Umsatzes von 4 nmol Laktat bei alleiniger aerober Glykolyse.

Die Ergebnisse zusammengenommen lassen vermuten, dass SK-N-SH-Zellen wie die Kelly-Zellen die ATP-Generierung über die aerobe Glykolyse vorziehen, da bei vorhandenem Glukoseangebot ihr Sauerstoffverbrauch sinkt und ihre Laktatproduktion steigt.

4.2.3. Einfluss von Glukose auf den Energiestoffwechsel von LS-Zellen

Nach den Beobachtungen bei Kelly- und SK-N-SH-Zellen wurde bei LS-Zellen ebenfalls eine verminderte Respirationsrate in Gegenwart von Glukose vermutet. Daher

wurde die Respirationsrate von 2×10^6 LS-Zellen in glukosefreiem PBS⁺⁺ und in PBS⁺⁺ mit Glukosezusatz untersucht.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den beiden anderen Zelllinien, waren die Respirationsraten von LS-Zellen in Gegenwart von Glukose (1 μmol Glukose/ml) höher ($5,64 \pm 1,43$ nmol O₂/min) als in ihrer Abwesenheit ($3,1 \pm 1,08$ nmol O₂/min) ($p = 0,0836$). Die parallel zu den Sauerstoffverbrauchsmessungen erhobenen Glukoseverbrauchsbestimmungen zeigten bei Steigerung des Glukoseangebotes von 1 auf 5 μmol Glukose/ml einen signifikant höheren Glukoseverbrauch ($p = 0,0485$). Die Laktatproduktion bei vermehrtem Glukoseangebot stieg ebenfalls signifikant an ($p = 0,0375$). Bei einem Glukoseangebot von 1 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ lag die Laktatausbeute aus der Glykolyse bei 54,6 %. Bei steigendem Glukoseangebot auf 5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ stieg die Laktatausbeute auf 68,1 % (Tab. 28). Die Ergebnisse zeigen, dass LS-Zellen bei steigendem Glukoseangebot in Gegenwart von Sauerstoff sowohl den Sauerstoffverbrauch als auch die Laktatproduktion steigerten. In früheren Studien ist die Tumoraggressivität und Invasivität mit der aeroben Glykolyse korreliert worden (Gatenby und Gillies, 2004). Auf Grund von Erfahrungswerten ist die hohe Proliferationsrate von LS-Zellen bekannt. Daher wäre bei LS-Zellen ein ausgeprägter Warburg Effekt zu vermuten gewesen. Die hier vorliegenden Ergebnisse weisen aber aufgrund des vermehrten Sauerstoffverbrauchs bei steigender Glukosekonzentration darauf hin, dass bei den LS-Zellen (im Gegensatz zu Kelly- und SK-N-SH-Zellen) die Energieproduktion über eine gesteigerte aerobe Glykolyse und über eine Steigerung der OXPHOS möglich ist. Bei Neuroblastomzellen ist auch bei anderen Zelllinien bereits eine Präferenz für die OXPHOS festgestellt worden (Smith et al., 2008). Die Ergebnisse lassen eine Hochregulierung der mitochondrialen Respiration und der Glykolyse (\rightarrow Laktatproduktion) bei steigendem Glukoseangebot vermuten.

4.2.4. Der Energiestoffwechsel von Kelly-, SK-N-SH- und LS-Zellen im Vergleich

Aus den Beobachtungen zum Glukosestoffwechsel bei Neuroblastomzellen lässt sich insgesamt die Aussage treffen, dass alle drei Zelllinien in Gegenwart von Sauerstoff sowohl die Glykolyse (Glukose \rightarrow Laktat) als auch die OXPHOS zur

Energiegewinnung benutzen. Allerdings legen die Daten nahe, dass Kelly- und SK-N-SH-Zellen die Glykolyse intensiv zur Energiegewinnung heranziehen und bei steigendem Glukoseangebot den Sauerstoffverbrauch reduzieren. Man kann daher vermuten, dass bei diesen Zelllinien der Warburg Effekt stark ausgeprägt ist. LS-Zellen hingegen scheinen bei vermehrtem Glukoseangebot den oxidativen Glukosemetabolismus (Glykolyse \rightarrow $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) und damit den Sauerstoffverbrauch parallel zur Laktatproduktion zu steigern.

Die drei untersuchten Zelllinien unterscheiden sich unter anderem darin, dass LS- und Kelly-Zellen eine N-myc-Amplifikation aufweisen (Rudolph et al., 1991; Schwab et al., 1983), welche zu seiner Überexpression sowohl auf dem mRNA- als auch der Proteinebene führt (Nisen und Waber, 1988; Seeger et al., 1988; Slavic et al., 1990). SK-N-SH-Zellen weisen zwar eine hohe N-myc-Expression, aber keine N-myc-Amplifikation auf (Sadee et al., 1987; Schwab et al., 1983). Boon et al., 2001 fanden heraus, dass N-myc unter anderem die Expression von Genen erhöht, die in der Glykolyse involviert sind, also eine wichtige Rolle in der Regulierung der aeroben Glykolyse spielt.

N-myc-Amplifikation konnte mit schlechtem Krankheitsverlauf, Induktion von Angiogenese, Therapieresistenz und schlechter Prognose korreliert werden (Bordow et al., 1998; Meitar et al., 1996). In vielen Tumorzelllinien ist eine erhöhte Glukoseaufnahme mit erhöhter Tumoraggressivität und schlechter Prognose korreliert worden (Kunkel et al., 2003; Mochiki et al., 2004), und es wurde vermutet, dass die aerobe Glykolyse die Invasivität von Tumorzellen begünstigt (Gatenby und Gillies, 2004). Aufgrund dieser Studienlage könnte man bei einer Zelllinie mit erhöhter N-myc-Amplifikation vermuten, dass sie zu einer ausgeprägten aeroben Glykolyse neigt. Dementsprechend müssten Zelllinien mit erhöhter N-myc-Amplifikation eine relativ erhöhte Laktatproduktion im Vergleich zum Sauerstoffverbrauch aufweisen. Die hier durchgeführten Untersuchungen legen die Annahme nahe, dass diese Aussage nicht unbedingt zutreffen muss. Zwar weisen Kelly-Zellen eine Präferenz für die aerobe Glykolyse auf, SK-N-SH-Zellen, die keine N-myc-Amplifikation aufweisen, jedoch auch.

Es lässt sich aus den hier vorliegenden Ergebnissen keine zwingende Verbindung zwischen N-myc-Amplifikation und dem Warburg Effekt ableiten. Dies unterstützt die

Untersuchungsergebnisse von Smith et al., 2008, die keine Korrelation zwischen der N-myc-Expression bei Neuroblastomzellen und dem Auftreten des Warburg Effektes feststellen konnten.

4.3. Sauerstoffverbrauch von Neuroblastomzellen in normalem Zellkulturmedium (RPMI 1640*)

In den bisher beschriebenen Versuchen war die Abhängigkeit der Respirationsraten von Kelly- und SK-N-SH-Zellen von der Glukosekonzentration im Reaktionsmedium PBS⁺⁺ festgestellt worden, einem Basispuffer, der außer Glukose (wenn sie zugefügt wurde) keine weiteren Nährstoffe enthält. Anschliessend wurde das Verhalten von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640* untersucht, in welchem sie unter Standardbedingungen im Labor kultiviert werden. Es wurde die Respirationsrate von 2×10^6 Zellen in RPMI 1640* im Vergleich zur Respirationsrate von 2×10^6 Zellen in glukosefreiem oder 2×10^6 Zellen in glukosehaltigen (10 μmol Glukose/ml) PBS⁺⁺ Medium untersucht. Hierbei sollte festgestellt werden, ob neben Glukose noch andere Substrate im Zellmedium die Respirationsrate beeinflussen. RPMI 1640* enthält ca. 11,1 μmol Glukose/ml, ist also im Hinblick auf die physiologischen Bedingungen von 5 mmol Glukose/l sehr gut mit Glukose versorgt. Zudem enthält es 0,3 g Glutamin/l, also eine Glutaminkonzentration von 2 μmol /ml.

Es ist bekannt, dass Glutamin ein wichtiges Substrat für Tumorzellen ist (DeBerardinis et al., 2007; Reitzer et al., 1979; Souba, 1993; Vander Heiden et al., 2009). Es ist gezeigt worden, dass der Glutaminmetabolismus von Tumorzellen den Metabolismus anderer Aminosäuren übersteigt (Reitzer et al., 1979). Die Metabolisierung von Glutamin über die Glutaminolyse zu Laktat liefert NADPH. Zudem kann Glutamin über α -Ketoglutarat Citrat zur Verfügung stellen, das wiederum über Acetyl-CoA in die Lipidsynthese eingeschleust werden kann (siehe Abb. 5). Durch Transaminierungsreaktionen unterstützt Glutamin auch die Synthese anderer Aminosäuren.

Interessant ist, dass Glutamin in Tumorzellen auch dazu verwendet wird, durch die eben geschilderte Auffüllung des Citratzyklus, die OXPHOS zu steigern (DeBerardinis et al., 2007; Rossignol et al., 2004). Zwar weisen nicht alle Tumorzellen Glutaminolyse auf

(Wise et al., 2008), es ist aber von einem Zusammenhang zwischen dem myc-Onkogen und einer gesteigerten Glutaminolyse in Tumorzellen berichtet worden (Gao et al., 2009; Wise et al., 2008). Es wurde gezeigt, dass man bei Zellen mit vermehrter myc-Expression durch Glutaminentzug Apoptose induzieren kann (Yuneva et al., 2007). Da bei Neuroblastomzellen das myc-Onkogen eine wichtige Rolle spielt, könnte man also vermuten, dass der Glutaminmetabolismus den Zellstoffwechsel bei Neuroblastomzellen beeinflusst.

Es wurden sowohl bei Kelly- als auch bei SK-N-SH-Zellen höhere Respirationsraten bei Zellen in RPMI 1640* (c(Glukose) = 11,1 mmol/l) festgestellt als bei Zellen in PBS⁺⁺ mit 10 mmol Glukose/l. Allerdings waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant ($p = 0,0736$ (Kelly), $p = 0,0772$ (SK-N-SH)). Die Tendenz bei beiden Zelllinien lässt jedoch vermuten, dass im RPMI 1640* Zusätze enthalten sind, die zur Erhöhung der Respirationsrate beitragen. Es fällt zudem auf, dass bei SK-N-SH-Zellen der Unterschied zwischen den Respirationsraten in RPMI 1640* und PBS⁺⁺ mit 10 mmol Glukose/l nicht so stark ausgeprägt ist wie bei Kelly-Zellen (siehe Abb. 20 und 21). Es war bereits in den vorangegangenen Versuchen festgestellt worden, dass SK-N-SH-Zellen bei Veränderung des Substratangebots eine weniger stark ausgeprägte Änderung der Respirationsrate aufweisen als Kelly-Zellen. Man kann vermuten, dass die hier beobachteten höheren Respirationsraten von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640* darauf zurück zu führen sind, dass beide Zelllinien Glutamin zusätzlich zu Glukose als Substrat verwenden und dessen Metabolite zumindest teilweise in den Prozess der OXPHOS mit einfließen und somit den Sauerstoffverbrauch erhöhen.

4.4. Einfluss der Gegenwart von 2-deoxy-D-Glukose auf die Respirationsrate von Neuroblastomzellen

Auf Grund der hohen Glykolyserate vieler Tumorzellen gilt die Inhibition der Glykolyse als ein möglicher therapeutischer Ansatz in der Krebstherapie (Pelicano et al., 2006; Scatena et al., 2008). Von allen erprobten Glykolyseinhibitoren ist 2-deoxy-D-Glukose (2DG) am besten untersucht und seine Effekte auf Tumorzellen charakterisiert worden (Zhang et al., 2006).

2DG ist ein strukturelles Analog der Glukose und unterscheidet sich durch die Substitution einer Hydroxyl-Gruppe durch eine Hydrogen-Gruppe am 2. C-Atom. 2DG wird in die Zellen durch Glukosetransporter aufgenommen und durch Hexokinase zu phosphoryliertem 2DG (2DG-P) umgewandelt. 2DG-P kann weder in der Glykolyse abgebaut noch zur Glykogensynthese verwendet werden (Aft et al., 2002). Da die zelluläre Konzentration der entsprechenden Phosphatase außer in Leberzellen niedrig ist, kann 2DG-P nicht mehr dephosphoryliert und damit wieder aus der Zelle hinaus transportiert werden (Aft et al., 2002). Da in vielen Tumorzellen eine erhöhte Glukoseaufnahme (Czernin und Phelps, 2002; Gambhir, 2002) sowie erhöhte Hexokinaseaktivität (Bos et al, 2002, Mathupala et al., 1997) aufweisen, reichert sich 2DG besonders in Tumorzellen an und verursacht eine allosterische und kompetitive Inhibition der Hexokinase (Aft et al., 2002). In mehreren Zelllinien konnte durch eine 2DG-Inkubation die Zellproliferation inhibiert und teilweise Apoptose ausgelöst werden (Zhang et al., 2006). Aufgrund seines Wirkmechanismus imitiert 2DG einen Zustand der Glukosedepriavation in Tumorzellen (Aft et al., 2002). Glukosedepriavation wiederum löst bei vielen Tumorzelllinien Apoptose aus (Shim et al., 1998), auch bei Neuroblastomzellen (Kögel et al., 2006). Die alleinige Antitumor Aktivität von 2DG in vivo benötigt allerdings eine Dosis, die um ein vielfaches höher liegt als der menschliche Organismus tolerieren kann (Singh et al., 2005). Die Kombination von subletalen Dosen von 2DG mit Chemotherapie oder Radiotherapie scheint allerdings erfolgversprechend zu sein (Hernlund et al., 2008; Sinthupibulyakit C, 2009; Zhong et al., 2009).

Vor diesem Hintergrund wurde der in vitro Effekt von 2DG auf Kelly- und SK-N-SH-Zellen näher untersucht, da diese beiden Zelllinien in den vorhergegangenen Versuchen eine Präferenz für die aerobe Glykolyse gezeigt hatten. Hierzu wurde die Respirationsrate von jeweils 2×10^6 Kelly-Zellen und 2×10^6 SK-N-SH-Zellen nach Inkubation mit $1 \mu\text{mol}$ 2DG/ml RPMI 1640* Medium ($11,1 \mu\text{mol}$ Glukose/ml) im Vergleich zu den Respirationsraten der jeweiligen Zellen in RPMI 1640* ohne 2DG-Zusatz erhoben.

Bei Kelly-Zellen zeigte sich eine etwas höhere Respirationsrate der mit 2DG inkubierten Zellen ($2,51 \text{ nmol O}_2/\text{min}$) im Vergleich zur Kontrolle ($2,28 \text{ nmol O}_2/\text{min}$)

(Tab. 31). Bei SK-N-SH-Zellen war jedoch die Respirationsrate bei 2DG inkubierten Zellen etwas niedriger (0,698 nmol O₂/min) im Vergleich zur Kontrolle (1,11 nmol O₂/min) (Tab. 32). Aufgrund des Wirkmechanismus von 2DG wäre eigentlich anzunehmen, dass bei Kelly-Zellen für den Glukosemetabolismus nicht mehr genügend Substrat zur Verfügung steht. Der Vorteil von Normalzellen gegenüber Tumorzellen besteht in diesem Fall darin, dass sie durch ihren niedrigeren Glukoseumsatz nicht in dem Maße 2DG aufnehmen wie Tumorzellen und daher 2DG auf ihren Glukosemetabolismus keinen so starken Einfluss haben sollte. Man kann darüber spekulieren, dass Kelly-Zellen als Reaktion auf den durch 2DG induzierten Stress und die verminderte Glykolyse Substrate für die OXPHOS aus der Glutaminolyse beziehen und damit den Sauerstoffverbrauch steigern können. Dies kann durch die weiter oben beschriebenen Beobachtungen gestützt werden, dass Kelly-Zellen in Anwesenheit von Glutamin eine tendenziell höhere Respirationsrate aufweisen, als wenn kein Glutamin vorhanden ist.

Die Veränderung der Respirationsrate bei Kelly-Zellen war nicht sehr ausgeprägt. Dies könnte u.a. daran liegen, dass hier eine geringe 2DG Konzentration (1 mmol/l) ausgewählt wurde. In anderen in vitro Studien zum Einfluss von 2DG auf Tumorzellen wurden höhere 2DG-Konzentrationen von 4 -12 mmol/l eingesetzt (Aft et al., 2002; Zhang et al., 2006). Außerdem können hohe Glukosekonzentrationen Zellen vor den Effekten von 2DG schützen (Kaplan et al., 1990). Das in diesem Versuchsblock verwendete Zellmedium RPMI 1650* weist eine Glukosekonzentration von 11,1 mmol/l auf. Kaplan et al., 1990 zeigten bei Brustkrebszellen der WT-Zelllinie, dass in Gegenwart von 11 mmol Glukose/l und 1 mmol 2DG/l nach 4 Tagen eine Wachstumsreduktion von nur 17 % vorlag. Wurde die 2DG Konzentration auf 4 mmol/l erhöht, lag die Wachstumsreduktion bei 39 %. In welchem Ausmaß eine hohe Glukosekonzentration Zellen vor 2DG schützt, ist allerdings von der Zelllinie abhängig (Kaplan et al., 1996). Es ist also zu vermuten, dass die hier verwendete 2DG Konzentration von 1 mmol/l nicht ausreichend war, um einen eindeutigeren Effekt bei Kelly-Zellen zu erzielen.

4.5. Einfluss von Dichloracetat auf Neuroblastomzellen

Es ist überlegt worden, den von vielen Tumorzellen bevorzugten Glukosestoffwechsel über die Glykolyse zu Laktat in Richtung der OXPHOS zu verschieben, um ein Abtöten der Tumorzellen zu erreichen. Passend hierzu haben Bonnet et al., 2007 festgestellt, dass die Zunahme der mitochondrialen OXPHOS zur Apoptose von Tumorzellen führen kann (Bonnet et al., 2007). Ein Grund hierfür könnte das vermehrte Anfallen von ROS als Nebenprodukt der OXPHOS sein (Bonnet et al., 2007; Droge, 2002), das vor allem im Rahmen der Reoxgenierung nach Hypoxie (Li et al., 2002) am Komplex I und III der Atmungskette stattfindet (Ježek und Hlavatá, 2005). Hohe ROS Level wirken durch Schädigung von zellulären Makromoleküle toxisch auf Zellen (Collins et al., 2005). Eine Hemmung der OXPHOS führt zu einer verminderten ROS Produktion, die wiederum mit einem erhöhtem Zellüberleben in vitro korreliert worden ist (Fukuda et al., 2007; Kim et al., 2006; Zhang et al., 2007).

Im Zusammenhang mit verminderter mitochondrialer Funktion scheint HIF 1 α (Hypoxia-inducible-factor) eine wichtige Rolle zu spielen. HIF 1 α ist Teil eines Transkriptionsfaktors, der in Zellen im Rahmen der zellulären Antwort auf Hypoxie stabilisiert wird (Löffler und Petrides, 2003). In Krebszellen sind erhöhte HIF 1-Level auch auf Grund von Onkogenaktivierung (Bárdos und Ashcroft, 2005) oder Verlust bzw. Mutation von Tumorsuppressoren festgestellt worden (Bárdos und Ashcroft, 2005; Kaelin, 2002; Selak et al., 2005).

Die Stabilisierung von HIF 1 und des HIF 1 Transkriptionsprogrammes in Tumorzellen hat zwei Haupteffekte: Es erhöht den Glukoseumsatz und die Glykolyse (Cummins und Cormac, 2005; Denko, 2008; Lum et al., 2007) und hemmt die mitochondriale Funktion (Denko, 2008; Papandreou et al., 2006). Im Zusammenhang der Hemmung der mitochondrialen Funktion ist das Gen der Pyruvatdehydrogenase Kinase 1 (PDK1) als direktes Target Gen von HIF 1 identifiziert worden (Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). PDK1 phosphoryliert und inaktiviert den mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDH-Komplex). Der PDH-Komplex katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA und kontrolliert somit den Übergang von Metaboliten von der Glykolyse zum Citratzyklus und letztendlich zur OXPHOS. Die Supremierung des PDH-Komplexes durch PDK1 resultiert in der Inhibierung der

Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA. Pyruvat wird somit in geringerem Ausmaß im Citratzyklus verstoffwechselt. Dies führt zu einer Reduzierung der OXPHOS, des Sauerstoffverbrauches und der ROS Produktion (Bonnet et al., 2007; Papandreou et al., 2006).

Dichloracetat (DCA) ist ein Inhibitor der PDK und damit indirekt ein Aktivator des PDH-Komplexes (Kim et al., 2006). Durch die Inhibition von PDK wird der Pyruvatmetabolismus von der Laktatproduktion zur OXPHOS hin verschoben (Bonnet et al., 2007). Die Fähigkeit von DCA die Laktatproduktion zu senken wird seit langem in der Behandlung der Laktatazidose ausgenutzt (Stacpoole et al., 2006). Es wurde gezeigt, dass Mechanismen, die Tumorzellen zum mitochondrialen OXPHOS zwingen, das Tumorwachstum vermindern (Schulz et al., 2006). So führt z.B. die LDH-Inhibition (Pyruvat → Laktat) zu einer erhöhten mitochondrialen Respiration und in der Folge zu einer verminderten Proliferation von Tumorzellen (Fantin et al., 2006).

DCA verschiebt den Energiemetabolismus in Tumorzellen von der Glykolyse zur OXPHOS, steigert dadurch die ROS Synthese und verursacht schließlich eine Induktion von Mitochondrien-abhängiger Apoptose (Bonnet et al., 2007). In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von DCA die Vitalität (lebende Zellpopulation im Vergleich zur Kontrolle) von Kelly-Zellen einschränkt (siehe Abb. 22). Die Ergebnisse der Glukose- und Laktatbestimmungen sowie der Sauerstoffverbrauchsbestimmungen führten zu der Annahme, dass Kelly-, SK-N-SH- und im geringerem Ausmaß auch LS-Zellen die aerobe Glykolyse präferieren. Aufgrund des vermuteten Wirkmechanismus von DCA bei Tumorzellen, wurde ein Effekt von DCA auf den Sauerstoffverbrauch und die Laktatproduktion, wie er auch schon bei anderen Tumorzelllinien festgestellt wurde (Bonnet et al., 2007; Cairns et al., 2007), vermutet. Zur Versuchsdurchführung wurde eine Inkubation der Zellen mit 1 mmol DCA/l über ca. 70 Stunden durchgeführt. Es wurde für jede Zelllinie die Zellproliferation, die Entwicklung der Laktatproduktion und des Glukoseverbrauchs unter DCA-Einfluss, sowie die Respirationsrate nach der DCA-Inkubation bestimmt. Zu jeder Zelllinie wurde eine Kontrolle mitgeführt. Die Vorversuche zeigten eine Einschränkung der Vitalität von Kelly-Zellen ab einer Inkubation von 500 µmol DCA/l. In anderen Studien konnten Effekte von DCA auf die Tumorproliferation ab in vitro

Konzentrationen von 1 mmol DCA/l nachgewiesen werden (Bonnet et al., 2007; Sun et al., 2009). Sun et al., 2009 hatten festgestellt, dass DCA einen antiproliferativen Effekt bei Brustkrebszellen aufweist, jedoch keine Apoptose induzieren kann. Bonnet et al., 2007 wiesen bei einigen Tumorzelllinien einen antiproliferativen und apoptoseinduzierenden Effekt von DCA nach.

Bei jeder der drei hier untersuchten Zelllinien (Kelly, SK-N-SH, LS) war die Zellzahl in den Zellkulturflaschen mit DCA-Zusatz nach einer Inkubationszeit von ca. 70 Stunden niedriger als bei der jeweiligen Kontrolle (Abb. 23-25) und es läßt sich deshalb vermuten, dass DCA das Zellwachstum von Kelly-, SK-N-SH- und LS-Zellen hemmt. Es bleibt in weiteren Untersuchung festzustellen, in wie weit DCA einen antiproliferativen oder apoptoseinduzierenden Effekt auf Neuroblastomzellen besitzt.

Bei Kelly-Zellen wurde nach DCA Inkubation eine erhöhte Respirationsrate (2,78 nmol O₂/ml/min) und eine verminderte Laktatausbeute (51,2 %) aus der Glykolyse im Vergleich zur Kontrolle (Respirationsrate: 2,05 nmol O₂/ml/min; Laktatausbeute 61,9 %) festgestellt (Tab. 32). Bei SK-N-SH-Zellen zeigte sich bei Zellen nach DCA-Inkubation eine leichte Verminderung der Respirationsrate sowie der Laktatausbeute im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 33). Bei LS-Zellen war keine Veränderung der Respirationsrate im Vergleich der Zellen mit oder ohne DCA-Inkubation ersichtlich (Tab. 34). Die Laktatausbeute aus der Glykolyse war hier aber, wie auch bei Kelly-Zellen, eindeutig niedriger als bei der Kontrolle (Tab. 34).

Insgesamt zeigten die drei Zelllinien bei Vergleich der Respirationsraten eine unterschiedliche Reaktion auf DCA (Tab. 35). Die Erhöhung des Sauerstoffverbrauches bei Kelly-Zellen passt zu den Ergebnissen von Cairns et al., 2007, die bei RKO-Tumorzellen nach einer DCA-Inkubation einen erhöhten Sauerstoffverbrauch festgestellt haben. Die verminderte Respirationsrate von SK-N-SH-Zellen passt jedoch nicht dazu. Der Unterschied der Respirationsraten von DCA-inkubierten SK-N-SH-Zellen und ihrer Kontrolle ist jedoch nur minimal, daher kann man über die Relevanz kaum eine Aussage machen. Es ist festzuhalten, dass eine DCA-Inkubation keinen eindeutigen Einfluss auf die Respirationsrate von SK-N-SH-Zellen zu haben scheint. LS-Zellen zeigten keinen erhöhten Sauerstoffverbrauch nach DCA-Inkubation (Tab. 34 und 35).

Bei allen drei Zelllinien ließ sich ein über den Inkubationszeitraum geringere Abnahme der Glukosekonzentration im Zellkulturmedium bei DCA-inkubierten Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle feststellen (Abb. 26, 28 und 30). Da die Zellzahl in den DCA-inkubierten Flaschen nach der DCA-Inkubation geringer war als bei der Kontrolle, ist die Entwicklung des Glukoseverbrauchs eventuell nicht als direkter Effekt von DCA, sondern durch die verminderte Zellzahl zu erklären.

Gleichzeitig fällt bei allen drei Zelllinien auf, dass die Zunahme der Laktatkonzentration im Zellkulturmedium in Gegenwart von DCA geringer war (Abb. 27, 29 und 30). Auch hier könnte man zunächst vermuten, dass die geringeren Laktatwerte in den DCA-inkubierten Zellkulturflaschen auf die verminderte Zellzahl zurückzuführen sind. Allerdings nahm im Vergleich zum Glukoseverbrauch die Laktatproduktion bei DCA-inkubierten Zellen überproportional ab. Man kann demnach eine verminderte Laktatproduktion als Folge der DCA-Inkubation feststellen. Auch bei anderen Tumorzelllinien ist ein vermindertes extrazelluläres Laktat nach DCA-Inkubation festgestellt worden (Bonnet et al., 2007). Hierzu paßt zudem, dass die prozentuale Laktatausbeute aus der Glykolyse bei allen drei Zelllinien nach DCA-Inkubation unter der der jeweiligen Kontrolle lag (Tab. 32-34), wobei dieser Unterschied bei SK-N-SH-Zellen nur minimal war (Tab. 33).

Insgesamt hemmte DCA also bei allen drei Zelllinien die Laktatproduktion. Einen Hinweis auf die Steigerung der Respirationsrate durch DCA gab es nur bei Kelly-Zellen. Dies lässt vermuten, dass DCA bei Kelly-Zellen den Zellmetabolismus von der aeroben Glykolyse hin zur OXPHOS verschiebt und in der Folge zur Proliferationshemmung führt. Diese Hypothese muss durch weiterführende Versuche noch bestätigt werden. Bei SK-N-SH-Zellen sollte in weiterführenden Untersuchungen festgestellt werden, ob höhere DCA-Inkubationen oder eine längere Inkubationszeit eventuell zu einer eindeutigen Veränderung der Respirationsrate und Laktatproduktion führen, da die vorangegangenen Versuche Hinweise auf eine ausgeprägte aerobe Glykolyse bei SK-N-SH-Zellen gezeigt haben. Obwohl bei LS-Zellen kein vermehrter Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von DCA nachgewiesen wurde, beeinflusst DCA anscheinend die Wachstumsrate und vermindert die Laktatproduktion. Man könnte vermuten, dass LS-Zellen evtl. neben einer hohen OXPHOS wichtige Substrate zur Zellproliferation über die aerobe Glykolyse gewinnen und daher eine Inhibierung der

Glykolyse das Zellwachstum beeinflusst. Vander Heiden et al., 2009 vermuteten, dass Tumorzellen über die aerobe Glykolyse vermehrt C-Atom-Äquivalente und NADPH zur Zellproliferation bereitstellen.

4.6. Sauerstoffverbrauch von Neuroblastommitochondrien

Wie bereits oben erwähnt, wird u.a. eine verminderte mitochondriale Funktion mit dem Warburg Effekt assoziiert (Denko, 2008). Wie und in welchem Ausmaß eine verminderte mitochondriale Funktion mit der Tumorentstehung in Verbindung steht, muss allerdings noch eingehender untersucht werden (Perry et al., 2004). Warburg selbst vermutete in einer durch Hypoxie ausgelösten irreversiblen Schädigung von Mitochondrien die Ursache der aeroben Glykolyse (Warburg, 1956b). Inzwischen ist jedoch klar, dass eine irreversible mitochondriale Schädigung in Tumorzellen im Zusammenhang mit dem Warburg Effekt nicht zwingend notwendig ist. So konnten Fantin et al., 2006 die vermehrte Laktatproduktion bei glykolytischen Tumorzellen als Folge einer vermehrten LDH Expression bei intakter mitochondrialer Funktion erklären. Es gibt jedoch auch Belege für eine eingeschränkte OXPHOS Kapazität von Tumorzell-Mitochondrien (Cuezva et al, 2002; Fantin et al., 2006; Lopez-Ríos et al., 2007; Wu et al., 2007).

In den bisher dargestellten Versuchen war die gesamte Zellatmung von Neuroblastomzellen betrachtet worden, nicht die mitochondriale Respiration im speziellen. Die mitochondriale Respiration nimmt ca. 80-90 % des zellulären Sauerstoffverbrauches ein (Kraus-Berthier et al., 2000; Wu et al, 2007); der Rest wird zur Substratoxidation benötigt (Kraus-Berthier et al., 2000). In den Zellversuchen zur Ermittlung der Atmungsraten von Neuroblastomzellen haben die Ergebnisse einen Unterschied der drei untersuchten Zelllinien Kelly, SK-N-SH und LS gezeigt. Hier sollten der Sauerstoffverbrauch an ihren isolierten Mitochondrien gemessen werden. Hierzu wurde nach einem modifizierten Protokoll (Kleber et al., 1997) die mitochondriale Respiration der Neuroblastommitochondrien untersucht. Bei der Sauerstoffverbrauchsmessung von Mitochondrien können die Substratveratmung sowie die Kopplung des Sauerstoffverbrauchs an die Phosphorylierung von ADP bestimmt

werden. Es ist bekannt, dass mitochondriale Respiration gekoppelte und ungekoppelte Respiration zusammenfasst. Gekoppelte Respiration ist der Sauerstoffverbrauch, der zur ATP-Synthese verwendet wird. Ungekoppelte Respiration ist die mitochondriale Respiration, die durch einen Protonenrückstrom (proton leak) über die innere mitochondriale Membran entsteht, die nicht zur ATP-Synthese beiträgt. 20 % der basalen Respirationsrate von Mitochondrien in vitro ist auf passiven Protonenrückstrom zurück zu führen, 80 % sind an die ATP-Synthese gekoppelt (Brand, 2005). Die angenommene physiologische Funktion der ungekoppelten Respiration beinhaltet Wärmeproduktion und Schutz vor oxidativen Stress durch ROS (Brand, 2005; Brand und Hermfisse, 1997). Mit Hilfe von Substrat- und Sauerstoffangebot können verschiedene Stadien der mitochondrialen Atmung in vitro induziert werden. Die Kopplung von Substratoxidation und ATP-Bildung wird als Atmungskontrolle bezeichnet (Löffler und Petrides, 2003). Mitochondrien in vitro, die ein Substrat der OXPHOS sowie einen Überschuss von ADP + Phosphat und Sauerstoff zur Verfügung haben, befinden sich Stadium 3, in welchem die maximale mitochondriale Respiration beobachtet wird (Scheffler, 2008). In der Gegenwart des Substrates, aber ohne ADP-Zusatz, sind Mitochondrien im Stadium 4, in diesem Stadium wird die mitochondriale Respiration nur durch den Protonenrückstrom (proton leak) ausgelöst (siehe auch Methoden, Tab. 18).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Mitochondrien von Kelly-, SK-N-SH- und LS-Zellen isoliert und ihre Respirationsraten ohne Substrat- oder ADP-Zugabe bestimmt (basale Respirationsrate). Anschließend erfolgte eine Zugabe von Succinat und die Bestimmung der Substratabhängigen Respiration. Zur Induktion des Stadium 3 wurde ADP hinzugegeben, Phosphat war im Messpuffer enthalten. Die Respirationsrate nach Zugabe von Succinat nahm zu (siehe Tab. 36). Im Gegensatz dazu wurde nach Zugabe von ADP keine Steigerung des Sauerstoffverbrauches beobachtet, sie hätte jedoch zu einer Vervielfachung der Respirationsrate führen müssen (Löffler und Petrides, 2003). Eine mögliche Erklärung ist, dass die dargestellten Ergebnisse die entkoppelte Respirationsrate der Neuroblastommitochondrien zeigen und somit ein passiver Rückstrom der Protonen über die innere mitochondriale Membran stattfand, die das elektrochemische Potential aufhob. In diesem Fall hat ADP keinen Einfluss mehr auf den Sauerstoffverbrauch. Somit ist anzunehmen, dass hier keine ATP-Synthese und

somit keine respiratorische Kontrolle mehr stattfand. Die Entkopplung könnte eine Schädigung der mitochondrialen Membran in der Folge der Mitochondrienisolation sein. Retrospektiv hat sich kein Fehler im Protokoll der Mitochondrienisolation finden lassen. Auch die Versuchsdurchführungen, die an verschiedenen Versuchstagen stattfanden, waren nicht offensichtlich fehlerhaft. Man kann also vermuten, dass der hier verwendete Vorgang der Mitochondrienisolierung die Mitochondrien einem zu starken Stress ausgesetzt hat. Das Qproteome Isolation Kit ist bereits bei verschiedenen Zelllinien erfolgreich verwendet worden (Qproteome Isolation Handbook, 2006). Erfahrungen mit Neuroblastomzellen lagen in unserem Labor jedoch noch nicht vor. Für weitere Untersuchungen der mitochondrialen Respiration bei Neuroblastomzellen könnte in späteren Versuchen der Anteil der mitochondrialen Respiration an der gesamten Zellrespiration mittels Rotenon-Inkubation (Inhibition des Komplex I der Atmungskette) von Neuroblastomzellen bestimmt werden. Die Rotenon-sensitive Sauerstoffverbrauchsrate entspricht der mitochondrialen Respiration, wohingegen die Rotenon-resistente Respirationsrate der nicht-mitochondrialen Respirationsrate entspricht (Samper et al, 2009; Wu et al., 2007). Ein weiterer interessanter Ansatz wäre, den Anteil des proton leaks an der mitochondrialen Respirationsrate zu bestimmen. Andere Arbeiten haben dies über den Einsatz einer Oligomycin-Inkubation von Zellen erreicht (Fantin et al., 2006; López-Ríos et al., 2007). Mit Oligomycin inkubierte Zellen besitzen nur noch die über proton leak bestehende Respirationsrate (Fantin et al., 2006). Ein vermehrter proton leak (> 20%) würde eine Verminderung der ROS Akkumulation zur Folge haben und könnte somit einen Apoptoseschutz bieten. Es gibt Hinweise, dass mitochondriales Entkoppeln in Leukämiezellen den Warburg Effekt unterstützt und zur Chemotherapeutikaresistenz beiträgt (Samudio et al., 2009). Daher wäre die Untersuchung des Anteiles des proton leaks an der mitochondrialen Respiration bei Neuroblastomzellen ein interessanter Ansatzpunkt.

4.7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrienisolationen

Mitochondrien zeigen abhängig vom Gewebe eine sehr unterschiedliche Ultrastruktur (Munn, 1974; Scheffler, 2008). Eine veränderte mitochondriale Morphologie bei Tumorzellen ist als Reaktion auf Substratveränderung (Rossignol et al., 2004) oder Chemotherapeutika (Yeo et al., 2007) beobachtet worden. In beiden Fällen wurde vermutet, dass die Änderung der Morphologie Ausdruck einer veränderten OXPHOS ist (Rossignol et al., 2004; Guillery et al., 2008). Zur morphologischen Beschreibung von Mitochondrien werden in der Literatur die Begriffe *orthodox* und *condensed* verwendet (Hackenbrock, 1966). Als *orthodox* wird eine aufgelockerte Matrix mit einem kondensierten Cristaeraum beschrieben. Mitochondrien im *condensed* Stadium weisen eine kondensierte Matrix und einem aufgelockertem Cristaeraum auf. Der Übergang der Stadien ineinander kommt durch Fission und Fusion der inneren Membran zustande (Mannella et al., 2001). Bereits Hackenbrock stellte einen Zusammenhang zwischen den morphologischen und respiratorischen Stadien fest (Hackenbrock et al., 1966): Isolierte Rattenlebermitochondrien zeigten morphologisch bei Induktion des aktiven Respirationsstadium (Stadium III, ADP im Überschuss) einen Übergang vom *orthodoxen* ins *condensed* Stadium.

Zudem wird der Konfiguration der Cristae eine funktionelle Bedeutung zugesprochen. Es wird angenommen, dass durch die Cristaebildung die Membranoberfläche der inneren Membran erhöht wird. Eine vermehrte Cristaebildung soll so die respiratorische Aktivität der Zelle anzeigen, da die Proteine der OXPHOS in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind (Voet et al., 2008; Zick et al., 2009). Hierzu passt, dass stark gefaltete Cristae mit großer Oberfläche in Muskelzellen und Neuronen gefunden werden, die eine hohe respiratorische Rate aufweisen (Scheffler, 2008). Es ist diskutiert worden, dass die Form von Cristae (*tubulovesikulär* oder *lamellär*) bei Nierentumoren eine prognostische Aussage erlaubt und Rückschlüsse auf eine eventuell fehlerhafte Mitochondriogenese zulässt (Tickoo et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit ist festgestellt worden, dass Kelly-, SK-N-SH- und LS-Zellen unterschiedliche zelluläre Respirationsraten aufweisen. Mit hier durchgeführten Elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Mitochondrienisolaten von

Neuroblastomzellen sollte näher untersucht werden, ob Unterschiede in der mitochondrialen Morphologie vorliegen. Die elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der SK-N-SH-Zelle (Abb. 35) zeigt einige langgezogene Mitochondrien mit lamellären Cristae, sowie runde, kleinere Mitochondrien, die ebenfalls lamelläre Cristae aufweisen. Die verschiedenen Formen der Mitochondrien könnten zum einen in verschiedenen Schnittebenen begründet liegen. Zudem ist bekannt, dass Mitochondrien verschiedene Formen annehmen und teilweise in ihrer Länge sehr variieren (Scheffler, 2008). Im Vergleich mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Zellen des renalen Onkozytoms (siehe Abbildungen in Tickoo et al., 2000) fällt bei SK-N-SH-Zellen die geringe Anzahl von Mitochondrien in dem dargestellten Bildabschnitt auf. Da SK-N-SH-Zellen eine Präferenz für die aerobe Glykolyse aufweisen, ist es möglich, dass sich dies u.a. in einer verminderten Mitochondrienanzahl ausdrückt. Auch in HeLa Tumorzellen ist eine verminderte Mitochondrienzahl gefunden worden (Cuezva et al., 2002).

Mitochondrienisolate der SK-N-SH-Zellen zeigen Mitochondrien mit einem dichten Matrixraum und aufgelockerten Cristae (Abb. 36a/b). Diese Konfiguration ist ebenfalls in den Bildern der Mitochondrienisolate von Kelly-Zellen zu sehen (Abb. 37a/b). Die Mitochondrien beider Zelllinien weisen in diesen Aufnahmen das condensed Stadium auf, wie es von Hackenbrock et al., 1966 beschrieben wurde. Da dieses morphologische Stadium mit dem aktiven Respiationsstadium korreliert ist (Hackenbrock et al., 1966), befanden sich die Mitochondrien zum Zeitpunkt der Isolierung wahrscheinlich in einem aktiven Respiationsstadium. Morphologisch gibt es demnach bei beiden Zelllinien keinen Hinweis auf eine verminderte mitochondriale Funktion. Beide Isolate weisen keine hohe Mitochondriendichte auf, wobei im SK-N-SH-Isolat mehr Mitochondrien vorhanden sind, als im Kelly-Isolat. Hierzu passt, dass im SK-N-SH-Mitochondrienisolat eine höhere Proteinkonzentration im Vergleich zum Kelly-Mitochondrienisolat gemessen wurde (Tab. 37). Die Proteinkonzentration der Mitochondrienisolate wird oft als Bezugssystem für die Laktat, Glukose sowie Sauerstoffverbrauchsbestimmung der Mitochondrien verwendet (Loesberg et al., 1990; López-Ríos, 2007). Wie die Abbildungen der Mitochondrienisolate (Abb. 36-38) zeigen, liegt eine Verunreinigung der Isolate mit anderen Zellbestandteilen vor. Dies kann die Proteinkonzentration der Isolate beeinflussen, so dass diese nur eingeschränkt

zu beurteilen ist. Besser wäre es also, in Zukunft andere Bezugssysteme zu verwenden, wie mitochondriale Enzyme, z.B. die Glutamat-Dehydrogenase.

Die meisten in Abb. 38a/b gezeigten LS-Mitochondrien weisen im Vergleich zu SK-N-SH-Mitochondrien und Kelly-Mitochondrien einen dichteren Cristaeraum und eine weniger dichte Matrix auf. Eine typisch orthodoxe Konfiguration weisen sie jedoch nicht auf, einige der angeschnittenen Mitochondrien zeigen eher eine condensed Konfiguration mit auseinander gezogenen Cristaeräumen und dichtem Matrixraum. Insgesamt sind die LS-Mitochondrien kleiner als die Mitochondrien der SK-N-SH- und Kelly-Zellen. Somit ist festzuhalten, dass die Morphologie von LS-Mitochondrien sich von der Morphologie der Kelly- und SK-N-SH-Mitochondrien unterscheidet. Dies ist interessant, da LS-Zellen eine andere Präferenz für die aerobe Glykolyse aufweisen als Kelly- und SK-N-SH-Zellen.

Auffallend ist eine höhere Mitochondriendichte im LS-Isolat im Vergleich zu den Isolaten von Kelly oder SK-N-SH. Diese Beobachtung kann allerdings nicht für eine Aussage verwendet werden, da verschiedene Zellmengen zur Mitochondrienisolierung eingesetzt wurden. Zudem muss durch den mehrstufigen Isolierungsvorgang von einem Zellverlust ausgegangen werden. So lässt die ursprünglich eingesetzte Zellmenge keine Aussage über die Mitochondriendichte im Isolat zu.

5. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen des Sauerstoffverbrauches bei den humanen Neuroblastom Zelllinien Kelly, SK-N-SH und LS sowie ihrer isolierten Mitochondrien.

Bei allen Zelllinien besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und zellulärer Respirationsrate. Bei Kelly- und SK-N-SH-Zellen wurde die zelluläre Respirationsrate in Gegenwart von Glukose gehemmt (Crabtree Effekt), wobei dieser Effekt bei Kelly-Zellen ausgeprägter war als bei SK-N-SH-Zellen. Exemplarisch konnte bei beiden Zelllinien parallel zu der verminderten zellulären Respiration bei Zunahme des Glukoseangebotes eine gesteigerte Glykolyse nachgewiesen werden. Die erhobenen Daten zeigen, dass Kelly- und SK-N-SH-Zellen eine ausgeprägte aerobe Glykolyse

aufweisen.

Es wurde festgestellt, dass Kelly- und SK-N-SH-Zellen in glukosefreiem Zellmedium einen höheren zellulären Sauerstoffverbrauch aufweisen als in glukosehaltigen Zellmedium. Vermutlich wird hierbei von den Zellen der endogene Glykogenabbau zur Substratbereitstellung für die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) genutzt. LS-Zellen steigern, anders als Kelly- und SK-N-SH-Zellen, in Gegenwart von Glukose ihren Sauerstoffverbrauch und ihre Laktatproduktion. Dies lässt vermuten, dass LS-Zellen nicht unbedingt die aerobe Glykolyse bevorzugen, aber neben der OXPHOS ebenfalls nutzen. Möglicherweise dient hier die aerobe Glykolyse vor allem der Bereitstellung von Acetyl-CoA und NADPH, die besonders in Rahmen einer gesteigerten Zellproliferation benötigt werden. Eine Hochregulierung der OXPHOS und der Glykolyse ist ebenfalls in anderen Tumorzellen beobachtet worden (Samper et al., 2009). Da LS-Zellen eine hohe Proliferationsrate aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass eine gleichzeitige Hochregulierung sowohl der OXPHOS als auch der aeroben Glykolyse dafür nötig ist. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Zellen mit bekannter N-myc-Amplifikation (Kelly, LS) als auch Zellen ohne bekannte N-myc-Amplifikation (SK-N-SH) die aerobe Glykolyse nutzen. Kelly- und SK-N-SH-Zellen zeigen eine tendenziell höhere zelluläre Respirationsrate in Gegenwart von Glutamin. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Arbeiten lässt dies den Schluss zu, dass Kelly- und SK-N-SH-Zellen Glutamin zusätzlich zu Glukose als Substrat verwenden und Glutamin durch anapleurotische Reaktionen den Citratzyklus auffüllt.

In den exemplarischen Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte kein eindeutiger Effekt von 2-deoxy-D-Glukose (1 mmol/l f.c.) auf die Respirationsrate von Kelly-Zellen nachgewiesen werden. Auch bei SK-N-SH-Zellen war der Effekt von 2-deoxy-D-Glukose auf den zellulären Sauerstoffverbrauch nicht sehr ausgeprägt.

Eine Dichloracetat-Inkubation konnte bei Kelly-, SK-N-SH- und LS-Zellen eine Wachstumshemmung auslösen und verminderte die Laktatproduktion aller drei Zelllinien. Außer bei Kelly-Zellen ließ sich jedoch keine Steigerung der zellulären Respirationsrate beobachten. Insgesamt lässt dies einen weiter zu untersuchenden Effekt von Dichloracetat auf Neuroblastomzellen vermuten. Somit scheint die Umlenkung des Glukosemetabolismus hin zur OXPHOS durch Dichloracetat möglicherweise einen

besseren Ansatz zur Wachstumshemmung bei Neuroblastomzellen zu bieten als die Glykolyseinhibition durch 2DG.

In Elektronenmikroskopischen Bildern ließ sich ein morphologischer Unterschied von SK-N-SH- und Kelly-Mitochondrien im Vergleich zu LS-Mitochondrien zeigen. Sauerstoffverbrauchsmessungen an den isolierten Mitochondrien zeigten, dass durch Zugabe von Succinat die basale Atmungsrate gesteigert werden konnte, nicht jedoch durch Zugabe von ADP. Möglicherweise kam es zu einer Membranschädigung während der Mitochondrienisolation. Zur Charakterisierung der Atmungsrate der Mitochondrien der drei Zelllinien wurde der Proteingehalt herangezogen. Dieses Bezugssystem ist allerdings nicht sehr gut geeignet, um Vergleiche an zu stellen, da die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass neben den isolierten Mitochondrien viele andere Zellfragmente im Isolat vorhanden sind. Mitochondriale Enzyme wie die Glutamat Dehydrogenase wären daher für zukünftige Arbeiten das bessere Bezugssystem.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Kelly-, SK-N-SH- und LS-Zellen die aerobe Glykolyse nutzen. Bei Kelly- und SK-N-SH-Zellen konnte zusätzlich eine Inhibierung der zellulären Atmungsrate in Gegenwart von Glukose festgestellt werden, die LS-Zellen jedoch nicht aufwiesen. Zudem kann aufgrund der Ergebnisse eine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs bei Kelly- und SK-N-SH-Zellen durch Glutaminolyse vermutet werden. In Hinsicht auf die therapeutische Nutzung des Warburg Effektes scheint die durch Dichloracetat ausgelöste Verschiebung des Glukosemetabolismus bei Neuroblastomzellen ein möglicher Ansatz zu sein, allerdings waren die erzielten Effekte nicht so ausgeprägt wie aus Literaturdaten zu vermuten war.

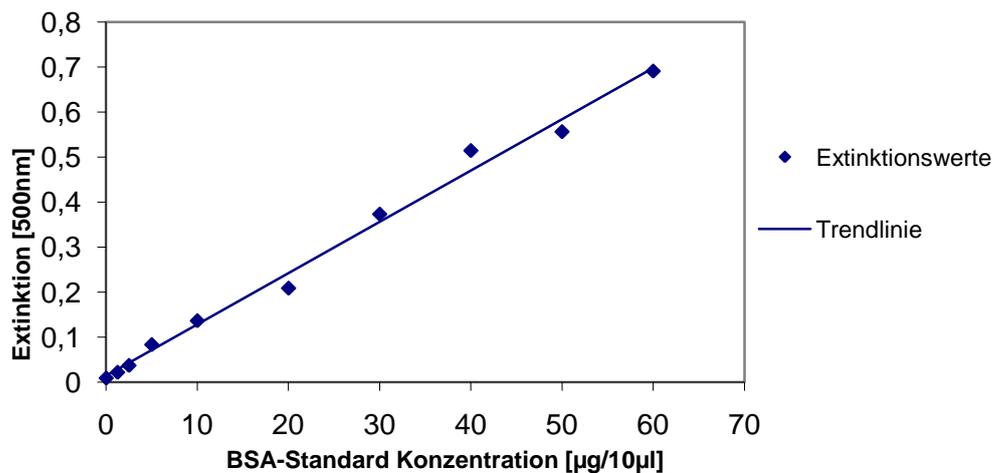
6. Anhang

Anhang zu 2.2.7.4.

Wertetabelle zu Eichkurve 1: BSA Standard Eichkurve mit destilliertem H₂O als Lösungsmittel für Proteinbestimmung nach Lowry

Extinktion (500nm)	BSA-Standard Konzentration [$\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$]
0,0093	0
0,022	1,25
0,0373	2,5
0,0836	5
0,1367	10
0,209	20
0,3735	30
0,5147	40
0,5566	50
0,6912	60

Eichkurve 1 : BSA gelöst in destilliertem H₂O



Anhang zu 3.2., 3.3., 3.4., 3.5.: Produktinformation zu PBS⁺⁺ von Invitrogen vom 15.08.2009
http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.144.html (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) (1X) liquid)

Dulbeccos Phosphat gepufferter Kochsalzlösung			
Bestandteile	Molekulares Gewicht	Konzentration	mM
Calciumchlorid (CaCl ₂)	111	100	0,801
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ -6H ₂ O)	203	100	0,493
Kaliumchlorid	75	200	2,67
Kaliumphosphat (KH ₂ PO ₄)	136	200	1,47
Natriumchlorid (NaCl)	58	8000	137,93
Dibasisches Natriumphosphat	268	2160	8,06

Anhang zu 3.2., 3.3., 3.4., 3.5.: RPMI 1640 Produktinformation der Biochrom AG vom 10.5.2009 www.biochrom.com

<u>Komponente</u>	<u>Menge in mg/l</u>
NaCl	6000
NaHCO ₃	2000
KCl	400
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	1512
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100
D-Glucose	2000
Phenolrot*	5
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	15
L-Prolin	20
L-Serin	30
L-Threonin	20
L-Tryptophan	5
L-Tyrosin	20
L-Valin	20
L-Arginin	200
L-Asparagin	50
L-Asparaginsäure	20
L-Cystin	50
L-Glutamin	300
L-Glutaminsäure	20
Glycin	10
L-Histidin	15
L-Hydroxyprolin	20
L-Isoleucin	50
L-Leucin	50
L-Lysin·HCl	40
Glutathion	1
Biotin	0,2
Vitamin B12	0,005
D-Ca-Pantothemat	0,25
Cholinchlorid	3
Folsäure	1
Myo-Inositol	35
Nicotinamid	1
p-Aminobenzoesäure	1
Pyridoxin·HCl	1
Riboflavin	0,2
Thiamin·HCl	1

Anhang zu 3.3.1.2.; Photometrische Glukosebestimmung bei Kelly Zellen:
Versuchsergebnisse

:	PBS ⁺⁺		PBS ⁺⁺ mit 1 µmol/ml Glukose				PBS ⁺⁺ mit 5 µmol/ml Glukose			
	Messwert		Messwert		Δ Glukose		Messwert		Δ Glukose	
Zeit [min]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	[µmol/ml]	[nmol/ml] pro	[g/l]	[mmol/l]	ΔGlukose [µmol/l]	ΔGlukose [nmol/l]
0	0	0	0,198	1,1	0	0	0,87	4,83	0	0
30			0,163	0,9	0,2	7	0,846	4,7	0,13	4
60			0,155	0,86	0,24	4	0,85	4,72	0,11	2
120			0,125	0,69	0,41	3	0,79	4,38	0,45	4
240	0	0	0,089	0,49	0,61	3	0,783	4,35	0,48	2
MW ± SD						4,25 ± 1,89				3 ± 1,16

Versuchsdaten in Zusammenarbeit mit Beate Deubzer

Anhang zu 3.3.2.1.: Photometrische Laktatbestimmung bei Kelly Zellen: Versuchsergebnisse

	PBS ⁺⁺		PBS ⁺⁺ mit 1 µmol/ml Glukose				PBS ⁺⁺ mit 5 µmol/ml Glukose			
	Messwert c(Laktat)		Messwert c(Laktat)		ΔLaktat		Messwert c(Laktat)		ΔLaktat	
Zeit [min]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	[µmol/ml]	[nmol/ml] pro min	[g/l]	[mmol/l]	[µmol/l]	[nmol/ml] pro min
0	0,006	0,07	0,011	0,12	0	0	0,016	0,18	0	
30	0,001	0,01	0,025	0,28	0,16	5	0,027	0,3	0,12	4
60	0,002	0,02	0,019	0,21	0,09	2	0,029	0,32	0,14	2
120	0,001	0,01	0,05	0,56	0,44	4	0,061	0,68	0,5	4
240	0,01	0,11	0,0378	0,42	0,3	1	0,089	0,99	0,81	3
MW ± SD						3,25 ± 2				3,25 ± 0,96

Eigentlich negative Werte als „0“ bezeichnet, Werte in Zusammenarbeit mit Beate Deubzer.

Anhang zu 3.3.2.2.: Photometrische Glukosebestimmung bei SK-N-SH-Zellen

Zell	PBS ⁺⁺		PBS ⁺⁺ mit 1 µmol/ml Glukose				PBS ⁺⁺ mit 5 µmol/ml Glukose			
	Messwert		Messwert		Δ Glukose		Messwert		Δ Glukose	
Zeit [min]	[g/l]	[mmol/l]	g/l	mmol/l	ΔGlukose [µmol/ml]	ΔGlukose [nmol/ml]	g/l	mmol/l	ΔGlukose [µmol/ml]	ΔGlukose [nmol/ml]
0	0,003	0,02	0,174	0,97	0	0	0,916	5,08	0	0
30	0	0	0,15	0,83	0,14	5	0,918	5,09	0	0
60	0	0	0,147	0,82	0,15	3	0,89	4,94	0,14	2
120	0	0	0,122	0,68	0,29	3	0,81	4,5	0,58	5
240	0	0	0,098	0,54	0,43	2	0,8	4,44	0,64	3
MW ± SD										2 ± 2,1

Eigentlich negative Werte mit „0“ bezeichnet. Versuchswerte in Zusammenarbeit mit Beate Deubzer.

Anhang zu 3.3.2.2.: Photometrische Laktatbestimmung bei SK-N-SH Zellen

Zell	PBS ⁺⁺		PBS ⁺⁺ mit 1 µmol/ml Glukose				PBS ⁺⁺ mit 5 µmol/ml Glukose			
	Messwert		Messwert		Δ Laktat		Messwert		Δ Laktat	
	c(Laktat)		c(Laktat)				c(Laktat)			
Zeit [min]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	[µmol/ml]	[nmol/ml] pro min	g/l	mmol/l	[µmol/ml]	[nmol/ml] pro min
0	0,007	0,08	0,005	0,06	0	0	0,008	0,09	0	0
30	0,007	0,08	0,009	0,1	0,04	1	0,01	0,11	0,02	1
60	0,006	0,07	0,01	0,11	0,05	1	0,024	0,27	0,18	3
120	0,009	0,1	0,035	0,39	0,33	3	0,064	0,71	0,62	5
240	0,01	0,11	0,03	0,33	0,27	1	0,043	0,48	0,39	2
MW ± SD										2,2 ± 1,9

Anhang zu 3.3.3.2.:Photometrische Glukosebestimmung bei LS-Zellen: Versuchsergebnisse

Versuch 1										
	PBS ⁺⁺		PBS ⁺⁺ mit 1 µmol/ml Glukose				PBS ⁺⁺ mit 5 µmol/ml Glukose			
	Messwert c(Glukose)		Messwert c(Glukose)		Δ Glukose		Messwert c(Glukose)		Δ Glukose	
Zeit [min]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	[µmol/ml]	[nmol/ml] pro Minute	[g/l]	[mmol/l]	[µmol/ml]	[nmol/ml] pro Minute
0.	0,001	0,007	0,168	0,93	0	0	0,88	4,9013	0	0
60.	0,000	0,002	0,113	0,62	0,3067	5,1	0,77	4,2965	0,6048	10,08

Versuch 2										
	PBS ⁺⁺		PBS ⁺⁺ mit 1 µmol/ml Glukose				PBS ⁺⁺ mit 5 µmol/ml Glukose			
	Messwert c(Glukose)		Messwert c(Glukose)		Δ Glukose		Messwert c(Glukose)		Δ Glukose	
Zeit [min]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	µmol/ml	[nmol/ml] pro min	[g/l]	[mmol/l]	µmol/ml	[nmol/ml] pro min
0	0	0	0,174	0,968	0	0	0,92	5,103	0	0
60	0,001	0,003	0,097	0,539	0,43	7,16	0,804	4,464	0,639	10,66

Eigentlich negative Werte mit „0“ bezeichnet

Versuch 3										
	PBS ⁺⁺		PBS ⁺⁺ mit 1 µmol/ml Glukose				PBS ⁺⁺ mit 5 µmol/ml Glukose			
	Messwert c(Glukose)		Messwert c(Glukose)		Δ Glukose		Messwert c(Glukose)		Δ Glukose	
Zeit [min]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	µmol/ml	[nmol/ml] pro min	[g/l]	[mmol/l]	µmol/ml	[nmol/ml] pro min
0	0	0	0,189	1,048	0	0	0,916	5,082	0	0
60	0,001	0,003	0,145	0,806	0,242	4,03	0,86	4,71	0,37	6,2

Eigentlich negative Werte mit „0“ bezeichnet

Anhang zu 3.3.3.2.: Photometrische Laktatbestimmung bei LS Zellen: Versuchsergebnisse

Versuch 1										
	PBS ⁺⁺		PBS ⁺⁺ mit 1 µmol/ml Glukose				PBS ⁺⁺ mit 5 µmol/ml Glukose			
	Messwert c(Laktat)		Messwert c(Laktat)		Δ Laktat		Messwert c(Laktat)		Δ Laktat	
Zeit [min]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	µmol/ml	[nmol/ml] pro min	[g/l]	[mmol/l]	µmol/ml	[nmol/ml] pro min
0	0,005	0,054	0,012	0,129	0	0	0,016	0,182	0	0
60	0,007	0,077	0,044	0,49	0,361	6	0,094	1,045	0,863	14,38

Versuch 2										
	PBS ⁺⁺		PBS ⁺⁺ mit 1 µmol/ml Glukose				PBS ⁺⁺ mit 5 µmol/ml Glukose			
	Messwert c(Laktat)		Messwert c(Laktat)		Δ Laktat		Messwert c(Laktat)		Δ Laktat	
Zeit [min]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	[µmol/ml]	[nmol/ml] pro min	[g/l]	[mmol/l]	µmol/ml	[nmol/ml] pro min
0	0,002	0,023	0,008	0,09	0	0	0,006	0,069	0	0
60	0,008	0,088	0,05	0,554	0,464	7,74	0,083	0,925	0,857	14,28

Versuch 3										
	PBS ⁺⁺		PBS ⁺⁺ mit 1 µmol/ml Glukose				PBS ⁺⁺ mit 5 µmol/ml Glukose			
	Messwert c(Laktat)		Messwert c(Laktat)		Δ Laktat		Messwert c(Laktat)		Δ Laktat	
Zeit [min]	[g/l]	[mmol/l]	[g/l]	[mmol/l]	µmol/ml	[nmol/ml] pro min	[g/l]	[mmol/l]	µmol/ml	[nmol/ml] pro min
0	0,007	0,076	0,007	0,081	0	0	0,009	0,094	0	0
60	0,007	0,074	0,029	0,324	0,243	4,04	0,052	0,579	0,485	8,08

Anhang zu 3.6.2.:

Glukose-Verbrauch von Kelly Zellen mit und ohne 1 $\mu\text{mol/ml}$ DCA-Inkubation

Zeit [h]	Δ Glukose Zellen in RPMI 1640* ohne DCA [$\mu\text{mol/ml}$]	Δ Glukose Zellen in RPMI 1640* mit DCA [$\mu\text{mol/ml}$]
0	0	0
6,5	0,63	0,43
21	1,83	1,97
45	4,28	3,82
73	9,08	7,63

Laktat-Produktion von Kelly Zellen mit und ohne 1 $\mu\text{mol/ml}$ DCA Inkubation

Zeit [h]	Δ Laktat Zellen in RPMI 1640* ohne DCA [$\mu\text{mol/ml}$]	Δ Laktat Zellen in RPMI 1640* mit DCA [$\mu\text{mol/ml}$]
0	0	0
6,5	1,13	0,64
21	3,65	2
45	5,6	3,69
73	10,91	7,95

Anhang zu 3.6.3.:

Glukose-Verbrauch von SK-N-SH Zellen mit und ohne 1 $\mu\text{mol/ml}$ DCA-Inkubation

Zeit [h]	Δ Glukose Zellen in RPMI 1640* ohne DCA [$\mu\text{mol/ml}$]	Δ Glukose Zellen in RPMI 1640* mit DCA [$\mu\text{mol/ml}$]
6,5	0	0
15	0*	0,3
39	1,61	0,67
76,5	2,56	2,39

Der Glukoseverbrauch zur 0. Stunde wurde auf Grund einer Fehlmessung nicht mit in die Wertung aufgenommen, die Werte für Δ Glukose berechnen sich bei Δ Glukose bezüglich des Glukosemeßwertes zur 6,5 Stunde. Mit * bezeichnete Werte sind ursprünglich negative Werte, die auf Grund der biologischen Relevanz gleich 0 gesetzt wurden.

Laktat-Produktion mit und ohne DCA Inkubation bei SK-N-SH Zellen

Zeit [h]	Δ Laktat Zellen in RPMI 1640* ohne DCA [$\mu\text{mol/ml}$]	Δ Laktat Zellen in RPMI 1640* mit DCA [$\mu\text{mol/ml}$]
0	0	0
6,5	0,49	0,58
15	1,72	1,54
39	3,14	3,09
76,5	5,95	4,51

Anhang zu 3.6.4.:

Glukose-Verbrauch von LS Zellen mit und ohne DCA Inkubation

Zeit [min]	Δ Glukose Zellen in RPMI 1640* ohne DCA [$\mu\text{mol/ml}$]	Δ Glukose Zellen in RPMI 1640* mit DCA [$\mu\text{mol/ml}$]
0	0	0
14	fehlt	0,89
26,5	3,08	1,84
46,75	6,92	4,83
67,25	10,21	7,7

Der Wert für Δ Glukose Zellmedium A (ohne DCA) bei 14 Stunden wurde auf Grund einer Fehlmessung aus der Wertung genommen.

Laktat-Produktion bei LS Zellen mit und ohne DCA-Inkubation

Zeit [min]	Δ Laktat Zellmedium A (ohne DCA)	Δ Laktat Zellmedium B (mit DCA)
0	0	0
14	1,62	0,31
26,5	3,67	1,48
46,75	6,76	2
67,25	9,94	5,93

Anhang zu 3.6.2.-3.6.4.:

Formeln der Ausgleichsgeraden der Glukose-Verbrauch und Laktat-Produktions-Bestimmungen	
Ausgleichsgerade	Formel
Glukose-Verbrauch Kelly Zellen ohne DCA	$\Delta\text{Glukose } [\mu\text{mol/ml}] = 0,1214 \times \text{Zeit [h]} - 0,3701$
Glukose-Verbrauch Kelly Zellen mit DCA	$\Delta\text{Glukose } [\mu\text{mol/ml}] = 0,1027 \times \text{Zeit [h]} - 0,2182$
Laktat-Produktion Kelly Zellen ohne DCA	$\Delta\text{Laktat } [\mu\text{mol/ml}] = 0,1423 \times \text{Zeit [h]} - 0,1159$
Laktat-Produktion Kelly Zellen mit DCA	$\Delta\text{Laktat } [\mu\text{mol/ml}] = 0,1046 \times \text{Zeit [h]} - 0,1888$
Glukose-Verbrauch SK-N-SH Zellen ohne DCA	$\Delta\text{Glukose } [\mu\text{mol/ml}] = 0,0393 \times \text{Zeit [h]} - 0,0000$
Glukose-Verbrauch SK-N-SH Zellen mit DCA	$\Delta\text{Glukose } [\mu\text{mol/ml}] = 0,0334 \times \text{Zeit [h]} - 0,3029$
Laktat-Produktion SK-N-SH Zellen ohne DCA	$\Delta\text{Laktat } [\mu\text{mol/ml}] = 0,0764 \times \text{Zeit [h]} - 0,1662$
Laktat-Produktion SK-N-SH Zellen mit DCA	$\Delta\text{Laktat } [\mu\text{mol/ml}] = 0,0582 \times \text{Zeit [h]} - 0,3503$
Glukose-Verbrauch LS-Zellen ohne DCA	$\Delta\text{Glukose } [\mu\text{mol/ml}] = 0,1543 \times \text{Zeit [h]} - 0,3664$
Glukose-Verbrauch LS-Zellen mit DCA	$\Delta\text{Glukose } [\mu\text{mol/ml}] = 0,1178 \times \text{Zeit [h]} - 0,5863$
Laktat-Produktion LS-Zellen ohne DCA	$\Delta\text{Laktat } [\mu\text{mol/ml}] = 0,15 \times \text{Zeit [h]} - 0,238$
Laktat-Produktion LS-Zellen mit DCA	$\Delta\text{Laktat } [\mu\text{mol/ml}] = 0,0822 \times \text{Zeit [h]} - 0,6294$

Rechenbeispiel: Berechnung Glukose-Verbrauch [nmol/ml] pro Minute

$$\Delta\text{Glukose} [\mu\text{mol/ml}] = 0,1214 \times \text{Zeit [h]} - 0,3701$$

- ➔ $\Delta\text{Glukose} [\mu\text{mol/ml}] = 0,1214 \times 73 [\text{h}] - 0,3701 = 8,4921$
- ➔ $\Delta\text{Glukose} [\mu\text{mol/ml}] \text{ pro Minute} = 8,4921 / 4380 \text{ min} = 0,00194$
- ➔ $\Delta\text{Glukose} [\text{nmol/ml}] \text{ pro Minute} = 1,94$

Anhang zu 3.7. und 3.8.: Standard Eichkurve mit Qproteome Mitochondrien Isolation Kit Storage Buffer als Lösungsmittel

Extinktion 500nm	BSA Konzentration [$\mu\text{l}/10 \mu\text{l}$]
0,1449	0
0,2045	2,5
0,2222	5
0,2645	10
0,3294	20
0,4245	30
0,5004	40
0,6055	50
0,7074	60

Respirationsraten Mitochondrien

Zelllinie	Basale Respirationsrate[n $\mu\text{mol}/\text{min}$]	Respirationsrate nach Zugabe von 50 μl 1,75mM Succinat [nmol/min]	Respirationsrate nach Zugabe von 50 μl 10mM ADP[nmol/min]
Kelly	0,274	1,16	0,693
Kelly	0,677	1,46	0,942
Kelly	0,11	0,186	0,19
SK-N-SH	0,305	1,5	1,52
SK-N-SH	1,28	6,93	6,01
SK-N-SH	0,551	2,95	2,4
LS	0,531	1,8	1,26
LS	0,997	2,87	2,1
LS	0,966	3,46	2,22
LS	0,429	1,12	1,11

7. Literaturverzeichnis

1. Adhikary, S. und Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 635-645.
2. Aft, R.L., Zhang, F.W. und Gius, D. (2002). Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br J Cancer* 87: 805-812.
3. Ahuja, V., Coleman, R.E., Herndon, J. und Patz, E.F. (1998). The prognostic significance of fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging for patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 83: 918-924.
4. Alavi, J.B., Alavi, A., Chawluk, J., Kushner, M., Powe, J., Hickey, W. und Reivich, M. (1988). Positron emission tomography in patients with glioma. A predictor of prognosis. *Cancer* 62: 1074-1078.
5. Bárdos, J.I. und Ashcroft, M. (2005). Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network. *Biochim Biophys Acta* 1755: 107-120.
6. Bauer, D.E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C. und Thompson, C.B. (2005). ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* 24: 6314-6322.
7. Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E. und Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126: 107-120.
8. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2007). *Biochemie*, 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
9. Berthold, F. (2006). Neuroblastom. *In* Kompendium Internistische Onkologie, Standards in Diagnostik und Therapie Teil 2, Therapiekonzepte maligner Tumoren. Schmoll, H.J., Höffken, K. und Possinger, K. (Hrsg.): 5567-5581.
10. Berthold, F. und Hero, B. (2000). Neuroblastoma: Current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs* 59: 1261-1277.
11. Bhujwala, Z.M., Artemov, D., Ballesteros, P., Cerdan, S., Gillies, R.J. und Solaiyappan, M. (2002). Combined vascular and extracellular pH imaging of solid tumors. *NMR in Biomed* 15: 114-119.
12. Biedler, J.L., Helson, L. und Spengler, B.A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33: 2643-2652.

13. Blackwood, E.M., Kretzner, L. und Eisenman, R.N. (1992). Myc and Max function as a nucleoprotein complex. *Curr Opin Genet Dev* 2: 227-235.
14. Bonnet, S., Archer, S.L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C.T., Lopaschuk, G.D., Puttagunta, L. und Bonnet, S. (2007). A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11: 37-51.
15. Boon, K., Caron, H.N., van Asperen, R., Valentijn, L., Hermus, M.C., van Sluis, P., Roobeek, I., Weis, I., Voute, P.A. und Schwab, M. (2001). N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO J* 20: 1383-1393.
16. Bordow, S.B., Norris, M.D., Haber, P.S., Marshall, G.M. und Haber, M. (1998). Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma. *J Clin Oncol* 16: 3286-3294.
17. Bos, R., van der Hoeven, J.J.M., van der Wall, E., van der Groep, P., van Diest, P.J., Comans, E.F.I., Joshi, U., Semenza, G.L., Hoekstra, O.S., Lammertsma, A.A. und Molthoff, C.F.M. (2002). Biologic correlates of 18Fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by Positron Emission Tomography. *J Clin Oncol* 20: 379-387.
18. Brand, K.A. und Hermfisse, U. (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J* 11: 388-395.
19. Brand, M. (2005). The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem Soc Trans* 33: 897-904.
20. Brodeur, G.M. und Maris, J.M. (2006). Neuroblastoma. *In* Principles and practice of pediatric oncology. Pizzo, P.A. und Poplack, D.G. (Hrsg.). J B Lippincott Company, Philadelphia: 933-970.
21. Brodeur, G.M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N.L., Castel, V., Castelberry, R.P., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M. und Hedborg, F. (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11: 1466-1477.
22. Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. und Bishop, J.M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224: 1121-1124.
23. Brown, J. (1962). Effects of 2-deoxyglucose on carbohydrate metabolism: review of the literature and studies in the rat. *Metab Clin Exp* 11: 1098-1112.

24. Buchmann, I., Reinhardt, M., Elsner, K., Bunjes, D., Althoefer, C., Finke, J., Moser, E., Glatting, G., Kotzerke, J. und Guhlmann, C.A. (2001). 2-(fluorine-18)fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography in the detection and staging of malignant lymphoma. A bicenter trial. *Cancer* 91: 889-899.
25. Busk, M., Horsman, M.R., Kristjansen, P.E.G., van der Kogel, A.J., Bussink, J. und Overgaard, J. (2008). Aerobic glycolysis in cancers: implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia. *Int J Cancer* 122: 2726-2734.
26. Cairns, R.A., Papandreou, I., Sutphin, P.D. und Denko, N.C. (2007). Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy. *Proc Nat Acad Sci USA* 104: 9445-9450.
27. Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L. und Cantley, L.C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452: 230-233.
28. Clark, L.C. (1959). U.S. Patent No 2913286. USA.
29. Cohn, S.L., London, W.B., Huang, D., Katzenstein, H.M., Salwen, H.R., Reinhart, T., Madafiglio, J., Marshall, G.M., Norris, M.D. und Haber, M. (2000). MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified MYCN. *J Clin Oncol* 18: 3604-3613.
30. Collins, P., Jones, C., Choudhury, S., Damelin, L. und Hodgson, H. (2005). Increased expression of uncoupling protein 2 in HepG2 cells attenuates oxidative damage and apoptosis. *Liver Int* 25: 880-887.
31. Crabtree, H.G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* 23: 536-545.
32. Cummins, E.P. und Cormac, T.T. (2005). Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 450: 363-371.
33. Czernin, J. und Phelps, M.E. (2002). Positron emission tomography scanning: current and future applications. *Annu Rev Med* 53: 89-112.
34. Dang, C.V. (1999). C-myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19: 1-11.
35. 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.

36. DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S. und Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 104: 19345-19350.
37. Delieu, T. und Walker, D.A. (1972). An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol* 71: 201-225.
38. Denko, N.C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 8: 705-713.
39. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
40. Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R. und Greenberg, M.E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275: 661-665.
41. Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M. und Thompson, C.B. (2004). Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64: 3892-3899.
42. Fantin, V.R., St Pierre, J. und Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9: 425-434.
43. Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J., Shimoda, L., Dang, C.V. und Semenza, G.L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129: 111-122.
44. Gambhir, S.S. (2002). Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* 2: 683-693.
45. Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.C., Lee, Y.S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T. und Dang, C.V. (2009). C-myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458: 762-765.
46. Gatenby, R.A. und Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4: 891-899.
47. Gerber, C. (1995). Der oxidative Stoffwechsel aktivierter Granulozyten von gesunden Personen im Vergleich zu Personen mit einem Myeloperoxidasemangel. Diplomarbeit an der biologischen Fakultät der Universität Tübingen.

48. Gillies, R.J. und Gatenby, R.A.(2007). Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? *J Bioenerg Biomembr* 39: 251-257.
49. Gleichmann, U. und Lübbers, D.W.(1960). Die Messung des Sauerstoffdruckes in Gasen und Flüssigkeiten mit der Platinelektrode unter besonderer Berücksichtigung der Messung im Blut. *Pflugers Arch Gesamte Physiol* 271: 431-455.
50. Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W. und Giaccia, A.J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379: 88-91.
51. Green, D.R. und J.C.Reed. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312.
52. Griguer, C.E., Oliva, C.R. und Gillespie, G.Y. (2005). Glucose metabolism heterogeneity in human and mouse malignant glioma cell lines. *J Neurooncol* 74: 123-133.
53. Guillery, O., Malka, F., Frachon, P., Milea, D., Rojo, M. und Lombès, A. (2008). Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary human fibroblasts. *Neuromuscul Disord* 18: 319-330.
54. Guppy, M., Leedman, P., Zu, X.L. und Russell, V. (2002). Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J* 364: 309-315.
55. Hackenbrock, C.R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 30: 269-297.
56. Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D.E., Andreadis, C., Shaw, A.N., Dhanak, D., Hingorani, S.R., Tuveson, D.A. und Thompson, C.B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 8: 311-321.
57. He, X., Brenchley, P.E.C., Jayson, G.C., Hampson, L., Davies, J. und Hampson, I.N. (2004). Hypoxia increases heparanase-dependent tumor cell invasion, which can be inhibited by antiheparanase antibodies. *Cancer Res* 64: 3928-3933.
58. Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M. und Jain, R.K. (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3: 177-182.
59. Hernlund, E., Ihlund, L.S., Khan, O., Ates, Y.O., Linder, S., Panaretakis, T. und Shoshan, M.C. (2008). Potentiation of chemotherapeutic drugs by energy metabolism inhibitors 2-deoxyglucose and etomoxir. *Int J Cancer* 123: 476-483.

60. Hess, S.C. (2005). Einfluss von exogenem Stickstoffmonoxid einer HLM-Operation auf den oxidativen Burst in Granulozyten bei herzkranken Kindern. Dissertation an der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen.
61. Huang, L.E. (2008). Carrot and stick: HIF- engages c-myc in hypoxic adaptation. *Cell Death Differ* 15: 672-677.
62. Ibson, J.M. und Rabbitts, P.H. (1988). Sequence of a germ-line N-myc gene and amplification as a mechanism of activation. *Oncogene* 2: 399-402.
63. Janardhanan, R., Banik, N.L. und Ray, S.K. (2009). N-myc down regulation induced differentiation, early cell cycle exit, and apoptosis in human malignant neuroblastoma cells having wild type or mutant p53. *Biochem Pharmacol*. In press, corrected proof.
64. Ježek, P. und Hlavatá, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 2478-2503.
65. Kaelin, W.G. (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2: 673-682.
66. Kaplan, O., Navon, G., Lyon, R.C., Faustino, P.J., Straka, E.J. und Cohen, J.S. (1990). Effects of 2-deoxyglucose on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: Toxicity and magnetic resonance spectroscopy studies of metabolism. *Cancer Res* 50: 544-551.
67. Kawamura, T., Kusakabe, T., Sugino, T., Watanabe, K., Fukuda, T., Nashimoto, A., Honma, K. und Suzuki, T. (2001). Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma. *Cancer* 92: 634-641.
68. Kim, J. und Dang, C.V. (2005). Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* 30: 142-150.
69. Kim, J. und Dang, C.V. (2006). Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 66: 8927-8930.
70. Kim, J.W., Tchernychyov, I., Semenza, G.L. und Dang, C.V. (2006). HIF-a-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaption to hypoxia. *Cell Metab* 3: 177-185.
71. Kleber, H.-P., Schlee, D. und Schöpp, W. (1997). Atmungskette und oxidative Phosphorylierung: Ermittlung von Respirationskontrollindices und P/O-Quotienten sowie die Wirkung von Inhibitoren auf die mitochondriale Atmung. *In Biochemische Praktikum - Methoden für Studium, Praxis, Forschung*, 5. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm: 350-353.

72. Kögel, D., Svensson, B., Copanaki, E., Anguissola, S., Bonner, C., Thurow, N., Gudorf, D., Hetschko, H., Muller, T. und Peters, M. (2006). Induction of transcription factor CEBP homology protein mediates hypoglycaemia-induced necrotic cell death in human neuroblastoma cells. *J Neurochem* 99: 952-964.
73. Kraus-Berthier, L., Jan, M., Guilbaud, N., Naze, M., Pierre, A. und Atassi, G. (2000). Histology and sensitivity to anticancer drugs of two human non-small cell lung carcinomas implanted in the pleural cavity of nude mice. *Clinical Cancer Res* 6: 297-304.
74. Kuci, Z., Bruchelt, G., Seitz, G., Karov, Y., Or, R., Handgretinger, R., Niethammer, D. und Hahn, T. (2002). Bone marrow-derived factors support growth of N-type, but not of melanocytic neuroblastoma cells. *Anticancer Res* 22: 4325-4329.
75. Kunkel, M., Reichert, T.E., Benz, P., Lehr, H.A., Jeong, J.H., Wieand, S., Bartenstein, P., Wagner, W. und Whiteside, T.L. (2003). Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 97: 1015-1024.
76. Kushner, B.H., Yeung, H.W., Larson, S.M., Kramer, K. und Cheung, N.K. (2001). Extending positron emission tomography scan utility to high-risk neuroblastoma: fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography as sole imaging modality in follow-up of patients. *J Clin Oncol* 19: 3397-3405.
77. Li, F., Wang, Y., Zeller, K.I., Potter, J.J., Wonsey, D.R., O'Donnell, K.A., Kim, J., Yustein, J.T., Lee, L.A. und Dang, C.V. (2005). Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* 25: 6225-6234.
78. Li, C., Wright, M.M. und Jackson, R.M. (2002). Reactive species mediated injury of human lung epithelial cells after hypoxia-reoxygenation. *Exp Lung Res* 28: 373-389.
79. Li, W., Xie, Y., Sun, R.W.Y., Liu, Q., Young, J., Yu, W.Y., Che, C.M., Tam, P.K. und Ren, Y. (2009). Inhibition of Akt sensitises neuroblastoma cells to gold(III) porphyrin 1a, a novel antitumour drug induced apoptosis and growth inhibition. *Br J Cancer* 101: 342-349.
80. Loesberg, C., Rooij, H.V., Nooijen, W.J., Meijer, A.J. und Smets, L.A. (1990). Impaired mitochondrial respiration and stimulated glycolysis by m-iodobenzylguanidine (MIBG). *Int J Cancer* 46: 276-281.
81. Löffler, G. und Petrides, P.E. (Hrsg) (2003). *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokyo.

82. López-Ríos, F., Sánchez-Aragó, M., García-García, E., Ortega, Á.D., Berrendero, J.R., Pozo-Rodríguez, F., López-Encuentra, A., Ballestin, C. und Cuezva, J.M. (2007). Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 67: 9013-9017.
83. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, A. und Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
84. Lum, J.J., Bui, T., Gruber, M., Gordan, J.D., DeBerardinis, R.J., Covelto, K.L., Simon, M.C. und Thompson, C.B. (2007). The transcription factor HIF-1 plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev* 21: 1037-1049.
85. Macheda, M.L., Rogers, S. und Best, J.D. (2005). Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell physiol* 202: 654-662.
86. Malynn, B.A., de Alboran, I.M., O'Hagan, R.C., Bronson, R., Davidson, L., DePinho, R.A. und Alt, F.W. (2000). N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes Dev* 14: 1390-1399.
87. Mannella, C.A., Pfeiffer, D.R., Bradshaw, D.R., Moraru, I.I., Slepchenko, B., Loew, L.M., Hsieh, C.E., Buttle, K., Marko, M. (2001). Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* 52: 93-100.
88. Maris, J.M., Hogarty, M.D., Bagatell, R. und Cohn, S.L. (2007). Neuroblastoma. *Lancet* 369: 2106-2120.
89. 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 Cell Physiol* 265: 1015-1029.
90. Mathupala, S.P., Rempel, A. und Pedersen, P.L. (1997). Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase. *J Bioenerg Biomembr* 29: 339-343.
91. Mazzio, E.A. und Soliman, K.F.A. (2004). Effects of enhancing mitochondrial oxidative phosphorylation with reducing equivalents and ubiquinone on 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity and complex I-IV damage in neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 67: 1167-1184.
92. McLean, L.A., Roscoe, J., Jorgensen, N.K., Gorin, F.A. und Cala, P.M. (2000). Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: 676-688.

93. Meitar, D., Crawford, S.E., Rademaker, A.W. und Cohn, S.L. (1996). Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 14: 405-414.
94. Mochiki, E., Kuwano, H., Katoh, H., Asao, T., Oriuchi, N. und Endo, K. (2004). Evaluation of 18F-2-deoxy-2-fluoro-d-glucose positron emission tomography for gastric cancer. *World J Surg* 28 (3): 247-253.
95. Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enriquez, S., Marín-Hernández, A. und Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274: 1393-1418.
96. Munn, E.A. (1974). *The structure of mitochondria*. Academic Press London.
97. Nisen, P.D., Waber, P.G., Rich, M.A., Pierce, S., Garvin, J.R. Jr., Gilbert, F., Lanzkowsky, P. (1988). N-myc oncogene RNA expression in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 80: 1633-1637.
98. Norris, M.D., Burkhart, C.A., Marshall, G.M., Weiss, W.A. und Haber, M. (2000). Expression of N-myc and MRP genes and their relationship to N-myc gene dosage and tumor formation in a murine neuroblastoma model. *Med Pediatr Oncol* 35: 585-589.
99. Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L.A. und Dang, C.V. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-myc. *J Biol Chem* 275: 21797-21800.
100. Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L. und Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3: 187-197.
101. Papandreou, I., Krishna, C., Kaper, F., Cai, D., Giaccia, A.J. und Denko, N.C. (2005). Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment. *Cancer Res* 65: 3171-3178.
102. Pelicano, H., Martin, D.S., Xu, R.H. und Huang, P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25: 4633-4646.
103. Perry, M.E., Dang, C.V., Hockenbery, D. und Moll, U. (2004). Highlights of the National Cancer Institute workshop on mitochondrial funktion and cancer. *Cancer Res* 64: 7640-7644.
104. Preis, P.N., Saya, H., Nadasdi, L., Hochhaus, G., Levin, V. und Sadee, W. (1988). Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A. *Cancer Res* 48: 6530-6534.
105. *Qproteome Mitochondria Isolation Handbook* (2006). Quiagen® GmbH Deutschland, Hilden.

106. Rajendran, J.G., Mankoff, D.A., O'Sullivan, F., Peterson, L.M., Schwartz, D.L., Conrad, E.U., Spence, A.M., Muzi, M., Farwell, D.G. und Krohn, K.A. (2004). Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors evaluation by [18F] fluoromisonidazole and [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res* 10: 2245-2252.
107. Ramanathan, A., Wang, C. und Schreiber, S.L. (2005). Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Nat Acad Sci USA* 102: 5992-5997.
108. Reitzer, L.J., Wice, B.M. und Kennell, D. (1979). Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254: 2669-2676.
109. Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J. and Capaldi, R.A. (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 64: 985-993.
110. Rudolph, G., Schilbach-Stückle, K., Handgretinger, R., Kaiser, P. und Hameister, H. (1991). Cytogenetic and molecular characterization of a newly established neuroblastoma cell line LS. *Human Genet* 86: 562-566.
111. Sadee, W., Yu, V.C., Richards, M.L., Preis, P.N., Schwab, M.R., Brodsky, F.M. und Biedler, J.L. (1987). Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res* 47: 5207-5212.
112. Samper, E., Morgado, L., Estrada, J.C., Bernad, A., Hubbard, A., Cadenas, S. und Melov, S. (2009). Increase in mitochondrial biogenesis, oxidative stress, and glycolysis in murine lymphomas. *Free Radic Biol Med* 46: 387-396.
113. Samudio, I., Fiegl, M. und Andreeff, M. (2009). Mitochondrial uncoupling and the Warburg Effect: Molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res* 69: 2163-2166.
114. Santamaria, G., Martinez-Diez, M., Fabregat, I. und Cuezva, J.M. (2006). Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* 27: 925-935.
115. Scatena, R., Bottoni, P., Pontoglio, A., Mastrototaro, L. und Giardina, B. (2008). Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 17: 1533-1545.
116. Scheffler, I.E. (2008). *Mitochondria*, 2. Auflage. Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

117. Schornack, P.A. und Gillies, R.J. (2003). Contributions of cell metabolism and H⁺ diffusion to the acidic pH of tumors. *Neoplasia* 5: 135-145.
118. Schulz, T.J., Thierbach, R., Voigt, A., Drewes, G., Mietzner, B., Steinberg, P., Pfeiffer, A.F.H. und Ristow, M. (2006). Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem* 281: 977-981.
119. Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M. und Trent, J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305: 245-248.
120. Seeger, R.C., Wada, R., Brodeur, G.M., Moss, T.J., Bjork, R.L., Sousa, L. und Slamon, D.J. (1988). Expression of N-myc by neuroblastomas with one or multiple copies of the oncogene. *Prog Clin Biol Res* 271: 41-49.
121. Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B. und Gottlieb, E. (2005). Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7: 77-85.
122. Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732.
123. Shim, H., Chun, Y.S., Lewis, B.C. und Dang, C.V. (1998). A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-myc. *PNAS* 95: 1511-1516.
124. Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V., Roald, B., Stram, D.O., Gerbing, R.B., Lukens, J.N. und Matthay, K.K. (1999). The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada system). *Cancer* 86: 364-372.
125. Singh, D., Banerji, A.K., Dwarakanath, B.S., Tripathi, R.P., Gupta, J.P., Mathew, T.L., Ravindranath, T. und Jain, V. (2005). Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose. *Strahlenther Onkol* 181: 507-514.
126. SI Intruction Manual 928 6-Channel Dissolved Oxygen System (1998). Strathkelvin Instruments LTD, Glasgow, UK.
127. Sinthupibulyakit C., Grimes, K.R., Domann, F.E., Xu, Y., Fang, F., Ittarat, W., St. Clair, D.K., St. Clair, W. (2009). p53 is an important factor for the radiosensitization effect of 2-deoxy-D-glucose. *Int J Oncol* 35: 609-615.
128. Slave, I., Ellenbogen, R., Jung, W.H., Vawter, G.F., Kretschmar, C., Grier, H. und Korf, B.R. (1990). Myc gene amplification and expression in primary human neuroblastoma. *Cancer Res* 50: 1459-1463.

129. Smith, D., Cossins, L., Hatzinisiriou, I., Haber, M. und Nagley, P. (2008). Lack of correlation between MYCN expression and the Warburg effect in neuroblastoma cell lines. *BMC Cancer* 8: 259-266.
130. Stacpoole, P.W., Kerr, D.S., Barnes, C., Bunch, S.T., Carney, P.R., Fennell, E.M., Felitsyn, N.M., Gilmore, R.L., Greer, M., Henderson, G.N., Hutson, A.D., Neiberger, R.E., O'Brian, R.G., Perkins, L.A., Quisling, R.G., Shroads, A.L., Shuster, J.J., Silverstein, J.H., Theriaque, D.W. und Valenstein, E. (2006). Controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children. *Pediatrics* 117: 1519-1531.
131. Stolze, I., Berchner-Pfannschmidt, U., Freitag, P., Wotzlaw, C., Rossler, J., Frede, S., Acker, H., und Fandrey, J. (2002). Hypoxia-inducible erythropoietin gene expression in human neuroblastoma cells. *Blood* 100: 2623-2628.
132. Sun, R.C., Fadia, M., Dahlstrom, J.E., Parish, C.R., Board, P.G. und Blackburn, A.C. (2009). Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat.* Online publication ahead of print.
133. Tang, X.X., Zhao, H., Kung, B., Kim, D.Y., Hicks, S.L., Cohn, S.L., Cheung, N.K., Seeger, R.C., Evans, A.E. und Ikegaki, N. (2006). The MYCN enigma: significance of MYCN expression in neuroblastoma. *Cancer Res* 66: 2826-2833.
134. Tickoo, S.K.M., Lee, M.W.M., Eble, J.N.M., Amin, M.M.D., Christopherson, T.B.S., Zarbo, R.J.M. und Amin, M.B.M. (2000). Ultrastructural observations on mitochondria and microvesicles in renal oncocytoma, chromophobe renal cell carcinoma, and eosinophilic variant of conventional (clear cell) renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 24: 1247-1256.
135. Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. und Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324: 1029-1033.
136. Voet, D., Voet, J. und Pratt, C. (2008). *Principles of Biochemistry*, 3. Auflage. Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
137. Wang, T., Marquardt, C. und Foker, J. (1976). Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 261: 702-705.
138. Warburg, O. (1956a). On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309-314.
139. Warburg, O. (1956b). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124: 269-270.
140. Warburg, O., Posener, K. und Negelein, E. (1924). Ueber den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* 12: 1131-1137.

141. Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A. , Sayed, N. , Zhang, X.Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B. und Thompson, C.B. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 18782-18787.
142. Wu, M., Neilson, A., Swift, A.L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., Chomicz, S. und Ferrick, D. (2007). Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C125-C136.
143. Yeo, T.K., Kintner, J., Armand, R., Perez, R. und Lewis, L.D. (2007). Sublethal concentrations of gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) alter mitochondrial ultrastructure and function without reducing mitochondrial DNA content in BxPC-3 human pancreatic carcinoma cells. *Human Exp Toxicol* 26: 911-921.
144. Younes, M., Lechago, L.V., Somoano, J.R., Mosharaf, M. und Lechago, J. (1996). Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res* 56: 1164-1167.
145. Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R. und Lazebnik, Y. (2007). Deficiency in glutamine but not glucose induces myc-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol* 178: 93-105.
146. Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C.V. und Semenza, G.L. (2007). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of c-myc activity. *Cancer Cell* 11: 407-420.
147. Zhang, X.D., Deslandes, E., Villedieu, M., Poulain, L., Duval, M., Gauduchon, P., Schwartz, L. und Icard, P. (2006). Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro. *Anticancer Res* 26: 3561-3566.
148. Zhong, D., Xiong, L., Liu, T., Liu, X., Liu, X., Chen, J., Sun, S.Y., Khuri, F.R., Zong, Y., Zhou, Q. und Zhou, W. (2009). The Glycolytic Inhibitor 2-Deoxyglucose Activates Multiple Prosurvival Pathways through IGF1R. *J Biol Chem* 284: 23225-23233.
149. Zick, M., Rabl, R. und Reichert, A.S. (2009). Cristae formation--linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1793: 5-19.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. G. Bruchelt für die Überlassung des Themas sowie die engagierte Betreuung der Arbeit bedanken.

Danken möchte ich ebenfalls Prof. Dr. H. Wolburg für das Bereitstellen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Zudem möchte ich mich bei Gisela Merkel für die Einführung in die Laborarbeit, Nadine Kemmler für ihre praktischen Tipps und die lustigen Stunden im Büro und Beate Deubzer für die gemeinsame Arbeit und ihre Unterstützung an langen Wochenenden im Labor bedanken.

Bei Joanna Miest bedanke ich mich für das unermüdliche Korrekturlesen, die Aufmunterungen zwischendurch und das Interesse an dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter Ulrike Schulz-Niewisch für ihren Glauben an mich und ihre Unterstützung, die mir mein Studium und diese Arbeit erst ermöglicht haben.