

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
-Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Claudia Rössig-

**Auswirkung von Dichloracetat auf die
Zytotoxizität konventioneller
Chemotherapeutika gegen pädiatrische
neoplastische Zelllinien**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

vorgelegt von Wiebicke, Matthias

aus Winnipeg, Kanada

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Boos

2. Berichterstatter: Apl. Prof. Dr. rer. nat. Georg Hempel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2017

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
-Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Claudia Rössig-
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Boos
Koreferent: Apl. Prof. Dr. rer. nat. Georg Hempel

Zusammenfassung

Auswirkung von Dichloracetat auf die Zytotoxizität konventioneller Chemotherapeutika gegen pädiatrische neoplastische Zelllinien

Matthias Wiebicke

Fragestellung: Die Substanz Dichloracetat (DCA) ist durch die Fähigkeit, über die Hemmung der Pyruvatdehydrogenase-Kinase potentiell selektiv den Stoffwechsel maligner Zellen zu beeinflussen, in den Fokus der onkologischen Forschung gerückt. Dabei ergaben sich widersprüchliche Resultate. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die angegebenen Effekte von DCA in Kombination mit etablierten Zytostatika unter Berücksichtigung postulierter Wirkungsmechanismen an ausgesuchten pädiatrischen Tumorzelllinien zu prüfen.

Methodik: Mittels MTT-Test wurde die Wachstumshemmung durch DCA bei Konzentrationen von 10 und 25 mmol/l allein und in Kombination mit jeweils 5 verschiedenen Konzentrationen von Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid, SN38 und Temozolomid an 2 Osteosarkom-, 2 Medulloblastom- und 4 leukämischen Zelllinien ermittelt. Ferner erfolgten Expressionsanalysen der Gene von Kv1.5, PKM2, Survivin und VDAC1 sowohl auf mRNA-Ebene mithilfe der qRT-PCR als auch auf Proteinebene anhand von Western-Blots an pädiatrischen sowie adulten neoplastischen Zelllinien.

Ergebnisse: Die DCA-vermittelte Wachstumshemmung in den getesteten Zelllinien war moderat (10 mmol/l: 4-37 %, 25 mmol/l: 21-70 %). Interaktionen mit den genannten Zytostatika zeigten sowohl additive als auch antagonistische Effekte. Die getesteten adulten Zelllinien wiesen im Vergleich zu den pädiatrischen Zelllinien eine im Mittel > 10mal höhere Survivin-Expressionsrate auf. Die Expressionen der anderen Gene zeigten diesbezüglich keine eindeutige Tendenz. Es bestand eine signifikante positive Korrelation zwischen der genannten Wachstumshemmung mit der mRNA-Expressionsrate für Kv1.5 und entsprechende negative Korrelationen für PKM2 und VDAC1.

Schlussfolgerungen: Die sich in der Literatur untereinander als auch mit dieser Arbeit teils widersprechenden Ergebnisse in Bezug auf die Effekte von DCA ergeben den Verdacht auf eine hohe Anfälligkeit des angewendeten In-vitro-Versuchsmodells für abweichende Testvariablen wie Vorinkubation, Nährstoffgehalt, atmosphärische Bedingungen, pH-Wert u. v. m. Dies lässt die so erhaltenen Resultate kritisch hinterfragen und verbietet direkte klinische Konsequenzen im Sinne von Heilversuchen.

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Auswirkung von Dichloracetat auf die Zytotoxizität konventioneller Chemotherapeutika gegen pädiatrische neoplastische Zelllinien

in der Klinik für:

*Kinder- und Jugendmedizin - Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
des Universitätsklinikums Münster*

unter Anleitung von:

Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Boos

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Köln, d. 04.12.2017

Ort, Datum

Matthias Wiebicke

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Stoffwechsel nicht-neoplastischer Zellen.....	5
2.1.1	Energiemetabolismus	5
2.1.2	Apoptose.....	8
2.2	Mechanismen der Apoptoseresistenz in neoplastischen Zellen	12
2.2.1	Erhöhte Expression antiapoptotischer Faktoren	12
2.2.2	Verminderte Expression proapoptotischer Faktoren	13
2.2.3	Der Warburg-Effekt/ neoplastische aerobe Glykolyse	14
2.3	Neoplastische Erkrankungen in der Pädiatrie.....	16
2.4	Dichloracetat (DCA)	17
2.4.1	Wirkungsmechanismus.....	17
2.4.2	Pharmakokinetik und Pharmakodynamik.....	20
2.4.3	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen.....	21
2.5	Zielsetzung der Arbeit.....	21
2.5.1	Ermittlung von Interaktionen von DCA mit anderen Chemotherapeutika	21
2.5.2	Ermittlung des Expressionsprofils bestimmter Gene in pädiatrischen neoplastischen Zelllinien	22
3	Material und Methoden.....	24
3.1	Material	24
3.1.1	Zelllinien.....	24
3.1.2	Verwendete Substanzen.....	28
3.1.3	Einmal-Laborbedarf	28
3.1.4	Lösungen und Reagenzien.....	29
3.1.5	Technische Geräte	32
3.1.6	Verwendete Software	33
3.1.7	Sonstige Hilfsmittel.....	33
3.2	Methoden.....	33
3.2.1	Auswahl der Substanzen und Konzentrationen	33
3.2.2	Allgemeine Vorkehrungen bei den Versuchs-Durchführungen	35
3.2.3	Herstellung des Nährmediums.....	35
3.2.4	Vorbereitung der Zellen zum experimentellen Gebrauch	36
3.2.5	Coaten der Zellkulturflaschen	36
3.2.6	Passagieren	37
3.2.7	Behandlung schlecht wachsender Leukämie-Zelllinien	39
3.2.8	MTT-Test	39
3.2.9	Herstellung von Zellpellets.....	45
3.2.10	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.....	45

3.2.11	Western Blot.....	49
3.2.12	Berechnung, Statistische Analyse und graphische Darstellung.....	58
4	Ergebnisse.....	64
4.1	Ergebnisse der In-vitro-Zytotoxizitätstests.....	64
4.1.1	Effekt der Substanzen allein.....	64
4.1.2	Effekt der Kombinationen.....	71
4.2	Ergebnisse der mRNA-Expressions-Analysen.....	88
4.2.1	Kv1.5.....	88
4.2.2	PKM2.....	91
4.2.3	Survivin.....	94
4.2.4	VDAC1.....	96
4.2.5	Korrelationen der mRNA-Expression der getesteten Targets untereinander	98
4.3	Ergebnisse der Western-Blots.....	99
4.3.1	Kv1.5.....	99
4.3.2	PKM2.....	100
4.3.3	Survivin.....	100
4.3.4	VDAC1.....	102
5	Diskussion.....	105
5.1	Diskussion der In-vitro-Zytotoxizitäts-Tests.....	105
5.1.1	Effekt von DCA alleine.....	105
5.1.2	Diskussion der In-vitro-Kombinations-Zytotoxizitätstests.....	108
5.2	Diskussion der mRNA-Expressions-Analysen.....	128
5.2.1	Kv1.5.....	128
5.2.2	PKM2.....	132
5.2.3	Survivin.....	135
5.2.4	VDAC1.....	136
5.2.5	Korrelationen der mRNA-Expression der getesteten Targets untereinander ..	138
5.3	Diskussion der Western-Blots.....	140
6	Literaturverzeichnis.....	I
7	Lebenslauf.....	XVII
8	Danksagung.....	XVIII
9	Anhang.....	XIX

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APAF1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat
CDI	Coefficient of Drug Interaction
CI	Kombinationsindex
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CML	Chronische Myeloische Leukämie
DCA	Dichloracetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy-Ribonuclein-Acid
EWS	Ewing Sarkom
FBS	Fetal Bovine Serum
FDG-PET	Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPOH	Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
HIF1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
KC	Konventionelles Zytostatikum
KG	Körpergewicht
Kv1.5	Potassium Voltage-Gated Channel, Shaker Related Family, Member 5
MB	Medulloblastom
MG	Molekulgewicht
MPT	Mitochondrial Permeability Transition
MPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
mRNA	Messenger Ribonuclein Acid
mitROS	Mitochondrial Reactive Oxygen Species
MTT	3[4,5- Dimethylthiazol-2 yl]-2,5 diphenyl-tetrazoliumbromide

NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NANAK-Effekt	Nicht additiver, nicht antagonistischer kombinatorischer Effekt (Definition s. Kap. 3.2.12.3)
NB	Neuroblastom
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer = nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
OD	Optische Dichte
OS	Osteosarkom
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK	Pyruvatdehydrogenase-Kinase
PFK1	Phosphofruktokinase-1
PKM2	Pyruvatkinase, Isoform 2
RI	R-Index
RCF	Relative Centrifugal Force
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RÜ	Relatives (Zell-) Überleben (Definition s. Kap. 3.2.12.1)
SDS	Sodiumduodecylsulfat
Tab.	Tabelle
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
GI	Wachstumshemmung (engl. Growth Inhibition, englisches Akronym gewählt im Hinblick auf eine allgemein gebräuchliche bzw. standardisierte Nomenklatur, Definition s. Kap. 3.2.12.3)
GI ₅₀	Growth Inhibition of 50 % of exposed cells (Definition s. Kap. 3.2.12.2)
αKAG	Alpha-Ketoglutarat
Δψ _m	Transmembranpotential an der inneren Mitochondrienmembran

2 Einleitung

Ein Großteil der neoplastischen Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter wird mit systemischer Chemotherapie behandelt. Wirkprinzip der meisten Therapeutika ist eine Abtötung und Elimination der Tumorzellen durch eine unspezifische Apoptose- oder Nekrose-Induktion schnell proliferierender Zellen. Durch eine passende Kombination mehrerer Arzneimittel verschiedener Wirkstoffgruppen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen im Rahmen einer Polychemotherapie, kann durch gezielte Modulation biochemischer Abläufe ein Synergismus erzielt werden, welcher zu einer Effizienzsteigerung führt. Dies verbessert die Prognose und ergibt durch Verteilung von nicht überlappenden Toxizitäten ein günstigeres Profil unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW) [1]. Bedingt durch den unspezifischen Zerfall auch nicht-neoplastischen Gewebes sind letztere meist immer noch sehr schwerwiegend und führen zu einer erheblichen Reduktion der Lebensqualität. Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen äußern sich beispielsweise durch Nausea, Emesis, Diarrhoe, Infertilität, Alopezie und Knochenmarkdepression. Letztere kann sich klinisch durch körperliche Schwäche (im Rahmen einer Anämie), eine hämorrhagische Diathese (bedingt durch eine Thrombopenie) und eine erhöhte Infektanfälligkeit (infolge einer Leukopenie) äußern. Hinzu kommen noch weitere medikamentenspezifische Organtoxizitäten. Diese Problematik unspezifischer Toxizität konventioneller Chemotherapeutika erklärt die große Bedeutung der Erforschung von Stoffen, deren Wirkung sich möglichst gezielt auf neoplastische Zellen begrenzt. Wirkprinzipien hierfür sind beispielsweise Antikörpertherapien, welche neoplasie-charakteristische Antigene binden, wie der bereits etablierte HER2/neu-Antikörper gegen bestimmte Mammakarzinome. Auch Arzneimittel, welche gezielt in neoplasie-spezifische Stoffwechselfvorgänge eingreifen, haben das Potenzial ein besonders günstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis aufzuweisen.

Eine ebensolche Neoplasie-Spezifität wurde für die Substanz Dichloracetat (DCA) durch die 2007 veröffentlichten präklinischen Arbeiten von Bonnet et al. [2] gezeigt und haben damit in der Fach- und Laienpresse Aufsehen erregt. Somit ist die Substanz in das Interesse der onkologischen Forschung gerückt, woraufhin weitere präklinische und dann auch erste klinische Untersuchungen folgten. Eine Hemmung des Tumorwachstums durch diese Substanz wurde sowohl in vitro als auch in vivo in vielen adulten Neoplasien nachgewiesen: Unter anderem in nicht-kleinzelligen Lungen- [2], Pankreas- [3], metastasierten Brust- [4], Colon- [5], Prostata- [6], Endometrium- [7] sowie Ovarial-Karzinomen [8]. Neben einer DCA-vermittelten Apoptoseinduktion in verschiedenen Glioblastom-Zelllinien in vitro wies eine im Jahre 2010 von Michelakis et al. veröffentlichte Studie dies auch an einer kleinen Probandengruppe von 5 erwachsenen Menschen mit der Diagnose eines Glioblastoms nach [9]. Eine andere, im Jahre

2013 von Dunbar et al. veröffentlichte Studie mit 15 Probanden mit der gleichen Diagnose, konnte bei allen 8 evaluierbaren Patienten klinisch und radiographisch nach vier Wochen unter DCA-Einnahme ein „stable-disease“ diagnostizieren [10]. Auch sei an dieser Stelle ein Case-Report von Strum et al. (2013) erwähnt, in welchem von einer (bereits vier Jahre andauernden) Remission von einem Non-Hodgkin-Lymphom durch DCA-Einnahme nach einem Rezidiv unter dem R-CHOP-Regime berichtet wird [11].

Im Funktionsbereich „Klinische Pharmakologie“ in der Pädiatrischen Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Münster ist ein präklinisches Screening-Programm eingerichtet worden, welches sich der Aufgabe widmet, bereits an Erwachsenen-Neoplasien getestete Substanzen an pädiatrischen neoplastischen Zelllinien zu untersuchen, um einen potentiellen Eingang dieser Substanzen in die klinische pädiatrische Onkologie zu evaluieren. Hierbei wird die Substanz in vitro an einem Panel verschiedener pädiatrischer neoplastischer Zelllinien unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen getestet, um den Einfluss des Medikamentes, z. B. hinsichtlich zelllinienspezifischer Wachstumshemmung oder Interaktionen mit anderen Pharmaka, festzustellen. In diesem Rahmen hat sich eine, im Jahre 2011 durch Heshe et al. [12] veröffentlichte, Arbeit mit DCA beschäftigt. Es wurde hier der Einfluss verschiedener Konzentrationen von DCA (72 Stunden Inkubation) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf das Zellüberleben von 18 verschiedenen neoplastischen pädiatrischen Zelllinien aus sechs verschiedenen Tumorentitäten (Ewing Sarkom, Medulloblastom, Leukämie, Osteosarkom, Neuroblastom, Rhabdomyosarkom), in vitro, ermittelt. Es zeigten sich insgesamt nur moderate Effekte im Hinblick auf eine Senkung des Zellüberlebens durch DCA, sodass die oben genannten erwünschten Effekte anderer Forschergruppen nicht in dem erwarteten Ausmaß reproduziert wurden. Indessen fand sich aber auch kein Anhalt für kontraproduktive Effekte durch eine Inkubation von DCA in vitro alleine.

Dies allein ist allerdings noch nicht ausreichend, um den Einsatz an pädiatrischen Patienten zu rechtfertigen: Auch in der pädiatrischen Onkologie wird hauptsächlich in polychemotherapeutischen Algorithmen gearbeitet. Neben den oben genannten, durch Kombination erzielten, erwünschten Effekten können verschiedene Stoffe auch antagonistisch interagieren, sodass eine Kombination (bei potentiell stärkeren unerwünschten Arzneimittelwirkungen) die Prognose verschlechtern kann. Im Gegensatz zu den Erwachsenen ist die Prognose jedoch bei einem pädiatrischen Patientenkollektiv bereits unter konventioneller Chemotherapie meist gut (s. Kap. 2.3), so dass in dieser Klientel hinsichtlich Chemotherapie-Kombinationsversuchen ethisch besondere Anforderungen gestellt werden müssen.

In der besagten Arbeit von Heshe et al. (2011) [12] wurden daher auch die Interaktionen von DCA mit Cisplatin in zehn pädiatrischen Zelllinien und die Interaktionen von DCA mit Doxorubicin

und Temozolomid in jeweils zwei pädiatrischen Zelllinien untersucht. Hierbei wurden starke Wirkungsverluste von Cisplatin und Doxorubicin in Kombination mit DCA in den meisten getesteten Zelllinien ermittelt¹. Auch die Ergebnisse einer Studie von Stockwin et al. aus dem Jahre 2010 [13] decken sich in manchen Aspekten nicht mit den von anderen Forschergruppen beschriebenen Effekten von DCA. Diese Dissertation hat folglich zum Ziel die postulierten Wirkmechanismen zu hinterfragen, die Ergebnisse von Heshe et al. (2011) [12] zu prüfen und die Interaktionen zwischen DCA und konventionellen in der pädiatrischen Onkologie etablierten Zytostatika differenzierter zu ermitteln, um eine Indikationsstellung zu klinischen Studien von DCA bei pädiatrischen Patienten weiter zu evaluieren.

Die Bedeutung von mehr Erkenntnissen und Aufklärung zu diesem Thema zeigt schließlich ein im „Nature“ veröffentlichter Artikel von Helen Pearson (2007) [14], welcher über eine nicht-ärztlich angeordnete Einnahme dieses nicht zugelassenen Medikamentes durch zahlreiche an Neoplasien erkrankte Erwachsene berichtet.

2.1 Stoffwechsel nicht-neoplastischer Zellen

Zum Verständnis des Wirkmechanismus von DCA, welches auf einer Rückführung eines neoplasie-typischen zu einem physiologischen Stoffwechsel in neoplastischen Zellen beruht (s. Kap. 2.4.1), ist die Kenntnis der Unterschiede im Stoffwechsel essentiell. Aus diesem Grund wird in diesem Unterkapitel auf die für diese Arbeit relevanten Stoffwechsellvorgänge nicht-neoplastischer Zellen und im folgenden Unterkapitel auf die entsprechenden Stoffwechsellvorgänge in neoplastischen Zellen eingegangen.

2.1.1 Energiemetabolismus

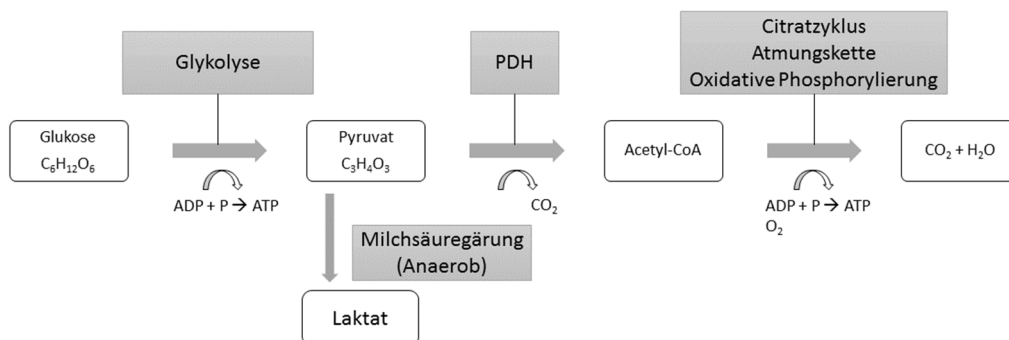


Abbildung 2.1: Übersicht über den Energiestoffwechsel (selbst erstellt)

¹ eine ausführliche Darlegung der Ergebnisse der Arbeit von Heshe et al. (2011) [12] erfolgt im Diskussionsteil dieser Dissertation

2.1.1.1 Glykolyse

Eine wichtige Funktion der ausschließlich im Zytosol ablaufenden Glykolyse ist die Bereitstellung von für die Zelle nutzbarer Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Sie wird initiiert durch eine, von einer der vier Isoformen der Hexokinase vermittelten, Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat und endet im Metaboliten Pyruvat (Überblick bei [15]).

Anaerobe Glykolyse

Befinden sich in den Zellen keine Mitochondrien (bspw. bei Erythrozyten) oder stellt der Organismus der Atmungskette nicht genug Sauerstoff zur Verfügung (in anaeroben Verhältnissen, bspw. bei körperlicher Überanstrengung), wird Pyruvat nicht dem Citratzyklus zugeführt, sondern durch die Lactatdehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert (sog. Pasteur- Effekt). Dies dient der für weitere Glykolyse-Reaktionen benötigten Regeneration von NAD^+ . Bei diesem Abbau der Glukose entstehen lediglich zwei ATP pro Molekül Glukose (Überblick bei [15]).

Definition aerobe Glykolyse

An dieser Stelle sei erwähnt, dass in der Literatur – im Gegensatz zum Terminus der „anaeroben Glykolyse“ – hinsichtlich des Begriffs „aerobe Glykolyse“ verschiedene Definitionen existieren:

- Einige Lehrbücher nutzen diesen Begriff synonym mit „aerobem Stoffwechsel“ im Sinne eines Vorganges, in welchem die Glukose als physiologischer Prozess sauerstoffabhängig durch Glykolyse, Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung zu Kohlendioxid und Wasser umgesetzt wird (vgl. Abbildung 2.1).
- In der Literatur, welche sich differenziert mit dem Thema des Energiestoffwechsels neoplastischer Zelllinien bzw. Tumorzellklone auseinandersetzt, beschreibt der Terminus hingegen weitestgehend den Vorgang in diesen Zellen, ATP trotz Vorhandensein von Mitochondrien und Sauerstoff hauptsächlich durch den Vorgang der anaeroben Glykolyse (also unter Bildung von Lactat) zu synthetisieren (siehe z. B. [16] oder [13]). Im Folgenden soll daher auch diese Definition in der vorliegenden Dissertation gelten. Die anaerobe Glykolyse ist nach dieser Definition ein physiologischer und die aerobe Glykolyse ein pathologischer Prozess. Um den Unterschied klarer hervorzuheben, wird der Begriff in dieser Arbeit um das Adjektiv „neoplastisch“ ergänzt (also „neoplastische aerobe Glykolyse“). Diese Eigenschaft, ATP trotz aerober Bedingungen, unter Ausschluss der in den Mitochondrien lokalisierten Reaktionen des Citratzyklus, der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung zu erzeugen, wird hierbei synonym mit dem Terminus „Warburg Effekt“ verwendet (vgl. Kap. 2.2.3).

2.1.1.2 Oxidativer Abbau von Pyruvat

Sind Mitochondrien und genug Sauerstoff vorhanden und liegen keine den Stoffwechsel beeinträchtigenden Mutationen vor, wird das Pyruvat in den Mitochondrien weiter zu CO_2 umgesetzt.

2.1.1.2.1 Die Pyruvatdehydrogenase (PDH)

Im Mitochondrium wird das Pyruvat unter Zuhilfenahme von fünf Co-Enzymen durch die PDH irreversibel unter Gewinnung von NADH zu CO_2 und Acetyl-CoA umgesetzt. Letztgenanntes wird anschließend im Citratzyklus weiter prozessiert (siehe Kap. 2.1.1.2.2).

Die PDH nimmt eine Schlüsselrolle für den Metabolismus der Zelle ein, indem ihre Aktivität bestimmt, ob das ATP über anaerobe Glykolyse oder oxidative Phosphorylierung (vgl. Kap. 2.1.1.3) synthetisiert wird. Somit liegt es nahe, dass sich im Laufe der Evolution die Möglichkeit einer bedarfsgerechten Regulation dieses Enzyms herausgebildet hat: Sind im Mitochondrium genug NADH und Acetyl-CoA vorhanden, wird die PDH im Sinne einer Produkthemmung durch die **Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDK)** reversibel phosphoryliert und dadurch gehemmt (Überblick bei [15]). Diese liegt im Körper in vier verschiedenen Isoformen (PDK 1-4) vor, von welchen die **PDK2** als einzige in allen (getesteten) Körperzellen vorkommt [17]. Liegt eine hohe Konzentration an Pyruvat vor, unterbleibt die Phosphorylierung und die PDH kann weiter agieren bzw. wird aus dem inaktiven Zustand durch Dephosphorylierung durch eine Phosphatase wieder aktiviert.

Mutationen in Genen, deren Produkte in diesen Regelkreis eingreifen, können folglich starke Auswirkungen auf den Stoffwechsel der betroffenen (und benachbarten) Zellen haben (bspw. [18], [19], vgl. Kapitel 2.2.3) und sind eng mit dem Thema dieser Dissertation assoziiert (siehe Kap. 2.4.1).

2.1.1.2.2 Citratzyklus

Hauptaufgabe des in der Matrix der Mitochondrien ablaufenden Citratzyklus ist die Oxidation von Acetylresten, um die Moleküle NADH und FADH_2 als Elektronenlieferanten für die Atmungskette bereit zu stellen. Pro Zyklus entstehen hier (neben zwei CO_2) drei NADH, ein FADH_2 und ein GTP. Der Citratzyklus spielt außerdem noch eine Rolle für die Synthese und den Abbau bestimmter Aminosäuren, die Synthese von Fettsäuren, Glukose und Häm (Überblick bei [15]).

2.1.1.3 Oxidative Phosphorylierung

Die bei der Glykolyse und dem oxidativen Abbau von Pyruvat gebildeten Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 werden anschließend in der Atmungskette, welche in der inneren

Mitochondrienmembran lokalisiert ist, oxidiert. Hierbei wird in Abhängigkeit von Cytochrom c und Sauerstoff ATP synthetisiert. Da die Glukose durch den oxidativen Abbau über die Glykolyse hinaus weiter umgesetzt wird, ist diese Art der ATP-Synthese wesentlich effizienter als die Glykolyse allein. Insgesamt können auf diesem Wege pro Molekül Glukose 30-32 weitere ATP synthetisiert werden. Da bei der Glykolyse 2 ATP synthetisiert werden, ist der vollständige Abbau der Glukose zu CO₂ ungefähr 16-mal effizienter (Überblick bei [15]).

2.1.2 Apoptose

Die Apoptose ist ein Vorgang, der es dem Organismus ermöglicht, kontrolliert Zellen abzubauen. Im Gegensatz zur Nekrose wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt, zum Teil sogar selber initiiert und geht ohne Schädigung des Nachbargewebes vonstatten. Sie ist essentiell bei der Entwicklung des Organismus, z. B. bei der Verschaltung der Neurone, der Entstehung des Auges und der Degeneration der Interdigitalhäute. Sie ist aber auch im adulten Organismus ein lebenswichtiger Mechanismus, der die Elimination neoplastischer Zellen, die Kontrolle von Zellzahl und Größe von Geweben, die Plastizität im ZNS, die Selektion potentiell schädlicher Zellen des Immunsystems, die holokrine Sekretion (Talgdrüsen) und vieles mehr ermöglicht [20]. Aufgrund der großen Relevanz der Apoptose für die Elimination neoplastischer Zellen und für das Verständnis der Funktion und Bedeutung des DCA und einiger "Zielgene", welche in dieser Dissertation besprochen werden, wird an dieser Stelle auf sie eingegangen. Der Vorgang der Apoptose wird in zwei Phasen unterteilt: Initiations- und Effektorphase [21].

2.1.2.1 Initiationsphase

Die Initiationsphase wiederum lässt sich in zwei Vorgänge unterteilen: den extrinsischen Signalweg, welcher von außerhalb der Zelle initiiert wird und den intrinsischen Signalweg, welcher in der Zelle selbst initiiert wird [21].

2.1.2.1.1 Extrinsischer Signalweg

Der extrinsische Weg läuft in verschiedenen Zellen unterschiedlich ab. Hiernach werden die Zellen im Hinblick auf den Apoptosepfad in Typ I und Typ II eingeteilt [20].

Extrinsischer Signalweg in Zellen vom Typ I

Bei diesen Zellen wird der extrinsische Weg der Apoptose induziert, indem ein Ligand spezifisch an einen Apoptose induzierenden Todesrezeptor der TNFR-Familie (Tumor Necrosis Factor Receptor) bindet [21]. Als Liganden können hier TNF oder andere Zytokine (bspw. von T- Zellen sezerniert) fungieren. Dies führt zu einer Trimerisierung des Todesrezeptors, welche die Bindung von Adaptermolekülen an diesen ermöglicht [22]. Die Adaptermoleküle wiederum vermitteln die

Bindung von proCaspase 8 an den Todesrezeptor, wobei sich ein sogenannter “DISC” (Death inducing signalling complex) bildet. Durch die Bindung vieler proCaspase 8-Moleküle an den Todesrezeptor erhöht sich lokal deren Konzentration und die Wahrscheinlichkeit der autokatalytischen Aktivität nimmt zu. Dadurch wird die proCaspase 8 vermehrt prozessiert [23] und anschließend am Mitochondrium **VDAC1**-abhängig (Voltage Dependent Anion Channel 1, s. auch Kap. 2.1.2.1.2) zur aktiven Caspase 8 umgesetzt [24]. Diese initiiert anschließend die Ausführungsphase.

Extrinsischer Signalweg in Zellen vom Typ II

Bei dieser Art von Zellen reicht das Signal, welches über den Todesrezeptor generiert wird und eine Caspase-Kaskade auslöst nicht aus, um alleine eine vollständige Apoptose auszulösen. Das Signal muss also amplifiziert werden, um das vom Organismus intendierte Ziel, den Zelltod, zu erreichen. Dies geschieht über einen Mitochondrien-abhängigen Pfad [20]:

Die wie bei Typ-I-Zellen (auch **VDAC1**-abhängig) aktivierte Form der Caspase 8 aktiviert hier wiederum nicht nur direkt die Caspase-Kaskade, sondern spaltet auch das der Bcl-2-Familie angehörende Protein Bid. Dieses liegt anschließend in seiner zerlegten und somit aktiven Form tBid (engl. truncated: abgeschnitten) vor. Dies führt zu einer Oligomerisierung der Proteine Bax und Bak (ebenfalls Mitglieder der Bcl-2-Familie) und resultiert schließlich in den Efflux mitochondrialer proapoptotischer Faktoren ins Zytosol (s. auch Kap. 2.1.2.1.2) [25]. Einer dieser Faktoren ist Cytochrom c, welches bereits beim Abschnitt über die oxidative Phosphorylierung (s. Kap. 2.1.1.3) besprochen wurde. Cytochrom c bindet nun an APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1), welches eine ATP-abhängige Konformationsänderung dieses Faktors zur Folge hat. Die Konformationsänderung ermöglicht eine Oligomerisierung von APAF1, welche zu einem als “Apoptosom” bezeichneten Komplex führt. Dieser spaltet und aktiviert hierdurch die Caspase 9 [26], welche entsprechend der Caspase 8 die Caspase-Kaskade auszulösen vermag [27].

2.1.2.1.2 Intrinsischer Signalweg

Die Mitochondrien spielen nicht nur eine Rolle bei der Verstärkung des extrinsischen Signalweges von Typ II- Zellen, sondern auch bei der Integration und Weitergabe proapoptotischer Signale aus der Zelle selbst (DNA-Schäden, oxidativer Stress, Nährstoffmangel, Folgen zytotoxischer Substanzen) [28].

Als wichtige Instanz bei der Weitergabe und Kontrolle Apoptose-induzierender Auslöser fungiert der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53, welcher bei vielen pathologischen Konstellationen akkumuliert und einen Zellzyklusstopp sowie Reparaturmechanismen einleitet. Kann letzteres nicht erfolgreich durchgeführt werden, aktiviert p53 proapoptotische Faktoren der

Bcl-2-Familie. Es induziert des Weiteren die Transaktivierung von Genen, welche zu einer Steigerung der Konzentration an proapoptotisch wirkenden ROS (Reactive Oxygen Species, Wirkmechanismus siehe unten) führen [29]. Auch UV-Strahlung [30], Hitzeexposition und ionisierende Strahlung [31] erhöhen die Konzentration an ROS und sind damit direkte Auslöser der Apoptose.

Neben den genannten Auslösern gibt es noch eine Vielzahl anderer Ursachen für die Induktion des intrinsischen Signalweges der Apoptose. So vielseitig diese sind, so mannigfaltig sind die in der Literatur beschriebenen Mechanismen über welche diese Auslöser die Apoptose induzieren können (s. auch [32]). Letztendlich führen jedoch die meisten von ihnen zu einem Verlust des Transmembranpotentials an der inneren Mitochondrienmembran ($\Delta\psi_m$) mit der Folge einer sogenannten "Mitochondrial Permeability Transition" (MPT) durch eine „Mitochondrial Permeability Transition Pore“ (MPTP). Die MPT beschreibt eine Erhöhung der Durchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran für gelöste Substanzen mit einer Molekülmasse kleiner 1,5 kDa [20]. Diese Veränderungen bewirken einen osmotisch bedingten Influx von Wasser in die Mitochondrienmatrix mit daraus folgender Anschwellung der Mitochondrien und Ruptur der äußeren Membran. Auf diese Weise gelangen proapoptotische Proteine vom mitochondrialen Intermembranraum ins Zytosol [33], [34]. Einer dieser Faktoren ist Cytochrom c, welches die Apoptose über den bereits im Kapitel 2.1.2.1.1 beschriebenen Mechanismus auslöst [20]. Andere Faktoren sind der Apoptosis Inducing Factor (AIF) [35], die Endonuclease "EndoG" [36], Smac/Diablo [37] und Htr/Omi [38].

Der Verlust des $\Delta\psi_m$ und die MPT führen des Weiteren zu einem Verlust der biochemischen Homöostase der Zelle: die ATP-Synthese wird gestoppt, die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH und Glutathion werden oxidiert und ROS werden verstärkt generiert [39], [40]. Die ROS wiederum oxidieren direkt Lipide, Proteine und Nukleinsäuren und treiben somit im Sinne einer positiven Rückkopplung den Verlust des $\Delta\psi$ weiter voran [41]. H_2O_2 (ein relativ stabiles ROS), führt des Weiteren zu einer Aktivierung des redox-sensitiven **Kv1.5** (Untergruppe der spannungsaktivierten Kaliumkanäle: engl. „Potassium Voltage-Gated Channel“ (KV) in der Zellmembran [42]. Dies hat einen Efflux von K^+ -Ionen entlang ihres intrazellulär/extrazellulären Konzentrationsgradienten (145/5 mEq) zur Folge, hier mit dem Resultat einer niedrigeren intrazellulären K^+ -Konzentration. Da sich K^+ -Ionen inhibitorisch auf Caspasen auswirken, entfällt so die durch sie hervorgerufene Hemmung auf die Caspasen, woraufhin die Wahrscheinlichkeit einer Apoptoseinduktion steigt. Dieser Mechanismus wurde in verschiedenen (unter anderem neoplastischen) Zelllinien nachgewiesen [43]–[46].

Auch Cytochrom c führt zu einer Aktivierung von Kv-Kanälen und wirkt somit zusätzlich auf diesem Wege proapoptotisch [46].

Neben der in Kapitel 2.1.2.1.1 genannten Funktion, wurden für **VDAC** (Voltage Dependent Anion Channel) weitere essentielle Bedeutungen für die Regulation der Apoptose beschrieben. Hierbei handelt es sich um das häufigste Protein der äußeren Mitochondrienmembran. Die Familie der VDAC besteht aus 3 Isoformen, VDAC1, VDAC2 und VDAC3, deren Rolle für den Zelltod facettenreich und komplex sind (z. B. [47]–[49]). So konnte ein Cytochrom-c-Efflux aus Mitochondrien durch Bildung von Porinen, bestehend aus VDAC und Bax/Bak [50] und auch durch Bildung von Dimeren und höheren Ordnungen an Oligomeren von VDAC [51], nachgewiesen werden. Die Bildung von VDAC-abhängigen Porinen kann zum Beispiel durch mROS (in Mitochondrien entstandene ROS) stimuliert werden [52].

Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und BclxL haben auch Einfluss auf VDAC und üben ihre antiapoptotische Wirkung u. a. über eine Bindung und Hemmung an VDAC1 aus [53]. Auf der anderen Seite wirkt eine Blockierung von VDAC1 durch verschiedene andere Metabolite (z. B. das Phosphothiorat-Oligonukleotid „G3139“ [54] oder Avicine [55]) proapoptotisch, was die komplexe und eine noch nicht vollends verstandene Funktion der VDAC unterstreicht.

2.1.2.2 Ausführungsphase/ Caspase- Kaskade

Caspase 8 und Caspase 9 als Endprodukt des extrinsischen bzw. intrinsischen Signalweges spalten/ aktivieren die sogenannte Effektorcaspase 3, welche wiederum die Effektorcaspasen 6 und 7 aktiviert. Diese proteolytischen Enzyme sind selbst am Abbau einiger Zellbestandteile, z. B. von Lamin (Zellkernmembran) und Actin (Zytoskelett) beteiligt, aktivieren aber auch sekundäre Zielproteine. Zu diesen zählen die CAD (Caspase aktivierte DNase) und andere Caspasen (s. Überblick bei [15]). Diese Abbauvorgänge führen dazu, dass die Zelle schließlich durch Phagozyten als apoptotisch erkannt und nach Phagozytose weiter abgebaut wird, wodurch die Einzelbausteine dem Organismus wieder zur Verfügung gestellt werden [56].

2.1.2.3 Unterdrückung der Apoptose

Wie bereits beschrieben, kann die Apoptose “aktiv”, z. B. Todesrezeptor-, ROS oder p53-vermittelt, ausgelöst werden. Viele der dafür benötigten und viele andere proapoptotische Proteine sind jedoch konstant exprimiert und bereit, auch von sich aus die Apoptose auszulösen, wenn sie nicht durch “Überlebenssignale” daran gehindert werden. Diese können zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Hormone und Nährstoffe sein. Sie stimulieren die Expression und/oder Aktivierung antiapoptotischer, regulatorisch wirkender Moleküle und unterdrücken so die Aktivierung proapoptotischer Faktoren [57], [58]. Von zentraler Bedeutung hinsichtlich einer Unterdrückung der Apoptose sind die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie (Bcl-2 und Bcl-xL) und die IAPs (Inhibitor-Of-Apoptosis Proteins). Ein wichtiges Überlebenssignal für eine Steigerung der Expressionsrate von IAP ist z. B. der Transkriptionsfaktor NF-kB [20]. Ein für die

Onkologie besonders bedeutsames IAP ist **Survivin**, welches im Abschnitt 2.2.1 näher erläutert wird. Neben den Mitochondrien und dem Nucleus wurden auch andere Organellen beschrieben, wie z. B. das endoplasmatische Retikulum und Lysosomen, welche in dem Netzwerk noch nicht vollständig aufgeklärter, fein regulierter Interaktionen zwischen einer Vielzahl von pro- und antiapoptotischen Faktoren Einfluss nehmen [20], [21].

2.2 Mechanismen der Apoptoseresistenz in neoplastischen Zellen

Der essentiellen Eigenschaft neoplastischer Zelllinien trotz Mutationen überlebensfähig zu sein, liegt eine Änderung des bereits beschriebenen fein regulierten Gleichgewichts pro- und antiapoptotischer Faktoren zugunsten einer antiapoptotischen Stoffwechsellage zugrunde. Diese kann verschiedene Ursachen haben:

2.2.1 Erhöhte Expression antiapoptotischer Faktoren

Die Beeinflussung des beschriebenen Gleichgewichts im Sinne einer antiapoptotischen Stoffwechsellage kann u. a. durch eine erhöhte Konzentration antiapoptotischer Faktoren erreicht werden. Beschrieben ist dies beispielsweise für das Protein **Survivin** [59], welches physiologisch hauptsächlich in der Embryonalentwicklung (für die korrekte Weitergabe der Chromosomen während der Zellteilung) eine Rolle spielt und somit in diesem Entwicklungsstadium vermehrt exprimiert wird. Nach der Embryonalentwicklung wird es lediglich auf niedrigem Level und auch nur in wenigen normal proliferierenden nicht-neoplastischen Zellen exprimiert [60]. Die meisten adulten wie pädiatrischen neoplastischen Zellen hingegen weisen hohe Survivin-Expressionsraten auf [59], [60]. Dies ist durch dessen antiapoptotische Wirkung zu erklären: Es antagonisiert den mitochondrien-abhängigen, intrinsischen Apoptoseweg über eine Hemmung der Bindung von Procaspase 9 an APAF1 (siehe Kap. 2.1.2.1.1) [61]. Somit kann die aktive Caspase 9 nicht gebildet werden und eine Apoptose ist über den intrinsischen Signalweg nicht zu induzieren. Da eine Korrelation der Konzentration an Survivin mit dem klinischen Stadium, dem histologischen Grad, dem invasiven Verhalten und der Überlebensrate für viele Neoplasien nachgewiesen wurde [60], [62], [63], ist davon auszugehen, dass die Überexpression von Survivin als Mechanismus für die Apoptoseresistenz sehr entscheidend ist.

Auch für den Transkriptionsfaktor HIF-1 α wurde eine erhöhte Exprimierung in Tumorzellklonen von Erwachsenen mit hepatozellulärem Karzinom sowie Lungen- und Brust-Krebs nachgewiesen, welche eine negative Korrelation mit der Prognose der jeweiligen Erkrankung

aufwies [64], [65]. In physiologischen Verhältnissen ermöglicht dieser Transkriptionsfaktor das Überleben der Zellen bei hypoxischen Verhältnissen durch eine Stimulierung der Expression

- pro-angiogener Chemokine, wie z. B. „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) und „Stromal-Derived-Factor 1“ (SDF1) [66], [67]
- des Glukose-Transporters-1 (GLUT1) [68]
- glykolytischer Enzyme (wie die Phosphofruktokinase-1 [PFK1] und die Aldolase) [68] und
- hämatopoetischer Faktoren, wie Transferrin [69] und Erythropoetin [70]

Außerdem induziert es die **PDK** [71], (s. auch Kapitel 2.2.3), welches in einer Entkopplung der Mitochondrien vom Metabolismus der Zelle und damit in einer Hemmung der sauerstoffabhängigen oxidativen Phosphorylierung resultiert (vgl. Kapitel 2.1.1.2.1). Diese Eigenschaften stellen für neoplastische Zellen insofern essentielle Faktoren dar, als dass durch die Entkopplung des Stoffwechsels von den Mitochondrien der Warburg-Effekt induziert wird (s. Kapitel 2.2.3), der daraus folgende Mehrbedarf an Glukose gedeckt wird und die Angiogenese bei diesen schnell proliferierenden Zellverbänden gewährleistet wird.

Überdies wurde eine Überexpression, des bereits in Kapitel 2.1.2.1.2 ausführlicher behandelten **VDAC1** in verschiedenen neoplastischen pädiatrischen sowie adulten Zelllinien festgestellt [49]. Eine erhöhte VDAC1-Expressionsrate in resezierten NSCL-Tumorzellklonen korrelierte zudem negativ mit dem „Outcome“ der Prognose bei erwachsenen Patienten mit der entsprechenden Erkrankung [72]. Ein weiteres Beispiel eines vermehrt exprimierten antiapoptischen Proteins in neoplastischen Zellen stellt die Pyruvat-Kinase, Isoform M2, (**PKM2**) dar, auf welche in Kapitel 2.2.3.2 differenziert eingegangen wird.

2.2.2 Verminderte Expression proapoptischer Faktoren

Eine Apoptoseresistenz kann auch von einer verminderten Expression bestimmter Genprodukte herrühren. Hierzu sei exemplarisch eine verminderte Expression des bereits unter Kapitel 2.1.2.3 beschriebenen **Kv1.5** („Potassium Voltage-Gated Channel“) genannt, welches in einigen adulten neoplastischen Zelllinien [2] sowie resezierten Glioblastom-Zellklonen [73] nachgewiesen wurde. Diese führt zu einem verminderten Efflux von K^+ -Ionen, was zu einer vermehrten Hemmung der Caspasen führt (vgl. Kap. 2.1.2.1.2). Hier ist jedoch anzumerken, dass in vielen anderen neoplastischen Zelllinien auch eine Überexpression von Kv1.5 nachgewiesen wurde [74].

2.2.3 Der Warburg-Effekt/ neoplastische aerobe Glykolyse

Wie bereits in Kapitel 2.1.1.1 genannt, bedeutet der „Warburg-Effekt“ die Eigenschaft neoplastischer Zellen trotz Vorhandensein von Mitochondrien und Sauerstoff ATP primär durch den Vorgang der anaeroben Glykolyse (also unter Bildung von Lactat, s. Kap. 2.1.1.1) zu synthetisieren. Für den Warburg Effekt sind verschiedene Ursachen beschrieben:

2.2.3.1 Erhöhte Expression der PDK

Eine vermehrte Expression der PDK führt zu einer forcierten Phosphorylierung der PDH welche danach gehäuft im inaktiven Zustand verharrt (vgl. Kap. 2.1.1.2.1). Das Produkt der Glykolyse, das Pyruvat, wird durch die PDH in geringerem Grad zu Acetyl-CoA decarboxyliert und der Energiemetabolismus läuft, vom Mitochondrium entkoppelt, primär glykolytisch ab.

Wie bereits unter „2.1.1.3 Oxidative Phosphorylierung“ beschrieben, ist die ausschließliche Glykolyse im Vergleich zum vollständigen Abbau der Glukose zu CO₂ relativ ineffizient. Um für den Stoffwechsel der stark proliferierenden neoplastischen Zellen dennoch eine ausreichende ATP-Synthese zu gewährleisten, geht der Warburg-Effekt in der Evolution der Karzinogenese mit einer erhöhten Expression glykolytischer Enzyme und einer stark erhöhten Umsatzrate von Glukose einher.

Letzteres ist Grundlage für die Diagnostik primärer und sekundärer Karzinome durch die Fluordesoxyglukose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET). Die Sensitivität, gemittelt für alle onkologischen Anwendungen wird auf 84% geschätzt, die Spezifität auf 88% [75]. Es konnte eine hoch negative Korrelation zwischen einer erhöhten FDG-Aufnahme mit dem Outcome bei Patienten mit u. a. Ösophagus-, Kolorektal- und Zervix-Karzinomen sowie NSCLC, Lymphomen, Brust-Neoplasien und Sarkomen festgestellt werden [75], [76]. Analog zeigte sich eine ebenfalls negative Korrelation zwischen der Laktatkonzentration in Tumorzellknoten aus Biopsien von Kopf-Hals- [77] sowie Zervix- Karzinomen [78] mit der Prognose der jeweiligen Patienten. Des Weiteren besteht eine signifikante Korrelation zwischen einer Reduktion des FDG-PET-Signals mit einem verlängerten Überleben und anderen klinischen Endpunkten (nachgewiesen in Lymphomen, NSCLC und Ösophaguskarzinomen) [76].

Dies gibt einen Hinweis auf die grundlegende Bedeutung des Warburg-Effektes für neoplastische Zellen, wobei die Gründe für die Selektion dieses Effektes gleich auf mehreren Ebenen gefunden wurden. So folgen daraus:

1. Eine erhöhte Apoptoseresistenz infolge einer Entkopplung des Stoffwechsels von den Mitochondrien: Aufgrund des fehlenden Umsatzes von Pyruvat zum Acetyl-CoA wird den Mitochondrien die Grundlage für die Teilnahme am Energiestoffwechsel genommen, welches

- ihre Funktion einschränkt. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Mitochondrien und einer verminderten Produktion von mROS (Mitochondrial Reactive Oxygen Species). Beides ergibt eine Erhöhung der Öffnungsschwelle der MPTP, welches in einen reduzierten Efflux von proapoptotischen Mediatoren aus den Mitochondrien resultiert (vgl. Kap. 2.1.1) [79]–[82].
2. Eine erhöhte Apoptoseresistenz infolge erhöhter Expression antiapoptotischer glykolytischer Enzyme: Für einige der vermehrt exprimierten glykolytischen Enzyme wurden antiapoptotische Eigenschaften nachgewiesen. Dies betrifft beispielsweise die Hexokinase2, eine der vier bereits in Kapitel 2.1.1.1 genannten Isoformen der Hexokinase. Neben der dort beschriebenen Funktion wurde für diese Isoform auch eine Translokation zur MPTP und eine Hemmung dieses Transporters mit der Folge einer Unterdrückung der Apoptose beschrieben [83], [84].
 3. Eine Erhöhung des metastatischen Potentials: Das bei der aeroben Glykolyse anfallende Lactat führt zu einer “Microenvironmental Acidosis”, also einem die betroffenen Zellen umgebenden sauren Milieu. Dies ist toxisch für nicht-säureresistente Zellen und stellt somit einen positiven Selektionsfaktor für säureresistente Zellen dar. Außerdem führt dies zu einer Zerstörung der extrazellulären Matrix mit daraus folgender Erleichterung der Zellmobilität mit der Folge einer Erhöhung des metastatischen Potentials [85]. Die Säureresistenz neoplastischer Zelllinien wird durch eine gleichzeitig vermehrte Expression verschiedener H^+ -Transporter gewährleistet, wie z. B. H^+ -ATPasen [86] und Na^+H^+ -Antiporter [87], [88].
 4. Eine erhöhte Konzentration von essentiellen Substraten für die Proliferation: Als Folge der ausbleibenden Oxidation des Pyruvats im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung sind dieses und andere Metabolite der Glykolyse vermehrt für anabole Stoffwechselwege verfügbar [19], [89]. So wird Glukose u. a. in zunehmendem Maße über den Pentosephosphatweg metabolisiert, welcher eine wichtige Quelle von Metaboliten für die Nukleinsäuresynthese und die Synthese von Reduktionsäquivalenten (u. a. NADPH) zum Neutralisieren von ROS darstellt [90], [91].

2.2.3.2 Erhöhte Expression der PKM2

Eine Überexpression der **PKM2** ist ein weiterer Mechanismus, welcher einen Warburg-Effekt bedingt. Hierbei handelt es sich um eine der vier Isoformen der Pyruvatkinase (PKM1, PKM2, PKL und PKR), welche den letzten Schritt der Glykolyse katalysiert (vgl. Kap. 2.1.1.1). Die PKM2 wird physiologischer Weise in vielen verschiedenen differenzierten Zellen, wie beispielsweise in Lunge, Fett, Retina und Pankreasinseln als auch in allen Zellen mit erhöhter Nukleinsäuresynthese, z. B. embryonalen Zellen, exprimiert [92]–[97]. Insgesamt wird diese in nicht-neoplastischen Geweben jedoch bevorzugt in Zellen embryonalen Ursprungs exprimiert,

während adulte Zellen zumeist eine verhältnismäßig höhere PKM1-Expressionsrate aufweisen [98]. Unabhängig vom Ursprungsgewebe weisen neoplastische Zellen gleichfalls eine erhöhte Expression der PKM2 auf. Es konnte gezeigt werden, dass diese Expression unter der Kontrolle des Proto-Onkogenes ras und den Transkriptionsfaktoren HIF-1 (s. Kap.2.2.1) sowie SP1 und SP3 steht [99].

In Abhängigkeit von der Stoffwechsellage (bspw. intrazellulärer Konzentration von Fruktose-1,6-bisphosphat, L-Serin, und anderen Aminosäuren sowie gesättigten und ungesättigten Fettsäuren) oszilliert die PKM2 zwischen einer hoch-aktiven Tetramer-Form, bestehend aus 4 identischen Untereinheiten, und einer fast-inaktiven Dimer-Form. In neoplastischen Zellen liegt immer vorwiegend die fast-inaktive Dimer-Form vor, weshalb diese den Beinamen „Tumor-PKM2“ trägt [99]. Als Ursache hierfür wurde eine direkte Interaktion der PKM2 mit verschiedenen Onkoproteinen (bspw. pp60^{v-src}, E7) beschrieben [99].

Die Selektion neoplastischer Zellen mit vorherrschender „Tumor-PKM2“ hat ähnliche Gründe wie die bereits bei der Hemmung der PDH genannten:

- Durch die verminderte katalytische Effizienz der Dimer-Form akkumulieren die in der Glykolyse davor stehenden Phosphometabolite und sind somit als Vorstufen für die Nukleinsäure-, Aminosäuren- und Phospholipidsynthese, welche alle von der Glykolyse abzweigen, in höherer Konzentration vorhanden [100]–[102].
- Auch die erhöhte Konzentration einiger antiapoptotischer glykolytischer Enzyme und die Entkopplung des Energiemetabolismus von den Mitochondrien führen hier zu einer erhöhten Apoptoseresistenz (s. o.).

Eine erhöhte Zellmigration von Colon- und Magenkarzinom-Zelllinien, erhöhte Konzentrationen des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL in Magenkarzinom-Zelllinien, wie auch eine verstärkte Zellinvasion durch Gallengangs-Karzinome bei einer erhöhten PKM2-Expressionsrate wurden ebenfalls ermittelt [103]–[106]. Immunhistologische Studien verschiedener Neoplasien mit monoklonalen Antikörpern gegen die Dimer-Form der PKM2 zeigten eine heterogene Verteilung der „Tumor-PKM2“ in Primärkarzinomen, während alle ihre Metastasen hingegen durch homogen hohe Konzentrationen davon charakterisiert sind [107], [108]. Dies legt eine große Bedeutung dieser Eigenschaft in der Karzinogenese nahe.

2.3 Neoplastische Erkrankungen in der Pädiatrie

Im Jahr 2012 erkrankten laut dem „Deutschen Kinderkrebsregister“ 1685 Patienten im Alter von unter 15 Jahren an einer malignen Erkrankung oder einem benignen Hirntumor. Dies entspricht

einer Inzidenz von 15,9/100.000. Trotz großer Erfolge in der Therapie allein in den letzten 15 Jahren (Anstieg der 5 Jahres-Überlebensrate von 71 % im Jahre 1997 [109] auf 84% im Jahre 2012 [110]), stellen diese Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache der Kinder dieser Altersgruppe dar. Die Pathogenese maligner Erkrankungen in der Pädiatrie unterscheidet sich meist grundlegend von derjenigen in der Erwachsenenheilkunde. Dies spiegelt sich auch in der Verteilung der verschiedenen Entitäten wider. So ist die häufigste Neoplasie in der Pädiatrie die Leukämie (33,8%), gefolgt von ZNS-Tumoren (21%) und Lymphomen (11,1%). Auch die Entstehung von Malignomen aus embryonalem Ursprungsgewebe (wie Neuroblastome, Retinoblastome, Hepatoblastome, Nephroblastome, Medulloblastome, embryonale Rhabdomyosarkome) und Keimzellen ist hier im Vergleich zur Erwachsenen-Onkologie wesentlich häufiger [110]. Karzinome haben in der Pädiatrie mit einem Anteil von weniger als 2 % nur einen geringen Stellenwert [111]. Dies steht im großen Gegensatz zur Erwachsenenonkologie, bei welcher Karzinome über 90 % aller Neoplasien ausmachen. Auch bestehen divergierende pharmakokinetische und -dynamische Parameter zwischen diesen beiden Patientenkollektiven [112]. Angesichts dessen wird erkennbar, dass zur Behandlung von Kindern mit neoplastischen Erkrankungen spezifisch pädiatrisch-onkologisch fundierte Forschung notwendig ist.

2.4 Dichloracetat (DCA)

Eine Auswahl an Studien im Hinblick auf die erst jüngst entdeckten neoplasie-spezifischen Effekte von DCA wurde im ersten Abschnitt dieses Kapitels genannt. Doch bereits seit 1978 [113] wurden zahlreiche Arbeiten mit sowohl oraler als auch parenteraler Gabe von DCA an Menschen veröffentlicht. Bis zu der Arbeit von Bonnet et al. (2007) [2] wurde diese Substanz jedoch ausschließlich hinsichtlich der Behandlung nicht-neoplastischer Erkrankungen evaluiert. Indikationen waren erworbene [114]–[116] oder angeborene [113], [117]–[123] Defekte des mitochondriellen Metabolismus. Auch wenn Erfahrungen mit diesem Medikament in Bezug auf die Therapie neoplastischer Erkrankungen am Menschen in vivo noch sehr gering sind, kann daher auf einen Wissensschatz hinsichtlich seiner Pharmakodynamik, Pharmakokinetik und unerwünschter Arzneimittelwirkungen zurückgegriffen werden.

2.4.1 Wirkungsmechanismus

Wie auch bei anderen Zytostatika beruht das Prinzip der antineoplastischen Wirkung auf einer Induktion der Apoptose. Bei DCA geschieht dies bewiesenermaßen spezifisch durch eine Reversion des Metabolismus neoplastischer Zellen zurück zum Stoffwechsel nicht-neoplastischer

Zellen. Wie bereits in Kapitel 2.2.3 beschrieben ist ein wichtiger Faktor für diesen abweichenden Metabolismus eine erhöhte Expression der PDK mit der Folge einer Entkopplung der Mitochondrien vom Stoffwechsel. Dies bedeutet einen Verlust der Einflussnahme der Mitochondrien, deren Folgen im Hinblick auf die Apoptose-Resistenz und Erhöhung des metastatischen Potentials bereits behandelt wurden.

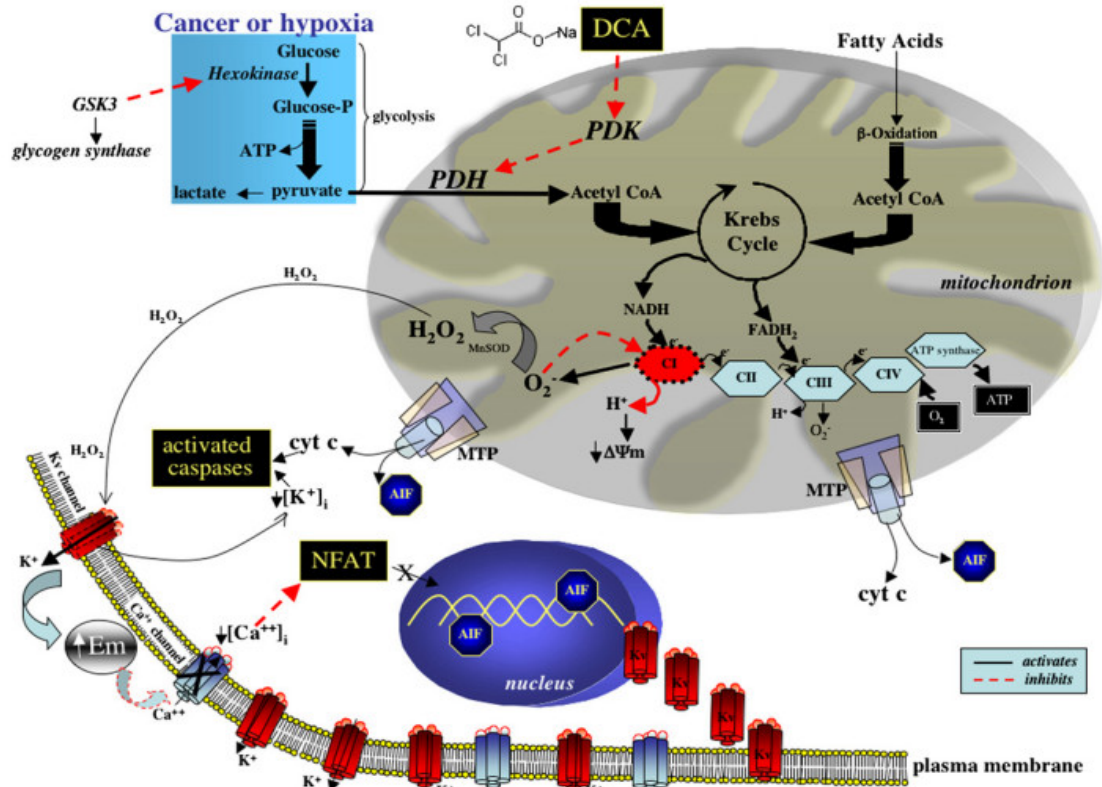


Abbildung 2.2: Wirkmechanismus von DCA; AIF: Apoptosis inducing Factors, Em: Plasma-membrane Potential, NFAT: Nuclear Factor of Activated T-Lymphocytes, Kv: Potassium Voltage-Gated Channel
Quelle: [2] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier

Die Rückführung vom neoplastischen zum physiologischen Stoffwechsel durch DCA beruht auf einer spezifischen Hemmung der PDK2 [17], [124]. Die Inhibition dieses Enzyms führt, wie in Kapitel 2.1.1.2.1 beschrieben, zu einer verminderten Hemmung der PDH. Aus der sich daraus ergebenden Aktivitätssteigerung der PDH folgt wiederum eine vermehrte Umsetzung des Pyruvats zu Acetyl-CoA und dieses wiederum aktiviert durch Substratinduktion den Citratzyklus. Hierdurch wird die oxidative Phosphorylierung stimuliert (siehe Kapitel 2.1.1.3). Das wiederum steigert die Produktion von mROS [125], welche

- **VDAC** aktivieren (Kapitel 2.1.2.1.2). Dies resultiert in einem Efflux des proapoptotischen Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol.
- den Redox-sensitiven Komplex 1 der Atmungskette schädigen, was zu einem Efflux von Protonen führt [2]. Dies ergibt eine Reduktion des (bei neoplastischen Zellen

hyperpolarisierten) Transmembranpotentials über der inneren Mitochondrienmembran ($\Delta\Psi_m$, s. Kap. 2.1.2.1.2), welches die Öffnungsschwelle der MPTP wieder senkt (vgl. Kap. 2.2.3). Daraus folgt ein Efflux von proapoptotischen Faktoren (u. a. AIF und Cytochrom c; s. Kapitel 2.1.2.1.2 sowie Abbildung 2.2),

- die Hemmung der Apoptose durch Aktivierung der Caspasen infolge einer Aktivierung von Kv1.5 aufheben (s. Kapitel 2.1.2.1.2, vgl. Abbildung 2.2),
- die Aktivität von p53 steigern (nachgewiesen in SCLC-, Mammakarzinom- und T-Zell-Lymphomzelllinien; [126], [127]). Da p53 selber die PDK2-Expression hemmt [128], besteht hier somit eine positive Rückkopplung.

Der Efflux von Cytochrom c bewirkt eine Induktion der Apoptose über eine Aktivierung der Caspase-Kaskade (vgl. Kap.2.1.2.1.1). Des Weiteren führt es ebenso wie die mROS zu einer Aktivierung der Kv1.5 (s. Kap. 2.1.2.1.2).

Letzteres initiiert einen weiteren sich selbst verstärkenden Mechanismus: Der durch eine Aktivierung dieses Kanals erhöhte Efflux von K^+ -Ionen führt zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran (E_m), wodurch ein spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Einstrom inhibiert wird. Die erniedrigte Calciumkonzentration unterdrückt die tonische Aktivierung von Nuclear Factor of Activated T-Lymphocytes (NFAT), was auf diese Weise in deren Entfernung vom Nucleus resultiert. Daraus ergibt sich eine erhöhte Expression von Kv1.5 (in Abbildung 2.2 lediglich als Kv bezeichnet) [2].

Nicht nur die Aktivierung der Oxidativen Phosphorylierung, sondern auch schon die Aktivierung des Citratzyklus hat eine bedeutende proapoptotische Wirkung: Durch die Aktivitätssteigerung der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH, ein Enzym des Citratzyklus) wird vermehrt α -Ketoglutarat (α KG) synthetisiert, welches aus den Mitochondrien diffundieren kann und einen wichtigen Kofaktor der Prolyl-Hydroxylase darstellt. Letztere wiederum destabilisiert den Transkriptionsfaktor HIF1 α ² und führt somit zu einer Abnahme der Konzentration dieses Faktors [129]. So konnte nach DCA-Applikation eine Zunahme der IDH-Aktivität und der Konzentration von α KG in SCLC-, Mamma-Karzinom- und Glioblastomzelllinien nachgewiesen werden [9], [126]. Auch eine Abnahme der Aktivität von HIF1 α mit der Folge verminderter Tumor-Angiogenese, Tumorperfusion, Glukoseaufnahme, Tumorgroße und verlängertem Versuchstierüberleben nach DCA-Gabe wurde dokumentiert [126]. Die Transkription von HIF1 α wird direkt durch (das mittels DCA aktivierte) p53 gehemmt und dessen Abbau stimuliert [126], [130], [131], sodass DCA auf zwei Wegen in dieses System eingreift.

² zur Vergegenwärtigung der Bedeutung dieses wichtigen Transkriptionsfaktors für die Proliferation und Apoptoseresistenz neoplastischer Zellen siehe Kapitel 2.2.1

Die DCA-bedingte verringerte Bedeutung der Glykolyse für den Energie-Stoffwechsel der Zellen geht durch verminderten Metabolismus über den Pentosephosphatweg ebenfalls mit einer Normalisierung der Expression antiapoptotischer glykolytischer Proteine und Konzentration von essentiellen Substraten für die Proliferation einher (vgl. Kap. 2.2.3).

Die DCA-bedingte Rückführung des Metabolismus von aerober Glykolyse zu oxidativer Phosphorylierung können nicht-invasiv und prospektiv durch die PET verfolgt werden (vgl. a. Kapitel 2.2.3). Solche direkten metabolischen Wirkungsnachweise besitzen das Potential, einen Paradigmenwechsel experimenteller Therapien in der Onkologie herbeizuführen [132].

2.4.2 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

DCA ist mit 150 Da ein kleines Molekül, welches Zellmembranen penetriert und sogar die Blut-Hirnschranke überwindet. Dies ermöglicht im Vergleich zu den meisten konventionellen Chemotherapeutika auch die Therapie intrakranieller Malignome durch perorale Gabe [9]. Die Absorption erfolgt schnell, sodass die Hemmung der PDK bzw. die Aktivierung der PDH bereits wenige Minuten nach der Gabe erfolgt. Diese erfolgt dosisabhängig bei Konzentrationen von 10-250 $\mu\text{mol/l}$ [124].

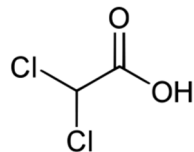


Abbildung 2.3: DCA (selbst erstellt)

Bei einer oralen Dosis von 6,25 mg/kg Körpergewicht, 2 Mal täglich, für 3 Monate wurde bei den genannten mit DCA behandelten Glioblastompatienten ein Talspiegel von etwa $0,44 \pm 0,16$ mmol/l (mean \pm SD; n = 4) erreicht [9]. Diese Werte ähneln denjenigen, welche auch bei der chronischen DCA-Therapie bei Erwachsenen mit Mitochondriendefekten gemessen wurden [133]) und liegen im Bereich der Inhibitionskonstante von DCA für die PDK2 (0,2 mmol/l), welche die sensibelste der vier in Kap. 2.1.1.2.1 genannten Isoformen der PDK auf DCA darstellt [17]. Der Abbau erfolgt vorwiegend durch die Zeta-1-Isoform der Glutathion-Transferase (GSTZ1), welche den vorletzten Schritt des Tyrosinabbaus katalysiert. Es wird aber auch unverändert durch die Nieren ausgeschieden [134].

Die Halbwertszeit nach 6 Monaten kontinuierlicher Gabe von 25 mg DCA/kg/Tag beträgt bei Kindern (n = 5, Alter: $5,7 \pm 1,8$ Jahre) $6,4 \pm 3,4$ Stunden und bei Erwachsenen (n = 4, Alter: $24,5 \pm 10$ Jahre) $21 \pm 5,8$ Stunden. Dies deutet auf einen stark altersabhängigen Metabolismus hin [134].

2.4.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Die Toleranz gegenüber DCA im Hinblick auf unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) hängt ebenso wie die Halbwertszeit (s. o.) stark vom Alter ab: je älter der Patient, umso höher das Risiko [134]. Eine doppel-blinde, randomisierte, placebo-kontrollierte Cross-over-Studie mit 30 Probanden mit dem durchschnittlichen Eintrittsalter von 30 ± 14 Jahren mit der Indikation einer MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes), wurde wegen des Auftretens symptomatischer, peripherer (nicht-demyelinisierender) Neuropathie bei einer Dosis von 25 mg/ kg KG DCA pro Tag bei 19 der Probanden (15 aus der Verumgruppe und 4 aus der Placebo-Gruppe) abgebrochen. Bei 17 dieser 19 Probanden erfolgte jedoch innerhalb von 9 Monaten nach Einnahmestop eine Remission. Es wurden keine anderen Toxizitäten festgestellt [119]. Eine Dosis-abhängigkeit und überwiegende Reversibilität der nicht-demyelinisierenden peripheren Neuropathie wird allgemein anerkannt [135]. So konnte diese UAW bei den bereits genannten Studien von Michelakis et al. (2010) und Dunbar et al. (2013; Auftreten bei 1 von 15 Probanden) durch eine Dosisminderung von 2 x 12,5 mg/ kg KG auf die Hälfte wieder abgewendet werden.

Positivere Ergebnisse wurden in einer placebo-kontrollierten Doppelblindstudie mit 43 Kindern (Eintrittsalter $5,6 \pm 5$ Jahre), welche an heterogen verursachter kongenitaler Laktatazidose litten, erhoben. Hier zeigte sich auch nach 6 monatiger DCA-Gabe von 2x 12,5 mg/ kg KG/ Tag eine gute Verträglichkeit, ohne Evidenz oder Unterschiede zum Placebo hinsichtlich einer Toxizität für die Leber oder das periphere Nervensystem [118].

Diese Ergebnisse erlauben die Vermutung, dass die höhere Inzidenz des Auftretens von peripherer Neuropathie bei der MELAS-Gruppe zumindest teilweise auf die Folgen der Grunderkrankung zurückzuführen ist, da diese häufig mit Diabetes und folglich auch diabetischer Neuropathie assoziiert ist [135].

2.5 Zielsetzung der Arbeit

2.5.1 Ermittlung von Interaktionen von DCA mit anderen Chemotherapeutika

Wie bereits im ersten Abschnitt dieses Kapitels aufgeführt, ist die antineoplastische Wirkung von DCA durch die Arbeit von Bonnet et al. (2007) [2] in den Fokus der Forschung gerückt und hat dadurch zu zahlreichen weiteren Untersuchungen geführt, welche bei dieser Substanz ebenfalls erwünschte Effekte nachweisen konnten (s. auch Kap. 5).

Es existiert jedoch mit dem Artikel von Heshe et al. (2011) [12] bislang nur eine veröffentlichte Studie, welche gezielt die Effekte von DCA auf pädiatrische neoplastische Zelllinien untersucht

hat. Auch wurden hier zum ersten Mal antagonistische Interaktionen mit anderen konventionellen Zytostatika (Cisplatin, Doxorubicin) beschrieben. Diese Dissertation prüft daher durch entsprechende Interaktionstests die Ergebnisse von Heshe et al. (2011) [12]. Darüber hinaus wurden Etoposid, SN38 und Temozolomid als weitere in der pädiatrischen Onkologie etablierte Zytostatika in diese Tests einbezogen, um ein differenzierteres Bild über die Interaktionen von DCA mit anderen Wirkstoffen zu erheben. Zusätzlich wird durch die Anwendung verschiedener Konzentrationsschemata eine potentielle Abhängigkeit der Effekte von der Konzentration evaluiert.

2.5.2 Ermittlung des Expressionsprofils bestimmter Gene in neoplastischen Zelllinien

Anhand von Expressionsanalysen kann die Bedeutung eines Gens für den Stoffwechsel einer Zelllinie ermittelt werden. In Bezug auf das Überleben neoplastischer Zelllinien gilt folgende Annahme: Hat ein Genprodukt eine antiapoptotische Wirkung, so weist eine starke Überexpression dieses Genproduktes auf eine große Bedeutung von diesem für das Überleben der Zelllinie hin. Im Umkehrschluss erwartet man bei großer Potenz proapoptotischer Genprodukte in neoplastischen Zelllinien eine besonders niedrige Expressionsrate.

Die zwischen der Arbeit von Heshe et al. (2011) [12] und anderen Forschergruppen divergierenden Effekte von DCA auf neoplastische Zelllinien werfen die Frage auf, ob die für adulte Organismen postulierten Wirkmechanismen von DCA auf pädiatrische neoplastische Zelllinien übertragbar sind. Unterschiede im Expressionsprofil relevanter Gene zwischen adulten und pädiatrischen neoplastischen Zelllinien könnten diese Differenzen erklären, ohne die postulierten Mechanismen zwangsläufig in Frage zu stellen und würden einen weiteren Forschungsbedarf hinsichtlich der Wirkung von DCA in pädiatrischen neoplastischen Zelllinien aufzeigen. Für diesen Vergleich wurden die Expressionsanalysen neben 18 pädiatrischen Zelllinien auch an zwei adulten neoplastischen Zelllinien durchgeführt. Um diese Ergebnisse mit physiologischen Expressionsmustern ins Verhältnis setzen zu können, wurde ebenfalls eine nicht-neoplastische embryonale Zelllinie mit in die Untersuchungen einbezogen.

Korrelationsanalysen der jeweiligen Expressionsrate dieser relevanten Gene mit DCA-Zytotoxizitätstests verifizieren, ob diese Gene tatsächlich für die Wirkmechanismen von DCA relevant sind. Entsprechende Korrelationsanalysen mit den anderen in dieser Arbeit verwendeten konventionellen Zytostatika (s. letztes Unterkapitel) prüfen, ob die getesteten Zielgene überhaupt die postulierten Funktionen im Apoptose-Stoffwechsel (unabhängig vom Wirkmechanismus von DCA), im Sinne einer pro- oder antiapoptotischen Wirkung, innehaben.

Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Zielgene begründet sich folgendermaßen:

- Neben der in Kap. 2.1.2.1.2 von mehreren Autoren geschilderten bedeutsamen Rolle der **Kv1.5** für die Apoptoseinduktion in adulten neoplastischen Zelllinien postulierten Bonnet et al. 2007 [2], dass die DCA-vermittelte Erhöhung der Expressionsrate einen wichtigen Wirkmechanismus für die antineoplastischen Effekte von DCA darstellt.
- Wie in Kap. 2.2.3 dargelegt, stellt eine erhöhte Expressionsrate der **PKM2** – ebenso wie diejenige der PDK – einen Mechanismus neoplastischer Zellen für den Warburg-Effekt dar. Anhand der Expressionsanalysen soll die Bedeutung dieses Enzyms in neoplastischen pädiatrischen Zelllinien ermittelt werden.
- Die in Kapitel 2.2.1 genannte **Survivin**-Expressionsrate in den meisten adulten wie pädiatrischen neoplastischen Zellen sowie deren Korrelation mit dem klinischen Stadium, dem histologischen Grad, dem invasiven Verhalten und der Prognose betroffener Patienten macht die Bedeutung der Überexpression von Survivin als Mechanismus für die Apoptoseresistenz deutlich. Es ist daher interessant, wie sich diese Überexpression auf die Resistenz gegenüber den getesteten Substanzen auswirkt.
- Heshe et al. (2011) [12] stellten anhand ihrer Ergebnisse die These auf, dass eine Interaktion von Cisplatin und Doxorubicin mit **VDAC1** an der äußeren Mitochondrienmembran die Ursache für die von ihm beobachteten antagonistischen Effekte der Kombination von DCA mit diesen Substanzen darstellt. Falls auch in dieser Arbeit antagonistische Effekte beobachtet werden sollten, wäre folglich interessant zu analysieren, ob das Ausmaß dieser Effekte mit der Expression von VDAC1 korreliert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Die Tests für die Ermittlung des Expressionsprofils bestimmter Gene wurden an einem Panel von 18 pädiatrischen und zwei adulten neoplastischen Zelllinien sowie einer embryonalen Zelllinie durchgeführt. Die Exemplare des Panels der pädiatrischen Neoplasien entstammen sechs Tumorentitäten und sind im Folgenden alphabetisch nach Entität und Name aufgeführt. Die hier aufgeführten 8 Zelllinien der Entitäten Leukämie, Medulloblastom und Osteosarkom wurden für die Ermittlung des Einflusses von Dichloroacetat auf die Zytotoxizität konventioneller Chemotherapeutika ausgewählt. Die genannten Informationen wurden den Angaben der jeweiligen Vertreiber der Zelllinien sowie den jeweils aufgeführten Quellen entnommen.

3.1.1.1 Ewing-Sarkom-Zelllinien

CADO-ES1

Diese Zelllinie wurde aus dem Pleuraerguss einer 19-jährigen japanischen Frau mit einem Ewing-Sarkom des rechten Os ischii gewonnen, welcher mit multipler pulmonaler Metastasierung einherging. Es handelt sich um kleine, runde und spindelförmige Zellen ohne neuronale Differenzierung, die (semi-)adhärentes, klumpiges Wachstum in Form von Sphäroiden zeigen. CADO-ES1 weist eine t(21,22)-Translokation auf, welche das Fusionstranskript EWS/ERG bedingt. p53 ist hingegen nicht mutiert. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 35 Stunden [[136]–[138].

STA-ET-1

Die Zellen dieser Zelllinie wurden einem peripheren neuroektodermalen Tumor des Humerus eines 13-jährigen Mädchens entnommen. Hier liegt eine Translokation von t(11,22) (q24;q12) vor. p53 ist nicht mutiert. Die Generationszeit beträgt 40,7 Stunden [138], [139].

STA-ET-2.1

Die Zelllinie STA-ET-2.1 entstammt einem primären peripheren neuroektodermalen Tumor der Fibula eines 15-jährigen Jungen. Bei etwa 20% der Zellen zeigt sich eine Expression des für Resistenzen gegen bestimmte toxische Stoffe verantwortlichen P-Glykoproteins. Es lässt sich eine t(11,22)-Translokation mit daraus folgender Fusion “EWS/FLI1”, eine Mutation von p53 und eine Deletion (del(22)(q12)) nachweisen. Die Generationszeit beträgt ca. 60 Stunden [138], [139].

VH-64

VH-64 wurde aus einem Pleuraerguss eines 24-jährigen Mannes gewonnen, welcher multiple pulmonale Metastasen eines metatarsal lokalisierten Ewing-Sarkoms aufwies. Es handelt sich

hierbei um locker angeordnete, runde bis ovale Zellen mit einer Generationszeit von 25,2 Stunden. VH-64 zeichnet sich aus durch eine Translokation $t(11,22)(q24;q12)$ mit daraus resultierendem Fusionstranskript EWS/FLI1. p53 liegt als Wildtyp vor [139], [140].

3.1.1.2 Leukämie-Zelllinien

CCRF-CEM

Diese Zelllinie wurde 1964 aus einem Rezidiv einer T-Zell-ALL eines 3-jährigen Mädchens etabliert. Sie wächst sowohl in Suspension, als auch einschichtig-adhärenz epitheloid. Die Generationszeit beträgt 46 Stunden. p53 ist mutiert [141]–[144].

HL-60

Diese Zellen wurden aus dem Blut einer mit AML-(FAB-M2) erkrankten Frau entnommen. Es handelt sich hierbei um runde Einzelzellen in Suspension mit einer Verdopplungszeit von 25 Stunden. p53 liegt hier mutiert vor [144]–[148].

MOLT4

Diese Zelllinie wurde 1971 aus einem Rezidiv einer ALL eines 19-jährigen Mannes isoliert. Die Zellen erscheinen rund und wachsen in Suspension einzeln oder in Clustern mit einer Generationszeit von ca. 40 Stunden. p53 ist mutiert [144], [149], [150].

REH

Die B-Vorläufer-ALL-Zelllinie REH wurde 1973 bei einem ersten Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie aus dem peripheren Blut eines 15-jährigen nordafrikanischen Mädchens etabliert. Diese runden Zellen liegen einzeln in Suspension vor und benötigen eine Generationszeit von 50-70 Stunden. Es liegt hier eine TEL/AML1-Fusion und ein mutiertes p53 vor. [144], [151].

3.1.1.3 Medulloblastom-Zelllinien

DAOY

DAOY wurde 1985 aus einer Biopsie von einem desmoplastischen Medulloblastom aus der Fossa cerebri posterior eines 4 Jahre alten kaukasischen Jungen gewonnen. Der Primärtumor wies neuronale und gliale Differenzierung auf, welche zum jetzigen Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden können. Die adhärenz wachsenden polygonalen Zellen haben eine Verdopplungszeit von 34 Stunden. p53 ist hierbei mutiert [152]–[154].

UW228.2

UW228 besitzt drei Subklone: UW228.1, UW228.2 und UW228.3. Die in den hier beschriebenen Methoden verwendete Zelllinie UW228.2 wurde aus einem Tumor der posterioren Fossa eines 9-jährigen Mädchens entnommen. Die Zellen wachsen in Zellkultur einschichtig und bilden Kolonien auf Soft-Agar [155].

3.1.1.4 Neuroblastom-Zelllinien

IMR-5

Diese Zelllinie ist ein Subklon von IMR-32, welche von einem abdominalen Neuroblastom eines einjährigen kaukasischen Jungen stammt. Die neuroblasten-ähnlichen adhärennten Zellen wachsen in Kultur einschichtig. Sie weisen eine Amplifikation des Tumormarkers N-Myc (50-100 Kopien) auf, welcher als diagnostischer Parameter für Neuroblastome eine schlechte Prognose darstellt. Außerdem zeigen sie eine Deletion an Chromosom 1 (del 1p36). p53 ist nicht mutiert [156]–[159].

SMS-KCN

SMS-KCN wurde aus einem Tumor eines männlichen Patienten gewonnen. Diese Zelllinie weist ebenfalls eine N-Myc-Amplifikation (100fach) und eine 1p36 Deletion auf. Auch hier liegt p53 nicht-mutiert vor. [160], [161].

SHEP

Hierbei handelt es sich um einen Subklon der Neuroepitheliomzelllinie SK-N-SH, welcher aus einer Biopsie aus dem Knochenmark eines 4-jährigen Mädchens im Jahre 1970 stammt. Im Gegensatz zu IMR-5 und SMS-KCN ist bei SHEP weder eine N-Myc-Amplifikation, noch eine 1p36 Deletion vorhanden. p53 liegt als Wildtyp vor [162]–[166].

SH-SY5Y

SH-SY5Y ist, wie SHEP, eine klonale Sublinie von SK-N-SH. Sie wurde derselben Biopsie wie SHEP entnommen und weist ebenfalls keine 1p36 Deletion, N-Myc-Amplifikation oder ein mutiertes p53 auf. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 55 Stunden [162]–[166].

3.1.1.5 Osteosarkom-Zelllinien

MNNG-HOS

Die Zelllinie HOS wurde aus dem Knochen eines 13-jährigen kaukasischen Mädchens etabliert. Da diese sich zunächst nicht für Zellkultur und In-Vivo-Implantation eignete, hat man sie durch Behandlung mit dem kanzerogenen Nitrosamin MNNG modifiziert, wodurch die Zelllinie MNNG-HOS entstand. Diese hat eine mutierte p53-Variante [138], [167]–[169].

OST

OST entstand durch die Entnahme eines osteoblastischen Osteosarkoms der Diaphyse des linken Femurs eines 15-jährigen Mädchens. Die Zellen sind Telomerase-positiv. p53 ist nicht mutiert [170]–[172].

3.1.1.6 Rhabdomyosarkom-Zelllinien

RD

Diese Zelllinie wurde aus einem embryonalen Rhabdomyosarkom im Becken eines 7 Jahre alten kaukasischen Mädchens gewonnen. p53 weist Mutationen auf [173]–[176].

RH-30

Hierbei handelt es sich um eine aus einer Knochenmarkmetastase eines undifferenzierten alveolären Rhabdomyosarkoms generierte Zelllinie. Sie entstammt einem 17-jährigen Patienten und ist charakterisiert durch Adhärenz, epithelähnlicher Morphologie mit einschichtigem Wachstum und einer Verdopplungszeit von etwa 35 Stunden. p53 ist nicht mutiert. [174], [177]–[179].

3.1.1.7 Adulte neoplastische Zelllinien

HTB-56

HTB-56 entstammt einem anaplastischen Karzinom einer 61-jährigen kaukasischen Frau. Das Ursprungsgewebe ist unbekannt, wahrscheinlich handelte es sich aber um ein Lungenkarzinom [180]–[182].

A549

Diese Zelllinie wurde aus einem humanen Lungen-Adenokarzinom eines 58-jährigen kaukasischen Mannes im Jahre 1972 gewonnen. Die Zellen wachsen adhärent einschichtig mit einer Verdopplungszeit von ca. 40 Stunden [183], [184].

3.1.1.8 Nicht-neoplastische Zelllinie

HEK-293 (Human Embryonic Kidney)

HEK-293 ist eine humane nichtneoplastische Zelllinie aus einer embryonalen Niere und wurde mittels Transfektion von DNS aus dem Adenovirus Typ-5 hergestellt. Sie wächst adhärent, fibroblastoid und einschichtig [185], [186]

3.1.1.9 Anbieter der Zelllinien

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ,
Braunschweig)

CCRF-CEM
MOLT4
REH
HL-60
CADO-ES1
SH-SY5Y
RH-30

ATCC-LGC (Promochem GmbH, Wesel)

DAOY
RD
IMR-5

Professor Dr. C. Poremba (Institut für Pathologie der Universität
Düsseldorf)

SMS-KCN
SHEP
OST
MNNG-HOS

Professor Dr. Dr. M. Frühwald (Universitätsklinikum Münster) mit
freundlicher Genehmigung von Prof. John Silber (Department of
Neurological Surgery, University of Washington, Seattle, USA)

UW228.2

Dr. rer. nat. F. van Valen (Klinik für Orthopädie des
Universitätsklinikums Münster)

STA-ET1
STA-ET2.1
VH-64

3.1.2 Verwendete Substanzen

Cisplatin

TEVA GmbH
Graf-Arco Str. 3, 89079 Ulm, Deutschland
Zul.-Nr.: 71983.00.00

Dichloracetat

Tocris House,
Tocris House, IO Centre, Moorend Farm
Avenue, Bristol, BS11 0QL, UK
Cat. no.: 2755

Doxorubicin

Cell Pharm GmbH
Theodor-Heuss-Str. 52, 61118 Bad Vilbel,
Deutschland
Zul.-Nr.: 44925.02.00

Etoposid

TEVA GmbH
Graf-Arco Str. 3, 89079 Ulm, Deutschland
Zul.-Nr.: 45891.00.00

SN38

Tocris Bioscience
Tocris House, IO Centre, Moorend Farm
Avenue, Bristol, BS11 0QL, UK
Cat. no.: 2684

Temozolomid

Tocris Bioscience
Tocris House, IO Centre, Moorend Farm
Avenue, Bristol, BS11 0QL, UK
Cat. no.: 2706

3.1.3 Einmal-Laborbedarf

FALCON™
conical tube, 15ml

Becton Dickonson Labware,
Franklin Lakes NJ 07417 USA,
REF: 352096, Lot: 9058358

FALCON®
conical tube, 50ml

Becton Dickonson Labware,
Franklin Lakes NJ 07417-1886 USA
REF: 352070, Lot: 8092696

Manufix® sensitive
gloves

B. Braun Melsungen
AG Melsungen, Deutschland
Lot: 4772 0722

Sterile Tissue Culture Flasks <i>25 cm, 50ml, steril</i>	Greiner Bio-One GmbH, 72636 <i>Frickenhausen, Deutschland</i> <i>Lot-No: 09100140</i>
MICROTEST <i>cell culture plate</i>	96 Vertiefungen, Flachboden <i>Becton Dickinson Labware Europe, 38241</i> <i>Meylan Cedex, France</i>
Costar® STERIPETTE® <i>2ml, 5ml, 10ml</i>	Corning Incorporated <i>New York 14831, USA</i>
Standardtips <i>100ul/1000ul</i>	Eppendorf, <i>Hamburg, Gemany</i>
Ritips professional steril <i>0.5ml/1ml/5ml</i>	LOT-No: 5677431-01 <i>Ritter GmbH</i> <i>86830 Schwabmünchen,</i> <i>Deutschland</i>
Biosphere® -Quality tips <i>10, 100, 200ul</i>	SARSTEDT AG & Co. <i>51588 Niimbrecht, Deutschland</i>
Biosphere® -Filter Tips	SARSTEDT AG & Co. <i>51588 Niimbrecht, Deutschland</i>
PVDF Transfer Membrane, <i>0,45um, 10cm x 10 cm sheet</i>	Thermo Scientific <i>Rockford, IL 61101, USA</i>

3.1.4 Lösungen und Reagenzien

1,1-Dimethylbiguanid Hydrochlorid, 97%	SIGMA-ALDRICH“ CHEMIE GmbH <i>89555 Steinheim, Deutschland</i> <i>Cat. No: D</i> <i>15,095-9</i> <i>Lot No: S71557-189</i>
RMPI 1640 mit L-Glutamine	Gibco BRL Life Technologies LTD <i>Paisley, Schottland</i> <i>Lot No: 633592</i>
GIBCO® Foetal Bovine Serum 500ml	Invitrogen™ <i>Paisley, Schottland</i> <i>Cat. No. 10270-106</i> <i>Lot No: 41G5581K</i>
GIBCO® 15240 Antibiotic-Antimycotic 100x	Invitrogen™ <i>Paisley, PA4 9RF, U.K.</i> <i>Cat. No. 15230-062</i> <i>Lot: 490268</i>
Trypsin-EDTA <i>0,5g Trypsin pro Liter</i> <i>0,2g EDTA in D-PBS(1x)</i>	PAA Laboratories GmbH <i>4020 Linz, Österreich</i> <i>Cat. No: L11-004</i> <i>Lot No: L00409</i>

Collagen from rat's tail <i>Collagen Typ I, nativ, 6mg/ml, steril</i>	CELL Concepts GmbH 79224 Umkirch, Deutschland Art.-No: Z-17C03-C
PBS-buffer pH7,4 steril	Apotheke des UKM, Münster, Deutschland Ch.-B.: 080915
Acetic Acid	Mallinckrodt Baker B.V. 7400AA Deventer, Holland Lot No: 060960601
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide <i>approx. 98% TLC</i>	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH D-89555 Steinheim
SDS-Pellets	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe Art.-No: CN30.1
CASY [®] Tonisotonic Saline Solution	Innovatis AG 72764 Reutlingen Lot:491225
Goat Anti-Mouse IgG Antibody (H&L) [HRP], pAb	GenScript USA Inc. Piscataway, NJ 08854, USA
THE [™] Beta Actin Antibody, mAb, Mouse	GenScript USA Inc. Piscataway NJ 08854, USA
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP Antibody	Epitomics, Inc. CA 94010-1303, USA
Kv1.5 Antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas 75220, USA
PKM2 Antibody, Rabbit	Cell Signalling Technology [®] Danvers, MA 01923, USA
Survivin Rabbit Monoclonal Antibody	Epitomics, Inc. CA 94010-1303, USA
VDAC1 Antibody, pAB, Rabbit	GenScript USA Inc. Piscataway, NJ 08854, USA
Comolete mini <i>Protease Inhibitor Cocktailtablets</i>	Roche Diagnostics Mannheim, Deutschland
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)	Millipore Billerica, MA 01821, USA
Proben für die qRT-PCR <i>KCNA5 (Kv1.5): Hs00266898_s1</i> <i>PKM2: Hs00762869_s1</i> <i>BIRC5 (Survivin): Hs 04194392_s1</i> <i>VDAC1:Hs01631624_gH</i> <i>GAPDH: 4333764T</i>	Life Technologies GmbH Frankfurter Straße 129B, 64293Darmstadt, Germany

NP40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89555 Steinheim, Deutschland
Isotone NaCl-Lsg. 0,9%	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Desoxychol Natriumsalz	Carl-Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol for Electrophoresis >=98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89555 Steihheim, Deutschland
TRIS Ultra Qualität	Carl-Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
HPLC water Baker HPLC Analysed	J.T. BAKER Deventer, Holland
30% Acrylamid/Bis-solution, 29:1 (3,3% <i>c</i>)	BIO-RAD D-80901 München
Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
TEMED	BIO-RAD, D-80901 München
HCl 1mol/l - 1N Lsg	Carl-Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
40% Glycerin	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Glycin	Carl-Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Fluka Chemie AG Buchs, Schweiz
Milchpulver	Carl-Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89555 Steinheim, Deutschland
Precision Plus Protein™ WesternC™ Standard Dual Color	BIO-RAD D-80901 München
Precision Plus Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate	BIO-RAD D-80901 München
Bromphenol Blau	

3.1.5 Technische Geräte

Multiscan Ascent <i>Mikrotiterplatten-Photometer</i>	Thermo Labsystems, Finnland
Leica DM IL LED <i>Mikroskop</i>	Leica Microsystems CMS GmbH 35578 Wetzlar, Deutschland
Hera Safe HSP 12 <i>Laminar Air Flow Clean Bench</i>	Heraeus Instruments 63450 Harnau, Deutschland
Accu-jet® pro <i>Pipetting Unit</i>	BRAND GMBH & Co KG 97861 Wertheim, Deutschland
CASY® Model TTC	Cell Counter & Analyser-System Innovatis AG 72764 Reutlingen, Deutschland
Vacuum Pump Unit BVC Z1	VACUUBRAND GmbH & Co KG 97877 Wertheim, Deutschland
Megafuge 1.0 <i>Zentrifuge</i>	Heraeus Sepatech GmbH 3360 Osterode, Deutschland
Centrifuge 5417 R	Eppendorf Hamburg, Deutschland
SANYO CO ₂ Incubator	Modell: MCO-18AIC SANYO Electric Biomedical Co, Ltd Japan
Vortex Genie 2™	BENDER & HOBEIN AG Zürich, Schweiz
Eppendorf Reference <i>10-100pl/100-1000ul</i>	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Multipette Plus	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Bio Photometer <i>RNA- Messgerät</i>	Eppendorf Hamburg, Deutschland
ABI Prism 7700 Sequence Detection System <i>Real-time-PCR-Gerät</i>	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH Darmstadt
TRANS-BLOT SD <i>DNA/RNA Blotting Kit</i>	BIO-RAD D-80901 München
Power Pac™ HC <i>250V, 3.0A, BOOW</i>	BIO-RAD D-80901 München
Mini-Protean® Tetra Cell <i>Kit for gel electrophoresis</i>	BIO-RAD D-80901 München

Thermomixer Comfort

Eppendorf
Hamburg, Deutschland

Cool SNAP HQ²

Photometrics®
Tucson AZ 85796, USA

TECAN GENESIS 150 Robotic

Tecan Deutschland GmbH
Crailsheim, Deutschland

3.1.6 Verwendete Software

Microsoft® Excel

Microsoft Office 2013
*Microsoft Deutschland GmbH,
85716 Unterschleißheim, Germany*

Sigma Plot 11.0

SYSTAT Software Inc.
Chicago, IL 60606, USA

Gel Pro Analyser 6.0

Media Cybernetics, Inc.
Bethesda, MD 20814-441, USA

Sequence Detektor Software, SDS2.2

Applied Biosystems
Foster City, CA 94404, USA

3.1.7 Sonstige Hilfsmittel

QIAamp RNA-Isolation-Kit
+ RNase-Free DNase Set

QIAGEN Hilden, Germany

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits

Applied Biosystems
Foster City, CA 94404 USA

TaqMan® Gene Expression Assay

Applied Biosystems
Foster City, CA 94404 USA

Pierce® BCA Protein Assay Kit

Thermo Scientific
Rockford, IL 61105 USA

3.2 Methoden

3.2.1 Auswahl der Substanzen und Konzentrationen

Wie bereits in der Einleitung ausführlich abgehandelt, beruht die Wirkung von DCA unter anderem in einer Wiederherstellung der Fähigkeit einer intrinsischen Apoptoseinduktion in neoplastischen Zellen. Somit ergeben sich Erwartungen auf additive oder gar synergistische Effekte im Hinblick auf eine Kombination von DCA mit Substanzen, welche ihre Wirkung über diesen Mechanismus ausüben. Dies wurde bestätigt durch die Beobachtung synergistischer zytotoxischer Effekte durch eine Kombination von DCA mit dem p53-Aktivator Nutlin-3 in Zelllinien chronischer B-Lymphozyten-Leukämie [187]. Auch eine pathologische Veränderung

der DNA induziert, zumindest unter physiologischen Verhältnissen, den intrinsischen Weg der Apoptose. Synergistische antiproliferative Effekte und eine verstärkte Apoptoseinduktion wurden somit auch durch Kombination von DCA mit dem Pyrimidinbasenanalogon 5-Fluorouracil (inhibiert die DNA- und RNA-Synthese) in vier Zelllinien von kolorektalen Karzinomen ermittelt [188]. Gleichsam erhöhte die zusätzliche Gabe von DCA zu Capecitabin (Prodrug von 5-Fluorouracil) die antineoplastischen Effekte dieses Wirkstoffes durch eine erhöhte Apoptoserate in einem Maus-B-16-Melanom-Allograft und humanen NSCLC-Xenograft (A549) [189].

Eine Induktion der intrinsischen Apoptose erfolgt ebenfalls durch die beiden folgenden konventionellen Zytostatika:

- Cisplatin: Platiniert die DNA, führt zu einer Vernetzung von DNA-Strängen, platiniert nukleophile Gruppen von Proteinen, aktiviert die Caspasen durch den „Endoplasmatic-Reticulum-Stress-Pathway“ [190], beeinträchtigt mitochondriale Funktionen und induziert ROS [191]
- Doxorubicin: Interkaliert mit der DNA, bindet die Topoisomerase I und führt so zu einer Hemmung des DNA-Wiederverschlusses. Außerdem wird die Bildung von ROS stimuliert [192]

Diese finden zudem in der pädiatrischen Onkologie häufigen Einsatz. Darüber hinaus sind sie im Rahmen des anfangs in Kapitel 2 aufgeführten präklinischen Screening-Programms unseres Institutes differenziert untersucht worden, woraus eine profunde Kenntnis über deren pharmakologische Parameter resultiert. Aus den genannten Gründen wurden Cisplatin und Doxorubicin für die Arbeit von Heshe et al. (2011) [12] ausgewählt. Da diese Arbeit unter anderem die von Heshe et al. (2011) [12] gemachte Beobachtung antagonistischer Interaktionen von DCA mit diesen Zytostatika prüfen soll, ergibt sich hier auch die Testung dieser Zytostatika. Auch die folgenden drei konventionellen Zytostatika induzieren die intrinsische Apoptose, finden in der pädiatrischen Onkologie häufigen Einsatz und wurden im genannten präklinischen Screening-Programm ausführlich evaluiert:

- Etoposid: Hemmt die Topoisomerase II und führt zu Einzel- und Doppelstrang-Brüchen der DNA [193]
- SN38: Die Anlagerung von SN38 an den Komplex aus DNA-Topoisomerase I (wodurch dieses Enzym gehemmt wird) und DNA führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen [194]
- Temozolomid: Alkyliert die DNA [195]

Aus diesem Grunde wurden diese für das in Kapitel 2.5.1 dargelegte Ziel eines differenzierteren Bildes über die Interaktion von DCA mit anderen Wirkstoffen ausgewählt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen dieser Substanzen wurden aus den Erfahrungen der genannten präklinischen Screening-Programme so gewählt, dass ein Erreichen

der GI_{50} in möglichst allen getesteten Zelllinien gewährleistet ist. Außerdem entsprechen diese u. a. den von Heshe et al. (2011) [12] verwendeten Konzentrationen, um einen möglichst validen Vergleich der Effekte zwischen den Arbeiten zu ermöglichen.

Heshe et al. (2011) [12] führte seine Zell-Viabilitätstests u. a. bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l durch, weshalb die ermittelten Effekte in dieser Arbeit ebenfalls bei dieser DCA-Konzentration geprüft wurden. Eine Vielzahl anderer Publikationen zu diesem Thema (bspw. [7], [13], [196]) testeten u. a. gleichfalls bei dieser Konzentration. Dies ist günstig für eine Prüfung der These eines divergierenden Ansprechens von pädiatrischen und adulten neoplastischen Zelllinien.

Nicht erwünschte, die Zytotoxizität gegenüber neoplastischen Zelllinien abschwächende Effekte einer Substanz, treten in der Regel bei zunehmender Konzentration dieser Substanz stärker hervor. Um diese Effekte besser bewerten zu können, wurden alle Versuche zusätzlich bei einer DCA-Konzentration von 25 mmol/l getestet.

3.2.2 Allgemeine Vorkehrungen bei den Versuchsdurchführungen

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit anderen Mikroorganismen wurden die bei der Herstellung eines Mediums, beim Passagieren, beim Coaten und bei der Herstellung von Zellpellets genannten Vorgänge steril unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Es wurden folglich nur sterile Materialien (Pipettenspitzen, Einmalpipetten, Zellkulturflaschen, etc.) und Lösungen (Medium, Trypsin, PBS, etc.) verwendet.

3.2.3 Herstellung des Nährmediums

Das Medium als Nährlösung für die Zellen musste in regelmäßigen Abständen erneuert werden, um ein Absterben der Zellen zu verhindern. Meist geschah dies in Verbindung mit dem Passagieren (s. u.). Das Zellkulturmedium setzte sich wie folgt zusammen:

1. 450 ml RPMI-1640-Medium wurden mit 5 ml des Antibiotic-Antimycotic (GIBCO) versetzt, um einer Kontamination der Zellkultur durch unerwünschte Erreger vorzubeugen.
2. In die Flasche wurden 50 ml FBS (Fetal Bovine Serum; stellt für das Wachstum bestimmter Zelllinien essentielle Proteine und Wachstumsfaktoren bereit) gegeben. Der Anteil an fetalem Kälberserum im Medium betrug damit 10 %.

3.2.4 Vorbereitung der Zellen zum experimentellen Gebrauch

Zur Vorbeugung vor Kontaminationen und zur Gewährleistung einer hohen Konstanz der Zelllinieneigenschaften, wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff bei -197°C kryokonserviert und mussten daher für den experimentellen Gebrauch im Labor vorbereitet werden:

1. Die Kryotubes mit den Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff zum Auftauen vorsichtig in lauwarmes Wasser gegeben.
2. Unter einer Sterilbank wurden diese mit 70%igem Ethanol desinfiziert und anschließend geöffnet.
3. 5-10 ml Zellkulturmedium wurden in einem Falcon-Tube auf 37°C vorgewärmt und die Zellen dorthinein überführt.
4. Der Falcon-Tube wurde für 7 Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen.
5. Die Zellen wurden in 4-5 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Suspension nachfolgend in eine entsprechende Kulturflasche (25 cm^3) überführt.
6. Nach Übergang in die proliferative Phase wurden die Zelllinien unter lichtmikroskopischer Kontrolle regelmäßig passagiert (s. Kap. 3.2.6).
7. Sobald die Zelllinien das für sie charakteristische Wachstumsverhalten zeigten, wurde vor dem experimentellen Gebrauch zum Ausschluss von Kontaminationen bei jeder Zelllinie ein Mykoplasmen-Test (nach der Arbeitsanleitung des „VenorGeM Mykoplasmen-Nachweis für die konventionelle PCR“ von Minerva Biolabs) durchgeführt.

3.2.5 Coaten der Zellkulturflaschen

Da Ewing-Sarkom-Zellen bevorzugt auf kollagen-beschichteten Zellkulturflaschen zu wachsen, musste zur Kultivierung der Boden der Flaschen, die für diese Zellen genutzt wurden, vor Benutzung für die Zellkultur mit Kollagen beschichtet werden.

Beschichtung der Zellkulturflaschen mit Kollagen (beschrieben für 65 Zellkulturflaschen)

1. In zwei 50 ml Falkontubes wurden jeweils 1,6 ml Collagen rat 1 gegeben.
2. Hinzugegeben wurden jeweils 48,4 ml autoklavierte Essigsäure 0,1 N.
3. Durch ein steriles Combitip Plus (5 ml) wurden mit Hilfe einer Multipette 1,5 ml der Kollagen-Essigsäure in Zellkulturflaschen gegeben.

4. Die Flaschen wurden verschlossen und vorsichtig geschwenkt, um die Lösung auf dem Flaschenboden zu verteilen.
5. Diese wurden 2 Tage stehen gelassen, damit das Kollagen am Boden anhaften konnte.
6. Nach 2 Tagen wurden die Flaschen in der angeschalteten Sterilbank geöffnet und die restliche Lösung steril abgesaugt.
7. Die Flaschen blieben bis zum nächsten Tag bei angeschalteter Sterilbank zum Trocknen stehen und wurde dann erst wieder verschlossen.
8. In die zuletzt abgesaugte Flasche wurden 4 ml Medium gegeben und diese unter halb offenem Verschluss 2-3 Tage inkubiert. Wenn nach dieser Zeit unter dem Lichtmikroskop keine Bakterien oder Pilze nachzuweisen waren, galt der Sterilitätstest als bestanden und die Flaschen konnten benutzt werden.

3.2.6 Passagieren

Um ein exponentielles Wachstum der Zellen zu gewährleisten wurden sie, entsprechend ihrer Wachstumsraten, in regelmäßigen Intervallen in neue Zellkulturflaschen transferiert, wobei sie mit frischem Medium verdünnt wurden (= Passage). Beim Vorgehen war zwischen adhären wachsenden Zellen und in Suspension vorliegenden zu unterscheiden. Die passende Teilungsrate ergab sich durch die Beurteilung der Besiedlungsdichte in der Zellkulturflasche unter dem Lichtmikroskop unter Berücksichtigung der Teilungsrate, welche bei der letzten Passage gewählt wurde sowie des Zeitpunktes zu dem dies geschah. Die für die jeweilige Teilungsrate benötigten Volumina an neuem Medium und Zellsuspension wurden verschiedenen Tabellen entnommen, welche sich entsprechend der Zellkultur (vorliegend als Suspension oder adhären) unterschieden (s. u.):

Passage von Suspensionszellen

1. Der jeweiligen Teilungsrate der Zellen entsprechendes Volumen von neuem Medium wurde in eine neue, mit Datum, Zellreihenbezeichnung, Passagenummer und Teilungsrate beschriftete Zellkulturflasche vorgelegt.
2. Der Zellsuspension in der alten Flasche wurde das benötigte Volumen entnommen, in die neue Flasche überführt und diese geschwenkt.
3. Die neue Flasche wurde in den Inkubator gelegt und mit einer halben Verschlusskappendrehung geöffnet, so dass ein Gasaustausch zwischen Zellkulturflasche und Inkubator (Atmosphäre mit 5% CO₂) möglich war.
4. Der Inhalt der alten Flasche wurde verworfen oder für Viabilitätstests bzw. die Herstellung von Zellpellets (s. Kap. 3.2.9) verwendet.

Teilungsrate	Volumen Medium in neuer Zellkulturflasche	Volumen Zellsuspension
1 : 2	2 ml	2 ml
1 : 3	2,67 ml	1,33 ml
1 : 4	3 ml	1 ml
1 : 5	3,2 ml	0,8 ml
1 : 6	3,34 ml	0,66 ml
1 : 7	3,43 ml	0,57 ml
1 : 8	3,5 ml	0,5 ml
1 : 9	3,6 ml	0,44 ml
1 : 10	3,66 ml	0,4 ml
1 : 15	3,73 ml	0,27 ml
1 : 20	3,8 ml	0,2 ml
1 : 25	3,84 ml	0,16 ml

Tabelle 1: Benötigte Volumina für verschiedene Teilungsraten bei Zellen in Suspension

Passage von adhären wachsenden Zellen

1. In der Flasche der zu teilenden Zelllinie wurde das gesamte Medium mit einer Pipette entnommen und verworfen.
2. In diese Flasche wurden 0,9 ml Trypsin gegeben und vorsichtig geschwenkt, sodass das Trypsin den gesamten Flaschenboden benetzte.
3. Ein Teil des Trypsins wurde anschließend wieder abgesaugt.
4. Die Flasche wurde verschlossen für 5-10 Minuten in einen Inkubator gestellt, um die trypsinbedingte Ablösung der Zellen vom Flaschenboden zu begünstigen. Haben diese sich in dieser Zeit nicht ausreichend abgelöst, wurden nochmals 0,2-0,3 ml Trypsin dazu gegeben und erneut inkubiert.
5. Die abgelösten Zellen wurden mit einem der Teilungsrate entsprechenden Volumen an neuem Medium resuspendiert. Anschließend wurde mit dieser Suspension wie mit den oben genannten Suspensionszellen verfahren.

Teilungsrate	Volumen neues Medium in neuer Zellkulturflasche	Volumen Medium zum Resuspendieren	Volumen Resuspensat von alter in neue Zellkulturflasche
1 : 2	2 ml	4 ml	2 ml
1 : 3	3 ml	3 ml	1 ml
1 : 4	3,5 ml	2 ml	0,5 ml
1 : 5	3,5 ml	2,5 ml	0,5 ml
1 : 6	3,5 ml	3 ml	0,5 ml
1 : 7	3,5 ml	3,5 ml	0,5 ml
1 : 8	3,5 ml	4 ml	0,5 ml
1 : 9	3,5 ml	4,5 ml	0,5 ml
1 : 10	3,5 ml	5 ml	0,5 ml
1 : 15	3,7 ml	5 ml	0,3 ml
1 : 20	3,75 ml	5 ml	0,25 ml
1 : 25	3,8 ml	5 ml	0,2 ml

Tabelle 2: Benötigte Volumina für verschiedene Teilungsraten bei adhärenen Zellen

3.2.7 Behandlung schlecht wachsender Leukämie-Zelllinien

Teilten sich die Zellen einer leukämischen Zelllinie so langsam, dass eine Teilungsrate von 1:2 zu einem weiteren Verlust an Zellen führte oder die geringe Zellzahl die gewünschten Versuche nicht zuließ, wurde der Anteil an fetalem Kälberserum im Zellkulturmedium auf 20% erhöht.

3.2.8 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitäts-Test. Dieser dient der Quantifizierung von lebenden Zellen nach einer Exposition einer Zellkultur mit schädigenden Substanzen, wie zum Beispiel Zytostatika. Hierbei wird den Zellen der zu testenden Zellkultur nach Inkubation mit der toxischen Substanz ein gelber Farbstoff (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, MTT) zugesetzt. Dieser Farbstoff wird durch die von lebenden Zellen synthetisierten Reduktionsäquivalente NADH und NADPH reduziert, wodurch blauviolette Formazankristalle ausfallen. Die Farbe der Lösung kann nach Lyse der Kristalle photometrisch bestimmt werden. Die Extinktion korreliert positiv mit der Menge an zu Formazan umgesetzten MTT, sodass hierdurch auf die Anzahl der vitalen Zellen geschlossen werden kann.

Für die Durchführung der MTT-Tests wurden die Zellen auf 96-Loch-Platten kultiviert:

		Testsubstanz				DCA 10 mmol/l + Testsubstanz				DCA 25 mmol/l + Testsubstanz			
Konzentration der Testsubstanz	C0	C0	C0	C0	DCA	DCA	DCA	DCA	DCA	DCA	DCA	DCA	
	C1 _{KC}	C1 _{KC}	C1 _{KC}	C1 _{KC}	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	
	C2 _{KC}	C2 _{KC}	C2 _{KC}	C2 _{KC}	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	
	C3 _{KC}	C3 _{KC}	C3 _{KC}	C3 _{KC}	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	
	C4 _{KC}	C4 _{KC}	C4 _{KC}	C4 _{KC}	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	
	C5 _{KC}	C5 _{KC}	C5 _{KC}	C5 _{KC}	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	DCA +	

Tabelle 3: Belegung der Zellkulturplatten; KC: konventionelles Zytostatikum, C0 = Zellkultur ohne KC; C1-C5 = Konzentrationen der KC, C1 < C2 < C3 < C4 < C5

Der MTT-Test wurde für die Leukämie-Zelllinien CCRF-CEM, HL-60, MOLT4 und REH, die Medulloblastom-Zelllinien DAOY und UW228.2 sowie die Osteosarkom-Zelllinien MNNG-HOS und OST durchgeführt. Diese wurden – neben DCA in 10 und 25 mmol/l – mit den folgenden konventionellen Zytostatika inkubiert:

- Cisplatin: C₁: 0,01 µmol/l, C₂: 0,1 µmol/l, C₃: 1 µmol/l, C₄: 10 µmol/l, C₅: 100 µmol/l
- Doxorubicin: C₁: 0,001 µmol/l, C₂: 0,01 µmol/l, C₃: 0,1 µmol/l, C₄: 1 µmol/l, C₅: 10 µmol/l
- Etoposid: C₁: 0,01 µmol/l, C₂: 0,1 µmol/l, C₃: 1 µmol/l, C₄: 10 µmol/l, C₅: 100 µmol/l
- SN38 (aktiver Metabolit von Irinotecan): C₁: 0,0001 µmol/l, C₂: 0,001 µmol/l, C₃: 0,01 µmol/l, C₄: 0,1 µmol/l, C₅: 1 µmol/l
- Temozolomid: C₁: 0,1 µmol/l, C₂: 1 µmol/l, C₃: 10 µmol/l, C₄: 100 µmol/l, C₅: 1000 µmol/l

Zwecks Erhöhung der Reliabilität bzw. Reduktion von messfehlerbedingten Abweichungen wurde (wie in Tabelle 3 zu sehen) jede Kombinationskonstellation aus vier verschiedenen Vertiefungen der Platten („Wells“) gemittelt und jeder Versuch wurde mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt, woraufhin diese Ergebnisse wiederum gemittelt wurden.

3.2.8.1 Vorbereitung der Testsubstanzen

In den Plattenvertiefungen, welche für die Kombinationstestungen vorgesehen waren, wurden zu 100 µl Zellsuspension jeweils 50 µl DCA und 50 µl eines konventionellen Zytostatikums gegeben. Um in den Wells die gewünschte Konzentration zu erreichen, müssen die Substanzen also 4-fach höher konzentriert werden. Zum Erreichen einer Konzentration von 100 µmol/l einer Substanz in einem Well, muss zuvor folglich eine Konzentration von 400 µmol/l angesetzt worden sein.

Rechenbeispiel

Benötigte Informationen

- Molekulargewicht (MG) der Substanz
- Konzentration der Stammlösung
- Zielvolumen (errechnet sich aus dem benötigten Volumen pro Versuch multipliziert mit der benötigten Anzahl der Versuche)
- Zielkonzentration

Ausgehend von diesen Vorgaben wurde anhand folgender Formel das benötigte Volumen der Stammlösung errechnet:

$$\text{Stammlösungsvolumen} = \frac{MG \left[\frac{g}{mol} \right] \times \text{Zielkonzentration} \left[\frac{mol}{l} \right] \times \text{Zielvolumen} [l]}{\text{Stammlösungskonzentration} \left[\frac{g}{l} \right]}$$

Das Stammlösungsvolumen wurde mit [Zielvolumen - Stammlösungsvolumen] an Medium verdünnt, um das Zielvolumen mit der Zielkonzentration zu erreichen.

Beispiel: DCA 25 mmol/l im Well

- Gewünschte Konzentration im Well: 25 mmol/l → Zielkonzentration: 100 mmol/l
- MG: 150,92 g/Mol
- Stammlösungskonzentration: 50 mg/ml
- Zielvolumen: 45 ml

$$\frac{150,92 \left[\frac{g}{mol} \right] \times 100 \times 10^{-3} \left[\frac{mol}{l} \right] \times 45 \times 10^{-3} [l]}{50 \left[\frac{g}{l} \right]} = 0,0135828 l = 13,5828 \text{ ml}$$

Es müssen also 13,58 ml Stammlösung mit 31,42 ml Medium verdünnt werden, um 45 ml einer 100 mmol/l-Lsg. zu erhalten, mit der man für den MTT- Test im Well eine Konzentration von 25 mmol/l erhält.

Nach dem gleichen Prinzip wurden die Lösungen für DCA mit einer Konzentration im Well von 10 mmol/l, Cisplatin (Konzentration im Well: 100 µmol/l), Temozolomid (Konzentration im Well: 1 mmol/l), Doxorubicin (Konzentration im Well: 10 µmol/l), Etoposid (Konzentration im Well: 100 µmol/l) und SN 38 (Konzentration im Well: 1 µmol/l) hergestellt.

3.2.8.2 Ansetzen der Verdünnungsreihen der Substanzen

Für die MTT- Tests wurden die Substanzen Cisplatin, Temozolomid, Doxorubicin, Etoposid und SN 38 als Verdünnungsreihen mit 5 verschiedenen Konzentrationen verwendet (vgl. Tabelle 3.), welche jeweils um den Faktor 10 abnahmen.

1. Ein gewünschtes Volumen (z. B. 1 ml) der nach Kap. 3.2.8.1 hergestellten Lösung wurden in ein steriles Gefäß gegeben und mit dem 9-fachen Volumen (z. B. 9 ml) an Medium verdünnt.
2. Die Lösung wurde auf einem Schüttler gemischt.
3. Hiervon wurde wiederum 1/10 des Volumens in ein weiteres Gefäß gegeben und mit dem 9-fachen Volumen (z. B. 9 ml) an Medium verdünnt.
4. Dieser Vorgang wurde bis zum Erreichen der kleinsten benötigten Konzentration wiederholt.

3.2.8.3 Bestimmung der Zellzahl in den Zellsuspensionen

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, mussten die Zellen der zu testenden Zelllinien beim MTT-Test vor Inkubation mit den zytotoxischen Substanzen in gleicher Anzahl vorliegen. Voraussetzung hierfür war die Bestimmung der Zellzahl in den jeweiligen Zellsuspensionen.

1. Suspensionszellen: Die Suspension wurde in einen 15 ml Falcon-Tube gegeben, zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Sediment mit 3 ml Medium resuspendiert.
Adhärenz wachsende Zellen: Das Medium wurde weggegeben, die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst, mit 3 ml Zellkulturmedium suspendiert und in einen 15 ml Falcon-Tube gegeben.
2. Eine kleine Menge (ca. 200 µl) der Zellsuspension wurde in einen Eppendorf-Tube gegeben.
3. Pro zu testende Zelllinie wurde ein Casycup mit 10 ml Casyton gefüllt.
4. Die Zellsuspension wurde mit einem Schüttler oder einer Pipette resuspendiert.
5. Anschließend wurden diesem 50 µl Zellsuspension entnommen und in den gefüllten Casycup gegeben.
6. Dieser wurde mit Deckel verschlossen, die Zellen durch vorsichtiges Kippen gleichmäßig suspendiert und in das Stativ das Casy[®] gegeben.
7. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde von dem CASY[®] unter Berücksichtigung der zuvor durchgeführten Verdünnungsschritte (50 µl Zellsuspension auf 10 ml CASY-Ton) ermittelt.

3.2.8.4 Ansetzen der Zellsuspension für den MTT-Test

Der nach Kapitel 3.2.8.3 gemessene Wert wurde anschließend dazu verwendet, das Volumen an Medium zu errechnen, um das die Zellsuspension verdünnt werden musste, damit eine Anzahl von 5000 Zellen pro Well erreicht wurde. Da ein Volumen von 100 µl Zellsuspension in jede

Vertiefung gegeben wurde, musste folglich eine Konzentration von 5000 Zellen/100 µl angesetzt werden.

Rechenansatz für Wellplatten mit 6 x 12 gefüllten Wells

1. Berechnung des benötigten Zellsuspensions-Volumens

Für den Versuchsaufbau des MTT-Tests mussten auf der "72-Stunden-Platte" (Erläuterungen s. Kap 3.2.8.5.) 6 x 12 = 72 Wells befüllt werden (vgl. Tabelle 3 auf S. 40). Hinzu kamen 1 x 8 Wells für die "0-Stunden-Platte" (Erläuterungen ebenfalls an o. g. Stelle). Um einen Pipettierverlust zu kompensieren, wurde hierzu noch ein Volumen von 10 Wells addiert. Es wurde also ein Volumen an Zellsuspension für 90 Wells benötigt. Jedes Well wurde mit 100 µl Suspension befüllt. Folglich ergab sich ein benötigtes Volumen von 9 ml.

2. Berechnung der benötigten Zellzahl

Da sich in jedem Well 5000 Zellen befinden sollten, ergab sich eine benötigte Zellzahl von 90 (Anzahl der Wells) x 5000 (Zellen pro Well) = 450.000.

$$Y = \frac{450.000 \text{ Zellen}}{X \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right]}$$

– Y: Volumen der in Kap. 3.2.8.3, Punkt 1, genannten Zellsuspension, welches mit Medium verdünnt werden muss, um die errechneten 9 ml Zellsuspension mit 450.000 Zellen herzustellen

– X: in Kap. 3.2.8.3, Punkt 7 gemessene Konzentration

Herstellung der Zellsuspension für die Durchführung des MTT-Tests

1. In einen 15 ml Falcon-Tube wurden 9 ml minus dem zuvor ermittelten Volumen Y (s. o.) vorgelegt.
2. Die Zellsuspension wurde auf einem Schüttler resuspendiert und hiervon das ermittelte Volumen Y in den Tube gegeben.

3.2.8.5 Aufbereitung der Platten für die Inkubation

Um die toxische Wirkung der zu untersuchenden Substanzen auf die zu untersuchenden Zelllinien auszuwerten, wurden die Zelllinien 72 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Zur Gewährleistung eines normalen Wachstums der Zelllinien in den Vertiefungen vor Aufbringen der Substanzen, wurden die Zelllinien zunächst ohne die Substanzen für 24 Stunden in den Wellplatten inkubiert. Hiernach wurde bei einer Fraktion die Konzentration an Zellen gemessen

(„0-Stunden-Platte“³) und eine andere Fraktion mit den Substanzen versehen („72-Stunden-Platte“⁴). Die Messung der „0-Stunden-Platte“ ließ in Bezug auf die Extinktionsmessungen der „72-Stunden-Platte“ zusätzliche Aussagen über das Wachstumsverhalten der unbehandelten Zellen in dem Versuch sowie Rückschlüsse auf die Zytotoxizität der Testsubstanzen zu.

Auswertung der „0-Stunden-Platte“

1. Acht Wells pro Zelllinie der „0-Stunden-Platte“ wurden mit jeweils 100 µl der nach Kap. 3.2.8.4 hergestellten Zellsuspension befüllt und für 24 Stunden in den Inkubator gestellt.
2. In die mit Zellsuspension gefüllten Wells der „0-Stunden-Platte“ wurden mit der Multipette jeweils 100 µl RPMI 1640 aus einem 50 ml-Tube gegeben.
3. Anschließend wurde das Überleben der Zelllinien vor Zugabe der Substanzen ermittelt (siehe folgendes Kapitel).

Auswertung der „72-Stunden-Platte“

1. 72 Vertiefungen der „72-Stunden-Platte“ wurden mit jeweils 100 µl der nach Kap. 3.2.8.4 hergestellten Zellsuspension befüllt und zusammen mit der „0-Stunden-Platte“ für 24 Stunden in den Inkubator gestellt.
2. In die gefüllten Vertiefungen der „72-Stunden-Platte“ wurden jeweils 50 µl der Substanzen bzw. testsubstanz-freies Medium, dem Plattenbelegungsschema entsprechend (vgl. Tabelle 3), gegeben.
3. Danach wurde die Platte für 72 Stunden in einen Inkubator gestellt. Anschließend erfolgte die Messung des Zellüberlebens mittels MTT-Test (s. folgendes Kapitel).

3.2.8.6 Messung des Zellüberlebens

Wie eingangs in Unterkapitel 3.2.8 beschrieben kann die Anzahl der vitalen Zellen photometrisch durch das Ausmaß der Reduktion des MTT photometrisch nachgewiesen werden.

1. In die mit der jeweiligen Zelliniensuspension befüllten Wells wurden jeweils 10 µl MTT gegeben und die Platte für drei Stunden im Inkubator inkubiert.
2. Leukämiezellen wurden zentrifugiert (Relative Centrifugal Force [RCF] 1300, 7 Minuten). Wenn es sich bei den Zelllinien nicht um Leukämiezellen handelte, wurde dieser Schritt übersprungen.
3. Das Medium in den Wells wurde jeweils bis 1 mm über dem Boden abgesaugt.

³ 0-Stunden-Platte: so genannt, da diese im Gegensatz zur „72-Stunden-Platte“ zu keiner Zeit mit den Substanzen inkubiert wurde

⁴ 72-Stunden-Platte: so genannt, da diese nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden mit den Substanzen ausgewertet wurde

4. Es wurden jeweils 100 µl Lyse in jeden Well gegeben, wodurch die Zellen lysiert und die Formazankristalle aufgelöst wurden.
5. Die Platte wurde auf einen Schüttler gegeben und für 10 Minuten bei einer Frequenz von 600/Min. geschüttelt.
6. Anschließend wurde die Extinktion der gelösten Formazan-Kristalle als Surrogat für den Anteil noch lebender Zellen mittels Photometer bei einer Messwellenlänge von 590 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen. Die ermittelten Daten wurden für die spätere Auswertung als Excel-Datei gespeichert.

3.2.9 Herstellung von Zellpellets

Für die Untersuchungen zur mRNA- und Protein-Expression wurden von den jeweiligen Zelllinien Pellets hergestellt:

1. Der beim Passagieren der Zellen überbleibende Rest an Zellsuspension wurde in einen mit Zellliniennamen versehenen 15-ml-Tube gegeben.
2. Dieser wurde in einer Zentrifuge bei einer RCF (s. o.) von 1300 für 5 Minuten zentrifugiert.
3. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand vorsichtig abdekantiert.
4. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Phosphatgepufferter Salzlösung (kurz PBS von engl.: Phosphate Buffered Saline) resuspendiert und in einen mit Zellreihenbezeichnung, Datum und Passagennummer versehenen Eppendorf-Tube gegeben.
5. Dieser wurde für 5 Minuten bei einer RCF von 1300 zentrifugiert und die über dem Pellet stehende Lösung wie in Punkt 3 dekantiert.
6. Der Rest der überstehenden Lösung wurde vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und verworfen, bis in dem Eppendorf-Tube nur noch das Zellpellet übrig war.
7. Der Tube mit dem Zellpellet wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.10 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die „Quantitative Reverse-Transcriptase-Polymerase-Chain-Reaction“ (qRT-PCR) ist ein Verfahren zur Amplifizierung und gleichzeitigen Quantifizierung der Expression von bestimmten Gensequenzen auf mRNA-Ebene. In dieser Arbeit wurde auf diese Weise die Expression von Survivin, VDAC, Kv1.5 und der PKM2 in 18 neoplastischen pädiatrischen, zwei neoplastischen adulten und einer nichtneoplastischen embryonalen Zelllinie untersucht. Hierzu wurde die mRNA nach ihrer Extraktion aus der Zelle (Kap. 3.2.10.1) zunächst mittels einer „Reversen Transkriptase“ in DNA umgeschrieben (Kap. 3.2.10.2). und anschließend mittels Sequenz-

spezifischen Primer in einer PCR amplifiziert (Kap. 3.2.10.3). Durch genspezifische Fluoreszenz-markierte Sonden konnte nach jedem PCR-Zyklus über die Fluoreszenz im PCR-Ansatz die Menge an amplifiziertem Zielgen ermittelt werden und damit Rückschlüsse auf die mRNA Expression des Zielgenes gezogen werden. Um Zellzyklus-bedingte Schwankungen der mRNA-Expression zu kompensieren wurden diese Vorgänge mit jeweils drei verschiedenen Pellets pro Zelllinie durchgeführt und die Ergebnisse anschließend gemittelt.

3.2.10.1 Extraktion der RNA für die qRT-PCR

Die Extraktion von RNA als Grundlage für die Durchführung einer qRT-PCR für die Messung der Expression in den jeweiligen Zellen erfolgte mit Hilfe des „QIAamp-RNA-Isolation-Kit“ gemäß den Vorgaben des Herstellers unter RNase-freien Bedingungen.

1. Die zu untersuchenden Zellpellets wurden aufgetaut, die Zellstrukturen mit den dafür vorgesehenen Reagenzien in entsprechenden Tubes lysiert und die Lösung homogenisiert.
2. Nach Zugabe von Ethanol erfolgte die Bindung der RNA an eine speziell dafür vorgesehene Silica-Gel-Membran.
3. Durch Waschvorgänge wurden zelluläre Rückstände und Verunreinigungen von der Membran entfernt. Spuren von DNS wurden dabei durch zusätzliche Behandlung mit einem RNase-freien DNase-Set eliminiert.
4. Anschließend wurde die reine RNA in 30-100 µl RNase-freiem Wasser eluiert.
5. Die RNA-Qualität und Quantität wurde mittels des „2100-Bioanalisators“ von Agilent kapillarelektrophoretisch analysiert.

3.2.10.2 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Im nächsten Schritt mussten aus der isolierten mRNA komplementäre DNA-Stränge (cDNA) synthetisiert werden. Die dafür notwendige reverse Transkription wurde mit dem „Superscript™-III-First-Strand-Synthesis-System-for-RT-PCR“ von Invitrogen™ an 0,1 µg RNA entsprechend der Vorschriften des Herstellers durchgeführt:

1. Die Lösung mit der RNA wurde für 5 Minuten bei 65° C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt.
2. Dann wurde diese mit RNase-freiem Wasser, abhängig von den ermittelten RNA-Konzentrationen auf 100 ng/10 µl verdünnt.
3. Zu 10 µl wurde ein Gemisch aus dNTPs und einem Oligo-dT-Primer pipettiert und dieser Ansatz für 2 Minuten bei 42° C inkubiert.

4. Nachfolgend wurde eine Mischung aus Puffer, Dithiothreitol (DTT), einem RNase-Inhibitor und der Reversen-Transkriptase zugesetzt, sorgfältig gemischt und dieser Ansatz erneut bei 42° C über 50 Minuten inkubiert.
5. Die Reverse Transkriptase wurde durch Erwärmung von 15 Minuten bei 70° C wieder inaktiviert und der Transkriptionsvorgang mit dem entstandenen Endprodukt eines mRNA-cDNA-Hybrids beendet.
6. In einem letzten Schritt wurde die noch vorhandene RNA durch Inkubation für 20 Minuten bei 37° C mit RNase H aus dem Ansatz entfernt, womit die Isolation der cDNA abgeschlossen wurde.

3.2.10.3 Real-Time-TaqMan®-Polymerase-Chain-Reaction

Die Real-Time-TaqMan®-PCR-Analysen wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster und durch dort angestelltes Personal durchgeführt. Der Autor dieser Dissertation nahm bei der Durchführung dieser Prozesse nicht teil. Diese auf den Arbeiten der Forschergruppen um Holland et al. (1991) [197] und Lee et al. (1993) [198] beruhende Methode hat den entscheidenden Vorteil der gleichzeitigen Amplifikation und quantitativen Analyse von PCR-Produkten in einem Reaktionsansatz.

Hierbei wird das entstandene PCR-Produkt (die vervielfältigte DNA), über sogenannte TaqMan®-Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid, welches komplementär zu den zu amplifizierenden DNA-Sequenzen und an beiden Enden jeweils mit einem fluoreszierenden Farbstoff verbunden ist. Der sogenannte Reporter-Farbstoff am 5'-Ende der Sonde wird bei Bestrahlung mit einem Laser normalerweise durch strahlungsfreien Energietransfer (Fluorescence Resonance Energy Transfer = FRET) auf den sogenannten Quencher-Farbstoff am 3'-Ende in seinen fluoreszierenden Eigenschaften gehemmt. Letzterer Effekt wird aufgehoben, wenn sich Reporter- und Quencher-Farbstoff räumlich voneinander entfernen. Eine derartige Trennung entsteht durch die zusätzliche 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase, welche eigentlich für die Elongation des neu synthetisierten DNA-Stranges notwendig ist. Dabei wird das 5'-Ende der Sonde mit dem Reporter-Farbstoff abgetrennt. Die dadurch bedingte Zunahme an Fluoreszenz dieses Farbstoffs lässt sich leicht quantifizieren und korreliert mit der Menge neu synthetisierter DNA.

Die Expression des Referenzgens GAPDH (s. Kap. 2.1.1.1) diente hier als endogene Kontrolle und Bezugsgröße. Als Negativkontrolle dienten Proben mit reinem Wasser. Bei den Analysen kamen von der Firma Applied Biosystems vorgefertigte TaqMan®-Assays mit den entsprechenden Primern und Sonden zur Anwendung (s. Kap. 3.1.4). Zusätzlich wurde ein „2x-Universal-PCR-Master-Mix“ (enthält die Polymerasen) hinzugefügt und das Ganze mit einer Diethyldicarbonat-Lösung (DEPC, inaktiviert RNasen) aufgefüllt. Zur Durchführung der Messungen wurde das

„ABI Prism 7700 Sequence Detection System für die Quantifizierung der mRNA verwendet. Dazu wurden die oben beschriebenen Ansätze maschinell mit Hilfe des „Tecan Genesis 150 Robotic“ in 384-Well Platten pipettiert, mit Deckel versehen, abzentrifugiert und die PCR nach folgendem Verfahren durchgeführt:

- Zunächst erfolgte die Aktivierung der Taq-Polymerase für 10 Minuten bei 95° C.
- Darauf folgten 40 Zyklen der Amplifikation. Dazu war jeweils zunächst eine kurze Phase von 15 Sekunden bei 95° C für die Denaturierung der cDNA notwendig.
- Dann folgte jeweils 1 Minute Synthese bei 60° C.

Alle cDNA Proben wurden in einem Analysenlauf jeweils 2-mal analysiert.

3.2.10.4 Auswertung der PCR-Daten

Die Amplifikation der cDNA wurde durch die Sequence Detection Software (SDS2.2, Applied Biosystems) erfasst und ausgewertet: Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz in dem PCR-Ansatz gemessen und konnte somit graphisch dargestellt werden (x-Achse: Zyklenzahl; y-Achse: Fluoreszenzintensität). Es ergab sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Der erste Wendepunkt bezeichnet den Zyklus, ab dem die Amplifikation in die exponentielle Phase übergeht (engl.: Threshold-Cycle, Abk.: Ct-Wert). Dieser Ct-Wert korreliert mit der Menge an cDNA-Molekülen im PCR-Ansatz. Der zweite Wendepunkt ergibt sich durch den Verbrauch der Substrate.

Zur Berechnung der relativen Expression der Zielgene im Vergleich zum Referenzgen GAPDH wurde die Differenz zwischen den Ziel-RNA-Ct-Werten und den GAPDH-Ct-Werten ermittelt (= ΔCT). Liegt die Ziel-RNA stark exprimiert vor, ergibt sich eine niedrige Differenz bzw. ein niedriger ΔCT -Wert. Ein hoher ΔCT -Wert ist demnach Folge einer niedrigen Expression der Ziel-RNA. Zum Erreichen einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde die „ $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Methode“ angewandt. Wie man dem Namen ableiten kann, ergibt sich der Ergebniswert aus der Potenzierung der Basis „Zwei“ mit einem negativierten sogenannten „ $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert“ als Exponent. Der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert ist der Wert der Differenz vom ΔCT -Wert einer Referenz-Zelllinie als Minuend minus dem ΔCT -Wert der jeweiligen untersuchten Zelllinie als Subtrahend ($\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Referenz-Zelllinie}} - \Delta\text{CT}_{\text{untersuchte Zelllinie}}$). Die $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Methode erlaubt einen besseren Vergleich der Expressionsdaten als der ΔCT -Wert allein, da (annähernd) lineare positive Beziehungen geschaffen werden: Entspricht der $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Wert eines Zielgens einer Zelllinie beispielsweise der Zahl „5“, bedeutet dies, dass das entsprechende mRNA-Gentranskript in dieser Zelllinie annähernd fünfmal so häufig vorliegt, wie in der Referenz-Zelllinie. Um diese Beziehung zu verdeutlichen, wird dieser Wert im internationalen Sprachgebrauch auch „Fold Change“ (Abk.: FC; dt. \approx x-fache Änderung) genannt.

Eine wünschenswerte, da valide Referenz wäre der Mittelwert der Δ CT-Werte mehrerer pädiatrischer nicht-neoplastischer Zelllinien. Nicht-neoplastische Zellen lassen sich jedoch (im Gegensatz zu manchen neoplastischen Primärzellen) nur durch Transfektion mit Viren-DNA immortalisieren und damit für diese Tests zugänglich machen. Die Erfolgsquote ist hier jedoch sehr gering, sodass nur wenige Exemplare existieren [199]. Außerdem sind fast alle dieser Exemplare sehr empfindlich und anspruchsvoll in der Zellkultur. Die embryonale nicht-neoplastische Zelllinie HEK-293 hingegen lässt sich ausreichend gut kultivieren. Außerdem war die Kultivierung dieser Zelllinie bereits im Arbeitskreis etabliert, sodass diese sich als Referenz angeboten hat.

3.2.11 Western Blot

Ein Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen aus Zellextrakten mittels spezifischer Antikörper.

Hierfür mussten die Proteine zunächst aus Zellpellets isoliert (Kap. 3.2.11.1) und verdünnt (Kap. 3.2.11.2) sowie ein Poly-Acrylamid- und Trenngel hergestellt werden (Kap. 3.2.11.3). Des Weiteren wurden die Proben vorbereitet (Kap. 3.2.11.4) und in einer Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. 3.2.11.5). Die im Elektrophorese-Gel aufgetrennten Proteine wurden auf eine Membran transferiert („geblottet“; s. Kap. 3.2.11.6), um anschließend mittels Antikörpern die gewünschten Proteine auf der Membran sichtbar zu machen. (Kap. 3.2.11.7). Um einer Denaturierung und Umsetzung der Proteine vorzubeugen, wurden die Proben bei den Vorgängen, welche gelöste Proteine beinhalten, in einem Behälter mit Eis gehalten.

3.2.11.1 Lysieren der Zellen

1. Zu 10 ml RIPA- Puffer wurde eine Tablette Complete Mini hinzugegeben. Diese enthält einen Protease-Inhibitor-Cocktail, welcher die Umsetzung der Proteine durch Proteasen verhindert. Der Puffer (500 ml) setzt sich zusammen aus:
 - 15 ml NaCl
 - 5 ml 0,08mmol/l IGEPAL[®]-CA-630-Lösung
 - 25 ml Desoxycholinsäure: Bedingt die Zell-Lyse und Solubisierung von Membranproteinen
 - 5 ml 10% Natriumduodecylsulfat (SDS): Führt zur Auflösung der Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine
 - 25 ml 1 mmol/l Tris-Cl pH 8
 - 425 ml gereinigtes H₂O

2. In die Tubes mit den jeweiligen Zellpellets wurden jeweils 100 µl der hier unter Punkt 1 hergestellten Lösung gegeben.
3. Die Lösung wurde anschließend mit einem Schüttler resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Dieser Vorgang wurde 2 Mal wiederholt, um sicherzustellen, dass die unter Punkt 1 genannten Reaktionen in ausreichender Menge abgelaufen sind.
4. Der Ansatz wurde 15 Minuten bei 4 °C und einer RCF von 14000 zentrifugiert.
5. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Tube gegeben.

3.2.11.2 Messung der Proteinkonzentration und Verdünnung des Proteinlysates

Damit die Konzentrationen der später spezifisch nachzuweisenden Proteine der verschiedenen Zelllinien verglichen werden konnten, mussten die Gesamtprotein-Konzentrationen der verschiedenen Zelllinien-Proteinlysate gleich sein. Zu diesem Zweck wurden diese Konzentrationen der verschiedenen Lösungen in einem Photometer gemessen und die Lösungen, entsprechend ihres Absorptionskoeffizienten, verdünnt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific.

1. In eine 96-Well-Platte wurden die Proteinstandards mit den absteigenden Proteinkonzentrationen gegeben. Die Analyse der Proteinstandards erfolgte als Doppelbestimmung aus denen dann Extinktionsmittelwerte für die jeweilige Konzentration ermittelt wurden.
2. Das „Working Reagent“ (WR) wurde hergestellt, indem 50 Teile BCA Reagenz A und 1 Teil BCA Reagenz B zusammengegeben wurden.
 - BCA Reagenz B enthält $\text{Cu}^{2+} + \text{SO}_4^{2-}$. Cu^{2+} wird durch die Biuret-Reaktion durch Proteine in alkalischem Medium zu Cu^{1+} reduziert. Cu^{1+} führt durch Chelat-Bildung mit Bicinchoninischer Säure (Bicinchoninic Acid (BCA)), welches in dem BCA Reagenz A enthalten ist, zu einem violett-gefärbten Reaktionsprodukt. Die Konzentration dieses Reaktionsproduktes korreliert folglich mit der Proteinkonzentration der Lösung und kann photometrisch bestimmt werden.
3. Entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Zelllinien wurden jeweils 200 µl des WR in jeweils 2 benachbarte Kammern der 96-Well-Platte gegeben.
4. Es wurden jeweils 95 µl gereinigtes H_2O in neue Eppendorf-Tubes vorgelegt.
5. Jeweils 5 µl der in Kap 3.2.11.1 hergestellten Lösungen wurden in diese Tubes gegeben, so dass eine Verdünnung von 1:20 entstand.
6. Diese Lösung wurde durch einen Schüttler gemischt und es wurden zweimal jeweils 20 µl in die, wie unter Punkt 3 beschrieben, mit der WR vorgefüllten Vertiefungen gegeben.

7. Die Platte wurde auf einem Plattenschüttler für 30 Sekunden geschüttelt und anschließend bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert.
8. Die 96-Well-Platte wurde in ein Photometer gegeben und die Extinktionen der violetten Cu⁺-Komplexe mit Bicinchonischer Säure bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt. Die Konzentration der Proteinlösungen wurde über eine Bezugskurve aus den Proteinstandards ermittelt.
9. Anhand der ermittelten Proteinkonzentrationen wurde das Volumen an PBS bestimmt, welches zum Volumen der in Kap. 3.2.11.1 hergestellten Lösung gegeben werden musste, um eine Lösung mit einer Proteinkonzentration von 2,2 mg/ml herzustellen, welche für die anschließende Auftrennung der Proteine durch die Gelelektrophorese gewünscht war.

3.2.11.3 Herstellung eines Gels für die Gel-Elektrophorese

Das Gel für die Gelelektrophorese besteht in der Regel aus zwei Bereichen: Sammelgel und Trenngel. Die Proteine werden in Taschen gegeben, welche sich im Bereich des Sammelgels befinden. Bei Anschluss des Gels an einen Stromkreis diffundieren die Proteine durch das Sammelgel in den Bereich des Trenngels, welches eine höhere Konzentration an Poly-Acrylamid aufweist. Je größer die Proteine, umso mehr Wechselwirkungen ergeben sich mit dem Poly-Acrylamid und umso langsamer diffundieren diese folglich durch die Gele. Die Größe der Proteine korreliert mit ihrem Molekülgewicht, sodass dieses durch diese Methode mitbestimmt wird. Je größer der Anteil an Poly-Acrylamid im Gel, umso mehr Wechselwirkungen entstehen mit den Proteinen, welche durch das Gel diffundieren. Der passende Anteil an Acrylamid im Trenngel ergibt sich folglich aus dem Molekülgewicht der zu untersuchenden Proteine:

Proteingröße	Acrylamid- Anteil
36 – 205 KD	5 %
24 – 205 KD	7,5 %
14 – 205 KD	10 %
14 – 66 KD	12,5 %
14 – 45 KD	15 %

1. Für die Herstellung eines Trenngels (Mengenangaben für 2 Gele angegeben; beschrieben für einen Poly-Acrylamid- Anteil von 10 %) wurden in ein 50 ml Tube gegeben:
 - a. 3,75 ml einer “4 x Tris/SDS-pH-8,8-Lösung“. Diese Lösung wiederum wurde folgendermaßen hergestellt:
 - i. 45,5 g Trisbase wurden in 150 ml H₂O (HPLC) gelöst.
 - ii. Hierzu wurde 1g SDS gegeben.

- iii. Der pH wurde, nach Eichung des pH- Meters, mit 1N (Normal = 1 Mol/l) HCl auf 8,8 eingestellt.
 - iv. Die Lösung wurde mit H₂O (HPLC) auf 250 ml aufgefüllt.
 - b. 5 ml einer 30 % Acrylamide/Bis-Lösung von Bio-Rad (Verhältnis 37,5:1)
 - c. 6,25 ml gereinigtes H₂O,
 - d. 100 µl einer 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) (polymerisiert in Verbindung mit TEMED) und
 - e. 10 µl einer TEMED-Lösung (polymerisiert in Verbindung mit APS)⁵
- 2. Das Sammelgel wurde hergestellt, indem man in einen 10-ml-Tube folgende Lösungen gab:
 - a. 2,5 ml einer „4 x Tris/SDS-pH-6,8-Lösung“. Diese wurde folgendermaßen hergestellt:
 - i. 6,05g Trisbase wurden in 40 ml H₂O (HPLC) gelöst.
 - ii. Es wurden 0,4 g SDS hinzugegeben.
 - iii. Der pH wurde mit 1N HCL auf 6,8 eingestellt.
 - iv. Die Lösung wurde mit H₂O (HPLC) auf 100 ml aufgefüllt.
 - b. 1,3 ml einer 30 % Acrylamide/Bis-Lösung von Bio-Rad (Verhältnis 37,5:1)
 - c. 6,1 ml H₂O
 - d. 50 µl einer 10 % AP- Lösung (s. o.) und
 - e. 10 µl einer TEMED- Lösung (s. o.)
- 3. Die Glasplatten wurden mit Spülmittel gewaschen, getrocknet, mit Alkohol desinfiziert und in den Gelgießstand eingesetzt.
- 4. Das Trenngel wurde mit einer Pasteur-Pipette ohne Einschluss von Luftblasen bis zu einer Markierung gegeben, die 5,5 cm über dem unteren Ende der Glasplatte gemacht wurde.
- 5. Auf dieses wurde gereinigtes H₂O bis zur Oberkante der Glasplatten pipettiert.
- 6. Das Gel wurde stehen gelassen bis der Polymerisationsprozess abgelaufen war (5 -15 Minuten).
- 7. Anschließend wurde das Wasser abgekippt, der Rest mit einem Tuch aufgesogen und das Sammelgel bis zur Oberkante der Glasplatten auf das Trenngel gegeben.
- 8. In dieses wurde der (desinfizierte) Kamm, der die Taschen für die Proteineingabe schafft, eingesetzt.
- 9. Das Gel wurde für 5-15 Minuten stehen gelassen, bis auch das Sammelgel polymerisiert war.

⁵ Da bei Zugabe dieser Substanzen die Polymerisation beginnt, wurden sie erst kurz vor dem Gießen des Gels hinzugegeben.

10. Um ein Austrocknen zu vermeiden wurde das Gel in feuchten Tüchern und mit dem Kamm in den Taschen im Kühlschrank gelagert.

3.2.11.4 Probenvorbereitung für die Elektrophorese

Um Schwankungen der Proteinexpression in den verschiedenen Phasen des Wachstums der Zelllinien auszugleichen, wurden die Proteine der jeweiligen Zelllinie für die Bestimmung im Western Blot aus mindestens drei verschiedenen Passagen extrahiert:

1. Je 30 µl von drei nach Kap. 3.2.11.1 hergestellten und nach Kap. 3.2.11.2 verdünnten Proben verschiedener Passagen einer Zelllinie wurden in ein neues Eppendorf-Tube gegeben.
2. In diesen wurden 10 µl „4x Probenpuffer“ gegeben. Aufgrund gesundheitsschädlicher Substanzen in dieser Lösung, wurde mit diesen Lösungen unter einem Abzug gearbeitet. 100 ml dieses Puffers setzen sich zusammen aus:
 - a. 40 ml 40 % Glycerin,
 - b. 20 ml 20 % Mercaptoethanol,
 - c. 8 g 8 % SDS,
 - d. 25 ml 0,25 M Tris pH 6,8,
 - e. 10 mg Bromphenolblau
3. Das Tube wurde in einen „Thermomixer“ gegeben, für einige Sekunden geschüttelt und zwecks Proteindenaturierung insgesamt 5 Minuten bei 95 °C inkubiert.

3.2.11.5 Elektrophorese

Die Elektrophorese dient der Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes und ihrer Ladung.

1. Die Gelplatten wurden in die Gelhalterung der Elektrophorese-Kammer eingespannt und diese anschließend in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt.
2. Die Elektrophorese-Kammer wurde bis zur entsprechenden Markierung mit Laufpuffer befüllt. 500 ml des 5-Fach-Konzentrates wurden wie folgt hergestellt:
 - 7,55 g Trisbase, 36 g Glycin und 2,5 g SDS wurden auf 500 ml mit gereinigtem H₂O aufgefüllt. Für einen Elektrophorese-Vorgang wird ca. 1 Liter 1 x konzentrierten Puffers benötigt. Hierfür wurden also zu 200 ml Puffer 800 ml H₂O gegeben.
3. In die erste Tasche des Gels wurden 10 µl “Precision Plus Protein™ Western C Standard Dual Color” von Bio Rad gegeben. Hierbei handelt es sich um eine Standardproteinlösung mit Proteinfärbung. Durch die Anfärbung der Proteine kann man

während der Elektrophorese sehen, wie weit die verschiedenen Proteine bereits durch das Gel gewandert sind.

4. Jeweils 30 µl der nach Kap. 3.2.11.4 hergestellten Lösungen wurden, nach Zelltyp und Alphabet angeordnet, in jeweils eine andere Tasche im Gel gegeben.
5. Die Elektrophorese-Kammer wurde an einen Stromkreis mit einer Spannung von 70 Volt angeschlossen bis die Banden das Trenngel erreichten (ca. 30 Min.).
6. Anschließend wurde die Spannung auf 120 Volt hochgeregelt bis die Proteinfraction der Standardproteinlösung, welche dem Molekülgewicht der erwarteten kleinsten nachzuweisenden Proteinfraction der Proben entsprach, bis zum unteren Ende des Gels gewandert ist (ca. 2 Std.).

3.2.11.6 Blotten

Beim Blotten werden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen. Dies geschieht durch einen Blotting-Puffer, der einem elektrischen Strom folgend, zunächst durch das Gel diffundiert, dabei die Proteine löst und mitnimmt und anschließend durch eine Membran diffundiert, welches die Proteine nicht hindurch lässt. Dieser Schritt ist notwendig, da die Membran, im Gegensatz zum Gel, den spezifischen Nachweis der Proteine durch Antikörper ermöglicht.

1. Ein 10-fach konzentrierter Blotting-Puffer wurde folgendermaßen hergestellt:
 - Es wurden 72 g Glycin in einen Kolben gegeben.
 - Hierzu wurden 15g Tris hinzugefügt.
 - Der Kolben wurde auf 500 ml aufgefüllt.
2. Vor Verwendung musste dieser in 1-facher Konzentration und in Mischung mit Methanol vorliegen. Bei einem Nachweis von kleinen Proteinen (z. B. bei Verwendung eines 12,5% Acrylamid-haltigen Gels) wird eine Lösung mit 10% Methanol empfohlen, bei großen Proteinen (10% Gel) werden 20% Methanol empfohlen. Zur Herstellung von 500 ml eines geeigneten Blotting-Puffers mit 10% Methanol wurden also gegeben:
 - 50 ml Blotting-Puffer zu
 - 400 ml gereinigtem H₂O und
 - 50 ml Methanol
3. Die Glasplatten, die das Gel enthielten, wurden aus dem Stativ entnommen und mit einem Plastikspatel voneinander getrennt.
4. Die beiden Gele (Sammelgel, Trenngel) wurden mit einem Plastikspatel an ihrer Grenze voneinander getrennt und das Sammelgel verworfen.
5. Das Trenngel wurde zum Equilibrieren mit einer sterilen Pipette für 15 Min. in eine kleine Schale mit Blotting-Puffer gegeben.

6. Das Blot-Papier wurde für mindestens 15 Minuten mit einer sterilen Pinzette in eine große Schale mit Blotting-Puffer gegeben.
7. Eine Membran wurde auf die Größe des Trenngels zugeschnitten, in eine kleine Schale mit reinem Ethanol gegeben, kurz geschwenkt und eine Minute liegen gelassen.
8. Anschließend wurde diese Membran 5–15 Minuten mit in die große Schale zum Blot-Papier gegeben.
9. Das Blot-Papier wurde auf die Unterlage der Blot-Maschine gegeben.
10. Darauf wurde die Membran gelegt, die zur späteren Orientierung mit einem Skalpell unten links angeschnitten wurde.
11. Auf die Membran wurde das Gel gelegt.
12. Auf dieses wurde wiederum eine zweite Lage Blot-Papier gegeben und mit einem Tube festgewalzt.
13. Der Deckel der Blot-Maschine wurde verschlossen und für 45 Minuten eine Spannung von 15 V angelegt.
14. Währenddessen wurde ein Blockingpuffer hergestellt. Dies ist eine Lösung aus 0,1% Tween- PBS-Lösung mit 5 % Milchpulver und dient dem Schutz der Membran vor dem Binden von unspezifischen Antikörpern.
15. Nach Ablauf der 45 Minuten wurde das Gel verworfen und die Membran für eine Stunde in einer Schale mit 0,1 % Tween- Blocking-Puffer-Lösung inkubiert.

3.2.11.7 Proteinnachweis mittels Antikörper

Das Blotten der Proteine auf die Membran ermöglicht den Nachweis spezifischer Proteinsequenzen durch komplementäre Antikörper (AK). Die Bindung dieser Antikörper wird dadurch sichtbar gemacht, dass ein zweiter Antikörper, welcher z.B. mit einer „Horse-Radish-Peroxidase“ (HRP) gekoppelt ist, an ersteren bindet. Die HRP katalysiert eine Reaktion, deren Produkt in Verbindung mit Luminol eine Lumineszenz bewirkt, welche von einer speziellen Kamera detektiert werden kann. Je größer die Anzahl der Proteine, welche Sequenzen aufweisen, die zu den Antikörpern kohärent sind, umso mehr Antikörper binden. Je mehr Antikörper binden, um in so größerem Umfang findet die chemolumineszente Reaktion statt und umso mehr Photonen wiederum detektiert die Kamera. Da die Proteine durch die Elektrophorese aufgetrennt wurden, lässt der Western Blot also nicht nur eine Beurteilung über die Menge an Proteinen mit einer bestimmten Proteinsequenz zu, sondern auch darüber, wie groß die Proteine sind, die diese Sequenz aufweisen.

1. Die Antikörper werden von den Herstellern in hoher Konzentration geliefert. Daher mussten diese vor Benutzung mittels einer 0,1%-Tween-5%-Milchpuffer-PBS-Lösung oder 0,1%-Tween-5%-Bovine-Serum-Albumin-Lösung (abhängig vom verwendeten

- Antikörper) verdünnt werden. Die jeweilig geforderte Verdünnung wurde den Herstellerinformationen der Antikörper entnommen.
- Herstellung einer Beta-Aktin-AK-Lösung
 - i. Es wurden 10 ml einer PBS-0,1%-Tween-5%-Milchpulver-Lsg. hergestellt.
 - ii. 10 µl Beta-Aktin-Antikörper wurden aufgetaut und anschließend kurz zentrifugiert.
 - iii. Diese 10 µl wurden zu den 10 ml der in (i) hergestellten Lösung gegeben: 10 µl/ 10 ml → Verdünnung 1:1000
2. Die Blockierungslösung aus der Schale mit der Membran wurde verworfen und die Membran mit PBS gespült.
 3. Eine Schale wurde mit der in Punkt 1 hergestellten Antikörperlösung befüllt und in diese dann die Membran gegeben.
 4. Damit die Antikörper die kohärenten Proteinsequenzen der Proteine auf der Membran binden, wurde die Schale (je nach Antikörper) für 1-12 Stunden bei Raumtemperatur in einer Petrischale oder bei 4 °C auf einem Schüttler im Dunkeln stehen gelassen.
 5. Währenddessen wurde eine 0,1%-Tween-PBS-Lösung (ohne Milchpulver) hergestellt. Zur Herstellung von 500 ml dieser Lösung wurden also zu 499,5 ml PBS, 0,5 ml Tween gegeben. Das Tween bewirkt eine stärkere Lösung der Proteine von der Membran.
 6. Haben die Antikörper die Proteine gebunden, wurde die Lösung, welche zuvor in der Schale war, abgekippt und die in Punkt 5 hergestellte Lösung in die Schale gegeben, sodass die Membran in dieser Lösung schwamm. Diese wurde kurz per Hand geschüttelt und die Lösung ebenfalls verworfen.
 7. Anschließend wurde die gleiche Lösung erneut in die Schale gegeben und diese dann für 5-10 Minuten auf einen Schüttler gegeben. Dieser Vorgang wurde 2 Mal wiederholt. Dieses dient der Entfernung nicht spezifisch gebundener Antikörper von der Membran. Es wurde hierbei darauf geachtet, dass die Seite der Membran, auf welcher die Proteine gebunden waren, oben lag, um ein mechanisches Lösen der Proteine durch das Schütteln zu vermeiden.
 8. Währenddessen wurde die Lösung mit dem zweiten Antikörper hergestellt. Abhängig vom ersten Antikörper enthielt diese Lösung Antikörper, welche spezifisch gegen „Rabbit-Antikörper“ oder „Mouse-Antikörper“ gerichtet waren: War der 1. Antikörper vom „Rabbit“ wurde als zweiter Antikörper also ein „Anti-Rabbit-Antikörper“ verwendet. Entsprechend wurde, abhängig von der Lösung mit dem ersten Antikörper, BSA oder Milchpulver mit PBS-0,1%-Tween-Lsg. als Verdünnungsmedium verwendet.

Dieser wurde außerdem Precision Protein™ Strep Tactin-HRP Conjugate von Bio Rad hinzugesetzt. Die nötige Verdünnung dieser Antikörper mit Blockierungslösung wurde den Herstellerangaben entnommen.

- Herstellung einer Anti-Mouse-Lösung (für z. B. Beta-Aktin)
 - a. Es wurden 10 ml einer PBS-0,1%-Tween-5%-Milchpulver-Lösung hergestellt.
 - b. Die Anti-Mouse-Antikörper wurden aufgetaut und anschließend kurz zentrifugiert.
 - c. Aus diesem wurden 2 µl zu den 10 ml der in Punkt 1 hergestellten Lösung geben: 2 µl/10 ml → Verdünnung 1:5.000 (Hersteller-Empfehlung: 1:1000 – 1:10.000).
 - d. Es wurden 1 µl „Strep Tactin HRP Conjugate“ hinzugegeben: 1 µl/ 10 ml → Verdünnung 1:10.000.
 - Herstellung einer Anti-Rabbit-Lösung: Wie die Herstellung einer Anti-Mouse-Antikörper-Lösung, mit dem Unterschied, dass der Hersteller eine Verdünnung von 1:1.000 – 1:20.000 empfiehlt.
9. Eine Schale wurde mit der in Punkt 8 hergestellten Antikörperlösung befüllt und in diese dann die Membran gegeben.
 10. Die Schale wurde für einen Tag bei 4 °C auf einem Schüttler stehen gelassen, so dass der zweite Antikörper sich in ausreichendem Maße an den ersten binden konnte.
 11. Schritt 7 wurde wiederholt. Da die „Strep Tactin HRP-Lösung“ lichtsensibel ist, musste hier jedoch darauf geachtet werden, dass die Schalen, welche die Membranen beinhalteten, lichtdicht abgedeckt waren. Außerdem wurde beim letzten Waschschrift eine pure PBS-Lösung anstelle der 0,1 % Tween- PBS- Lösung verwendet.
 12. 1,5 ml einer „Immobilon Western HRP Substrate Peroxidase Solution“ von Millipore wurden zu 1,5 ml einer „Immobilon Western HRP Substrate Luminol Solution“ gegeben. Erstere Lösung enthält das Substrat, welches durch die HRP, welche am zweiten Antikörper gebunden ist, zu Peroxid umgesetzt wird. Die zweite Lösung enthält Luminol, welches durch das Peroxid oxidiert wird und dadurch luminesziert.
 13. In dieser Lösung wurde die Membran für eine Minute geschwenkt.
 14. Die Membran wurde anschließend mit einer sterilen Pinzette zum Abtropfen aus der Schale genommen und anschließend, ohne Luftblaseneinschluss, auf eine Klarsichtfolie gelegt.
 15. Die Folie mit der Membran wurde in eine lichtdichte Fotokabine gelegt, in welcher mit Hilfe einer Kamera das Ausmaß der Chemolumineszenz detektiert wurde. Die benötigte

Belichtungszeit hing vom zu bestimmenden Antikörper ab (von 5 Minuten für β -Actin bis zu 20 Minuten für Survivin).

3.2.11.8 Lösen der Antikörper von der Membran („Strippen“)

Das Strippen dient dem Lösen von Antikörpern von der Membran. Dieses ist notwendig, wenn sich nach mehrmaligem Proteinnachweis unspezifische Banden nachweisen lassen oder man ein Protein nachweisen möchte, welches ein ähnliches Molekulargewicht aufweist, wie ein bereits mit dieser Membran nachgewiesenes Protein. Es kann einige Male gestrippt werden. Allerdings können dadurch längere Belichtungszeiten oder sensiblere chemolumineszente Substanzen erforderlich werden.

1. Die Membran wurde für 5-15 Minuten bei Raumtemperatur in einer Schale mit dem Stripping-Puffer „Plus Western Blot Stripping Buffer“ inkubiert.
2. Der Puffer wurde verworfen und mit einer PBS-0,1%-Tween-Lsg. dreimal für jeweils fünf Minuten auf einem Schüttler abgewaschen.
3. Anschließend wurde die Membran mit einem Blockingpuffer (PBS, 5% Milchpulver, ohne Tween) für 30 Minuten blockiert.
4. Es wurde, wie in Kap. 3.2.11.7 beschrieben, mit 5 Minuten Belichtungszeit nachgewiesen, ob noch Antikörper zu detektieren waren. Wenn dies nicht der Fall war, konnte die Membran erneut mit Antikörpern inkubiert werden.

3.2.12 Berechnung, Statistische Analyse und graphische Darstellung

3.2.12.1 Bestimmung des relativen Zell-Überlebens

Pro Versuch wurde der Effekt jeder Substanzkonzentrationskombination in vier benachbarten Wells photometrisch gemessen (siehe Plattenbelegungsschema bzw. Tabelle 3 auf S. 40). Aus den vier Extinktionen (= optische Dichte [OD]) wurden die Mittelwerte ($\bar{O}OD$), Standardabweichungen und Variationskoeffizienten berechnet.

Zur Ermittlung der Hemmung der Zellvermehrung bzw. Abtötung der Zellen durch die jeweiligen Substanzkonzentrationen wurde die $\bar{O}OD$ der für 72 Stunden mit Substanzen inkubierten Suspension mit derjenigen in Beziehung gesetzt, welche für die gleiche Zeit ohne zugegebene Substanzen inkubiert wurde (C_0 auf der Zellkulturplatte, s. Tabelle 3 auf S. 40). Dies entspricht dem Verhältnis der überlebenden Zellen nach Inkubation mit den Substanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zum identischen Zeitpunkt. Der Übersichtlichkeit halber soll hierfür stellvertretend die Bezeichnung relatives Zell-Überleben ($R\ddot{U}$) verwendet werden:

$$R\ddot{U} [\%] = \frac{\text{\textcircled{O}OD nach 72 Std. Inkubation mit Substanzen}}{\text{\textcircled{O}OD nach 72 Std. Inkubation ohne Substanzen}} \times 100$$

Die hier aufgezeigten Kalkulationen wurden mittels Microsoft Excel 2013[®] durchgeführt. Zur graphischen Darstellung diente die Software SigmaPlot, Version 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland).

3.2.12.2 Bestimmung der GI₅₀- Konzentrationen

Die GI₅₀ (= Growth Inhibition of 50 % of exposed cells) beschreibt die Substanzkonzentration, die nach der entsprechenden Inkubationszeit von 72 Stunden zu einer 50-%igen Hemmung des Zellwachstums führt. Nach der Formel im vorangegangenen Unterkapitel erhält man bei den in dieser Arbeit verwendeten fünf steigenden Substanzkonzentrationen entsprechend fünf abnehmende Werte, welche teils über und unter 50 % lagen.

Anhand dieser Werte wurde die GI₅₀ mithilfe folgender Formel ermittelt:

$$GI_{50} = \frac{(50 - [R\ddot{U} < 50\%]) + \left(\frac{[R\ddot{U} > 50\%] - [R\ddot{U} < 50\%]}{[SK \text{ bei } R\ddot{U} > 50\%] - [SK \text{ bei } R\ddot{U} < 50\%]} \right) \times [SK \text{ bei } R\ddot{U} > 50\%]}{\left(\frac{[R\ddot{U} > 50\%] - [R\ddot{U} < 50\%]}{[SK \text{ bei } R\ddot{U} > 50\%] - [SK \text{ bei } R\ddot{U} < 50\%]} \right)}$$

[R \ddot{U} >50%]: niedrigste Konzentration, bei der das o. g. Verhältnis (R \ddot{U}) noch > 50% war;

[R \ddot{U} <50%]: höchste Konzentration, bei der das o. g. Verhältnis (R \ddot{U}) schon < 50% war;

SK: Substratkonzentration.

LC₅₀-Werte (= Lethal Concentration for 50 % of exposed cells) wurden bei den verwendeten Substanzkonzentrationen in vielen Substanz-Konzentrations-Konstellationen nicht erreicht. Da bei mangelnder Anzahl und teils sogar komplettem Ausbleiben an erreichten LC₅₀-Werten ein (reliabler) Vergleich der Parameter nicht möglich ist, wird auf die Erläuterung des Algorithmus sowie die Darstellung der Auswertung in dieser Dissertation verzichtet.

Zur Berechnung und graphischen Darstellung wurden dieselben Programme wie zur Bestimmung des relativen Zell-Überlebens verwendet.

3.2.12.3 Bestimmung der Effekte der Substanzkombinationen

Durch Subtraktion des relativen Zell-Überlebens der Kontrolle (100 %) mit dem relativen Zell-Überleben nach Inkubation mit der jeweiligen Substanz in der jeweiligen Konzentration erhält man die Wachstumshemmung (GI, engl. Growth Inhibition⁶):

$$GI [\%] = 100 [\%] - R\ddot{U} [\%]$$

⁶ Im Hinblick auf eine allgemein gebräuchliche bzw. standardisierte Nomenklatur soll für den Terminus „Wachstumshemmung“ die Abkürzung GI (engl. Growth Inhibition) gelten

Das Ausmaß der Wachstumshemmung wurde in 3 verschiedene Kategorien bzw. Effektgruppen unterteilt. Die Berechnungen sowie graphische Darstellungen erfolgten ebenfalls mit o. g. Software.

1. Additiver/ supraadditiver Effekt

Definition

Die Wachstumshemmung (GI) durch die Kombination der Substanzen ist gleich (additiv) bzw. größer (supraadditiv) als die Summe der Wachstumshemmungen vom konventionellen Zytostatikum (KC⁷) und DCA in den jeweiligen Konzentrationen alleine.

Graphische Charakterisierung (s. Kap. 4.1.2):

Die mit den schwarzen Säulen (relatives Zell-Überleben nach Inkubation mit einem konventionellen Zytostatikum allein) in Gruppen stehenden grauen Säulen (das relative Zell-Überleben nach Inkubation mit DCA [10 oder 25 mmol/l] allein bzw. in Kombination mit einem konventionellen Zytostatikum) verkleinert sich bei zunehmender Konzentration des konventionellen Zytostatikums um mindestens den gleichen Wert, wie die schwarze Säule. Das Vorliegen dieses Effektes wird in den Graphen in Kap. 4.1.2 mit einem „+“ an der entsprechenden Säule dargestellt.

Mathematischer Algorithmus:

Wie bereits oben genannt, ist die Definition eines „additiven“ Effektes erfüllt, wenn die Wachstumshemmung der Substanzkombination ($GI_{\text{Kombination}}$) der Summe der Wachstumshemmungen der Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen allein entspricht:

$$GI_{\text{Kombination Definition additiv}} = GI_{\text{KC allein in Konzentration } X} + GI_{\text{DCA allein in Konzentration } Y}$$

Wie eingangs in diesem Kapitel genannt, erhält man die Wachstumshemmung aus der Subtraktion des relativen Zell-Überlebens der Kontrolle (100 %) mit dem relativen Zell-Überleben nach Inkubation mit der jeweiligen Substanz. Hieraus wiederum ergibt sich folglich:

$$GI_{\text{Komb. Def. add.}} = (R\ddot{U}_{\text{Kontr.}} - R\ddot{U}_{\text{KC allein in Konz. } X}) + (R\ddot{U}_{\text{Kontr.}} - R\ddot{U}_{\text{DCA allein in Konz. } Y})$$

In Bezug auf die in dieser Arbeit erhobenen Parameter liegt also ein additiver Effekt vor, wenn die tatsächliche bzw. in dieser Arbeit gemessene Wachstumshemmung durch Kombination ($GI_{\text{Kombination tats\ddot{a}chlich}}$) der Wachstumshemmung der Definition ($GI_{\text{Kombination Definition additiv}}$) entspricht:

$$GI_{\text{Kombination tats\ddot{a}chlich}} - GI_{\text{Kombination Definition additiv}} = 0$$

Die tatsächliche Wachstumshemmung durch Kombination erhält man analog zu den o. g.:

⁷ Folgend gilt dieses Akronym für den Begriff „konventionelles Zytostatikum“

$$GI_{\text{Kombination tatsächlich}} = R\ddot{U}_{\text{Kontrolle}} - R\ddot{U}_{\text{Kombination bei Konzentrationen X und Y}}$$

So ergibt sich:

$$0 = (R\ddot{U}_{\text{Kontrolle}} - R\ddot{U}_{\text{Kombination bei Konz. X und Y}}) - \left(\begin{array}{l} (R\ddot{U}_{\text{Kontrolle}} - R\ddot{U}_{\text{KC allein in Konz. x}}) \\ + (R\ddot{U}_{\text{Kontrolle}} - R\ddot{U}_{\text{DCA allein in Konz. Y}}) \end{array} \right)$$

Ist die Wachstumshemmung durch die Kombination vom konventionellen Zytostatikum mit DCA größer als die Summe der Wachstumshemmungen durch Einzel-Inkubation, so erhält man anhand dieser Formel einen Wert > 0 , womit die Kriterien der Definition eines supraadditiven (stärker als additiven) Effektes erfüllt sind.

Es wurden jedoch selten Werte > 10 ($\rightarrow >10\%$ höhere Wachstumshemmung durch Kombination als die Summe der Wachstumshemmungen nach Inkubation mit den Einzelsubstanzen) erreicht und unter Berücksichtigung der Variation der Ergebnisse (visualisiert durch die Fehlerbalken) ergaben sich hier i. d. R. keine relevanten Abgrenzungen zu den additiven Effekten. Aus diesem Grund wurde den supraadditiven Effekten in dieser Arbeit keine eigenständige Kategorie zugewiesen.

2. Nicht-additiver, nicht antagonistischer kombinatorischer (NANAK) Effekt⁸

Definition:

Die Kombination des konventionellen Zytostatikums mit DCA weist zwar eine stärkere Toxizität auf als die Substanzen alleine, jedoch beträgt die Wachstumshemmung durch Kombination weniger als die Summe der durch die Substanzen allein bedingten Wachstumshemmungen (womit die Definition eines additiven Effektes nicht erfüllt ist).

Graphische Charakterisierung

Die in Gruppen stehenden schwarzen und dazugehörigen grauen Säulen nähern sich bei zunehmender Konzentration des konventionellen Zytostatikums einander an.

Mathematische Analyse

Die beim additiven Effekt genannte Formel ergibt einen Wert < 0 und die beiden beim antagonistischen Effekt genannten Formeln (s. u.) ergeben jeweils Werte > 0 .

3. Antagonistischer Effekt

Definition

Die Kombination der Substanzen führt zu einer geringeren Wachstumshemmung als die Inkubation mit einer der Substanzen allein. Hierbei können zwei Fälle auftreten:

⁸ Der Übersichtlichkeit halber wird im Folgenden lediglich das Akronym NANAK-Effekt genannt.

1. Die Kombination des konventionellen Zytostatikums mit DCA führt zu einer geringeren Zytotoxizität bzw. Wachstumshemmung als die Inkubation mit dem konventionellen Zytostatikum allein. Diese Art eines antagonistischen Effektes wird fortan „Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ genannt.

2. Die Kombination von DCA mit dem konventionellen Zytostatikum führt zu einer geringeren Wachstumshemmung als die Inkubation mit DCA allein. Diese Konstellation soll fortan mit dem Terminus „Antagonismus gegenüber der DCA-Wirkung“ beschrieben werden. Gelegentlich zeichnete sich ein höheres relatives Zellüberleben nach Inkubation mit dem konventionellen Zytostatikum allein als in der Kontrolle ab (s. Zelllinie MNNG-HOS nach Inkubation mit Cisplatin). Daher gilt für die Erfüllung der Definition eines Antagonismus gegenüber der DCA-Wirkung die Einschränkung, dass die Zunahme des relativen Zellüberlebens durch Kombination mit dem konventionellen Zytostatikum größer sein muss als die Zunahme des relativen Zellüberlebens durch Inkubation mit dem konventionellen Zytostatikum allein in der entsprechenden Konzentration (zum Verständnis s. auch die Erklärung zur graphischen Charakterisierung).

Graphische Charakterisierung

Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung: Eine graue Säule ist größer als die dazugehörige schwarze Säule. Das Vorliegen dieses Effektes wird in den Graphen der folgenden Unterkapitel mit einem „I“ an der entsprechenden Säule dargestellt.

Antagonismus gegenüber der DCA-Wirkung: Eine graue Säule, welche das relative Zellüberleben nach Inkubation mit den Substanzkombinationen repräsentiert, ist länger als die entsprechende graue Säule, welche das relative Zellüberleben nach Inkubation mit DCA allein repräsentiert. Jedoch gilt, dass die Längenzunahme der grauen Säule größer sein muss als die Längenzunahme der dazugehörigen schwarzen Säule (vgl. Einschränkung der Definition). Das Vorliegen dieses Effektes wird in den Graphen der folgenden Unterkapitel mit einem „II“ an der entsprechenden Säule dargestellt.

Mathematische Analyse

Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung:

Im Umkehrschluss zur oben genannten Definition (und einen simpleren Algorithmus darstellend) ergibt sich: Das relative Zellüberleben nach Inkubation mit dem konventionellen Zytostatikum (in der Konzentration X) allein ist gleich oder niedriger als das relative Zellüberleben nach Inkubation mit der Kombination vom konventionellen Zytostatikum in der entsprechenden Konzentration und DCA (in Konzentration Y):

$$R\ddot{U}_{KC \text{ allein in Konz. } X} - R\ddot{U}_{\text{Kombination bei Konzentration } X \text{ und } Y} \leq 0$$

Antagonismus gegenüber der DCA-Wirkung:

Analog zum Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung ergibt sich:

$$R\ddot{U}_{DCA \text{ allein bei Konz. } Y} - R\ddot{U}_{Kombination \text{ bei Konzentration } X \text{ und } Y} \leq 0$$

Synergistische Effekte (welche sich durch eine überproportionale Zunahme der Zytotoxizität der Einzelsubstanzen durch Substanzkombination darstellen) wurden nicht beobachtet.

3.2.12.4 Korrelationsanalysen

Der Grad der Korrelationen und die Signifikanz zwischen den verschiedenen Parametern (mRNA-Expression und Sensibilität der acht getesteten Zelllinien gegenüber einer Substanz, etc.) wurden mittels des Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten nach Pearson als auch des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten errechnet. Hierfür und für die Erstellung der entsprechenden Graphen wurde ebenfalls die Software SigmaPlot verwendet. Letztere wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der In-vitro-Zytotoxizitätstests

4.1.1 Effekt der Substanzen allein

4.1.1.1 DCA

Durch Inkubation von DCA allein wurden keine GI₅₀ oder LC₅₀-Werte erreicht (Ausnahme: DAOY sowie MOLT4 bei 25 mmol/l DCA). Aus diesem Grund sind hier die relativen Zell-Überleben (RÜ, s. Kap. 3.2.12.1) aufgeführt:

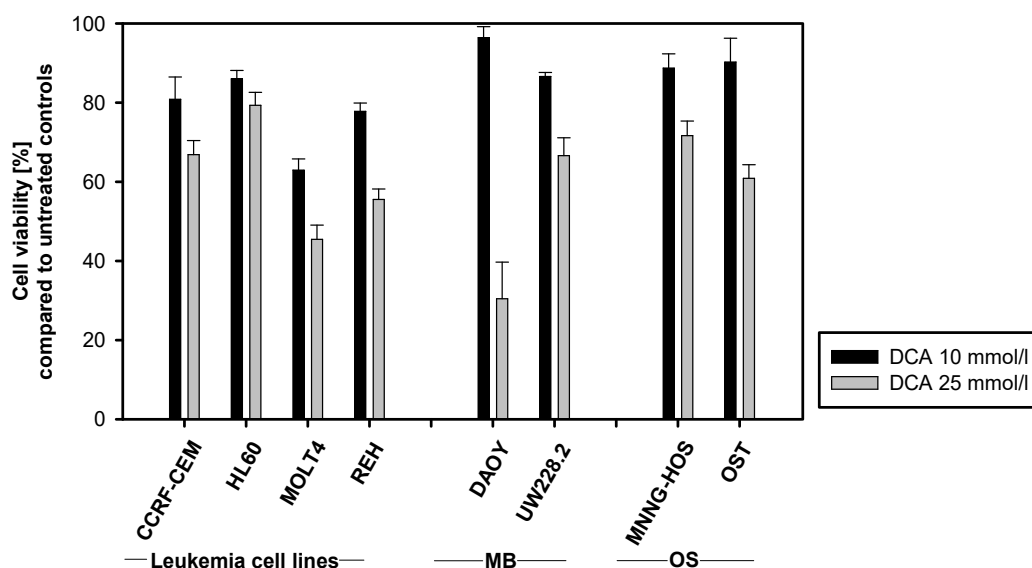


Abbildung 4.1: Relatives Überleben [%] der aufgeführten Zelllinien nach einer Inkubation von 72 Std. mit 10 und 25 mmol/l DCA in Bezug zur unbehandelten Kontrolle. Fehlerbalken = Standardabweichung, MB: Medulloblastom, OS: Osteosarkom. Anzahl der Versuche: CCRF-CEM $n = 19$, HL-60 $n = 17$, Molt4 $n = 24$, REH $n = 20$, DAOY $n = 17$, UW228.2 $n = 18$, MNNG-HOS: $n = 20$, OST $n = 15$

Bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l reagierten die Zelllinien der Entität Leukämie am sensibelsten. Der Mittelwert der relativen Zell-Überleben der vier Zelllinien dieser Entität betrug $77 \% \pm 2,4$. MOLT4 (relatives Zell-Überleben = 63 %) reagierte am sensibelsten auf die Behandlung mit 10 mM DCA.

Die Zelllinien der Entitäten Medulloblastom und Osteosarkom wiesen durch höhere relative Zell-Überleben eine höhere Resistenz gegenüber DCA auf. Das mittlere relative Zell-Überleben der Entität Medulloblastom lag bei 91 % (UW228.2: 87 %, DAOY: 96 %). Die relativen Zell-Überleben der Entität Osteosarkom lagen mit 89 % (MNNG-HOS) und 90 % (OST) innerhalb des Wertebereichs der Entität Medulloblastom.

Über alle Zelllinien gemittelt führte die alleinige Inkubation mit 10 mmol/l zu einem Abfall des relativen Zell-Überlebens auf 83,7 %.

Alle getesteten Zelllinien reagierten auf eine DCA-Konzentration von 25 mmol/l mit einem niedrigeren relativen Zell-Überleben als auf eine Konzentration von 10 mmol/l. Der Mittelwert der relativen Zell-Überleben aller Zelllinien betrug 60 % und lag somit um 24 % niedriger als nach Inkubation mit 10 mmol/l. Die Ausprägung dieser Differenz unterschied sich jedoch zwischen den verschiedenen Entitäten bzw. Zelllinien: Die relativen Zell-Überleben der Entität Leukämie standen bei einer DCA-Konzentration von 25 mmol/l in Bezug zu 10 mmol/l in einem weitestgehend konstanten Verhältnis zueinander (relatives Zell-Überleben bei 25 mmol/l im Mittel 15 % niedriger). Dies traf nicht auf die anderen Entitäten zu: Die Medulloblastom-Zelllinie DAOY, welche bei 10 mmol/l die höchste Resistenz unter allen getesteten Zelllinien aufwies (relatives Zell-Überleben: 96%), reagierte auf eine Konzentration von 25 mmol/l mit einem relativen Zell-Überleben von 30 % am sensibelsten. Erst dann folgen die Leukämie-Zelllinien MOLT4 (relatives Zell-Überleben: 45 %) und REH (relatives Zell-Überleben: 56 %).

4.1.1.2 Cisplatin

Die Substanz Cisplatin wirkte gegen alle in diesem Versuch verwendeten Zelllinien zytotoxisch. Mit Ausnahme von UW228.2 konnten bei allen Zelllinien GI_{50} -Werte in dem untersuchten Konzentrationsbereich bis einschließlich 100 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden (der Mittelwert der relatives Zell-Überleben von UW228.2 nach Inkubation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ lag bei $65,1 \pm 15,7 \%$, $n = 4$). Um die Unschärfe bei fehlendem GI_{50} von UW228.2 zu verringern, wurde bei der Errechnung des Mittelwertes sowie bei den Korrelationsanalysen für diese Zelllinie eine GI_{50} von 100 $\mu\text{mol/l}$ angegeben. Die GI_{50} -Werte der Leukämie-Zelllinien lagen mit einem Wertebereich von 53 (REH) bis 59 $\mu\text{mol/l}$ (MOLT4) relativ nah beieinander und gleichzeitig leicht unter dem Mittelwert aller getesteten Zelllinien ($\bar{x} = 65 \%$; s. „Mean“ auf Abbildung 4.2). Eine weniger sensible Entität stellte das Osteosarkom dar, deren getestete Zelllinien GI_{50} -Werte von 67 (MNNG-HOS) bzw. 77 (OST) $\mu\text{mol/l}$ aufwiesen.

Obwohl die Leukämie-Zelllinien, wie bei Inkubation mit DCA (zumindest bei 10 mmol/l), auch gegenüber Cisplatin die höchste Sensibilität zeigten, konnte bei den getesteten Zelllinien keine Korrelation zwischen den GI_{50} -Parametern bei Cisplatin und den Variabilitätsraten nach Inkubation mit DCA (10 und 25 mmol/l) festgestellt werden (weder mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson noch mit der Rangkorrelation nach Spearman).

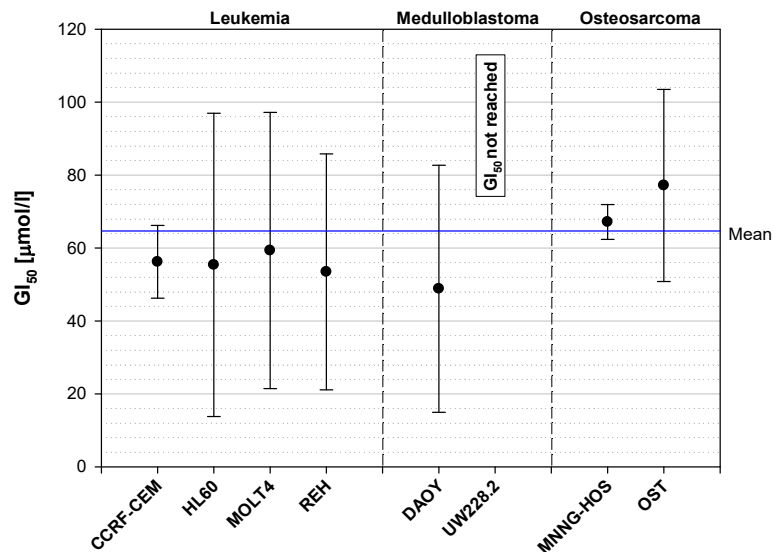


Abbildung 4.2: Lineare Darstellung der GI₅₀ von Cisplatin bei den verschiedenen Zelllinien. Fehlerbalken = Standardabweichung; angezeigt ist der Mittelwert von n Versuchswiederholungen: CCRF-CEM n = 3, HL-60 n = 3, MOLT4 n = 4, REH n = 4, DAOY n = 4, UW228.2 GI₅₀ bei n = 4 jeweils nicht erreicht, MNNG-HOS n = 4, OST n = 3

4.1.1.3 Doxorubicin

Die GI₅₀-Werte für Doxorubicin konnten für alle getesteten Zelllinien in dem untersuchten Konzentrationsbereich (bis 10 µmol) ermittelt werden. Der Mittelwert aller Zelllinien betrug 0,9 µmol/l. Auch gegenüber Doxorubicin waren die Leukämie-Zelllinien am sensibelsten (Wertebereich von 0,02 [REH] bis 0,52 µmol/l [CCRF-CEM]). Die Osteosarkom-Zelllinien wiesen die geringste Sensibilität auf (GI₅₀ MNNG-HOS: 2,59 µmol/l; GI₅₀ OST: 1,82 µmol/l). Die ermittelten GI₅₀-Konzentrationen zeigten so insgesamt Differenzen um das 119fache (zwischen REH und MNNG-HOS, s. o.). Auch hier zeigten sich zwischen den GI₅₀-Parametern bei Doxorubicin und den relativen Zell-Überleben nach Inkubation mit DCA – sowohl bei einer Konzentration von 10 als auch 25 mmol/l – keine Korrelationen.

Es konnte jedoch eine Korrelation zwischen dem Ansprechen der Zelllinien auf Cisplatin (welches die DNA platinert, u. a. zu DNA-Strang-Querverknüpfungen führt, die Bildung von ROS stimuliert [190] und über ATP-Binding-Cassette (ABC)-Transporter ausgeschleust wird [200]) und Doxorubicin (welches mit der DNA interkaliert, u. a. die Topoisomerase I und II hemmt und ebenfalls über ABC-Transporter ausgeschleust wird [201]) festgestellt werden (r = 0,781, p = 0,0382, Korrelation nach Pearson).

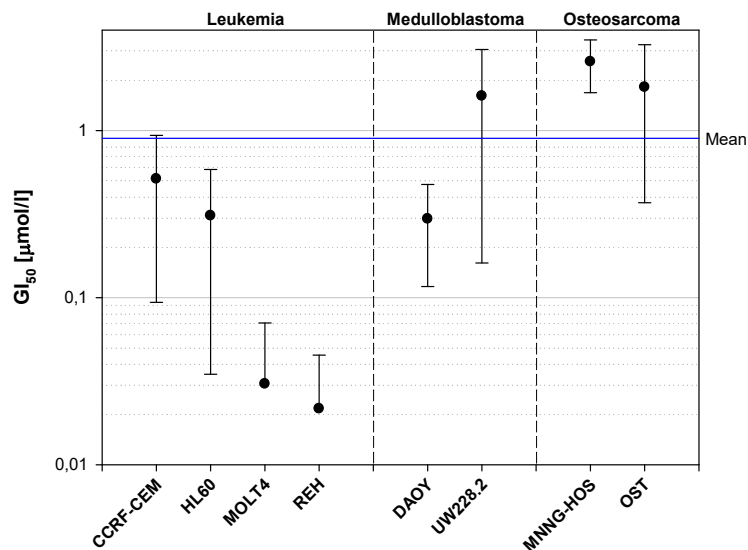


Abbildung 4.3: Logarithmische Darstellung der GI₅₀ von Doxorubicin bei den verschiedenen Zelllinien. Fehlerbalken = Standardabweichung; angezeigt ist der Mittelwert von n Versuchswiederholungen: CCRF-CEM n = 4, HL-60 n = 3, MOLT4 n = 3, REH n = 4, DAOY n = 3, UW228.2 n = 4, MNNG-HOS n = 4, OST n = 3

4.1.1.4 Etoposid

Analog zu den Testungen von Cisplatin und Doxorubicin waren die leukämischen Zelllinien gegenüber Etoposid am sensibelsten (Wertebereich der GI₅₀ von 0,19 µmol/l [REH] bis 2,43 µmol/l [CCRF-CEM]); die Medulloblastom-Zelllinie DAOY zeigte sich als Etoposid-sensitiver Phänotyp (GI₅₀ = 0,7 µmol/l), während UW228.2 resistenter gegenüber Etoposid auftrat (GI₅₀ = 26,8 µmol/l). Die beiden Osteosarkom-Zelllinien wiesen für MNNG-HOS eine GI₅₀ von 4,66 µmol/l und für OST eine GI₅₀ von 3,65 µmol/l auf. Der Hemmer der Topoisomerase II und Induzierer von DNA-Einzelstrang- und -Doppelstrangbrüchen korrelierte in seiner Zytotoxizität signifikant mit Cisplatin ($r = 0,777$, $p = 0,0398$, Korrelationskoeffizient nach Pearson) und Doxorubicin ($r_s = 0,929$, $p < 0,001$, Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient), welche ihre Wirkung ebenfalls über Interaktionen mit der DNA hervorrufen (s. o.).

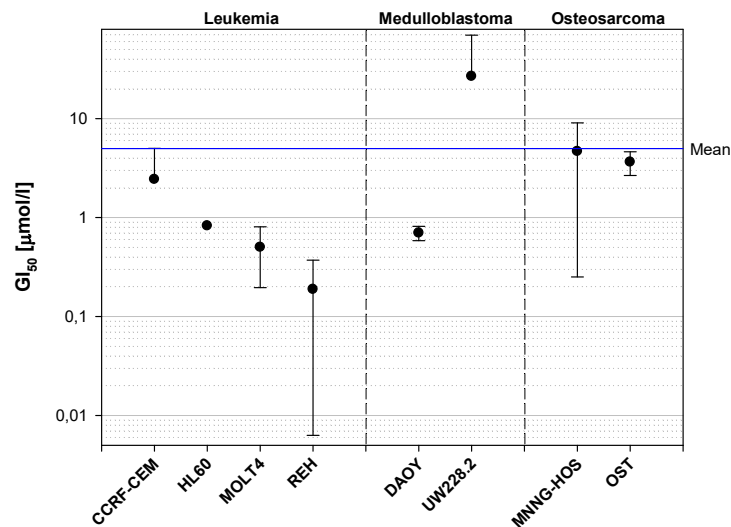


Abbildung 4.4: Logarithmische Darstellung der GI_{50} von Etoposid bei den verschiedenen Zelllinien. Fehlerbalken = Standardabweichung; angezeigt ist der Mittelwert von n Versuchswiederholungen: CCRF-CEM $n = 3$, HL-60 GI_{50} bei $n = 3$ nur 1mal erreicht, MOLT4 $n = 4$, REH $n = 4$, DAOY $n = 3$, UW228.2 $n = 4$, MNNG-HOS $n = 4$, OST $n = 3$

4.1.1.5 SN38

Die Sensibilität der getesteten Zelllinien gegenüber SN38, welches sich dem Komplex aus DNA-Topoisomerase I und DNA anlagert und somit zu DNA-Doppelstrangbrüchen führt, korrelierte stark mit derjenigen gegenüber Etoposid (Hemmer der Topoisomerase II, führt ebenfalls zu DNA-Strangbrüchen). Dies spiegelt sich einerseits durch den Vergleich der Abbildung 4.4 mit Abbildung 4.5 wider als auch durch hohe Korrelationskoeffizienten nach Pearson ($r = 0,993$) sowie Spearman ($r_s = 0,976$) bei hoher Signifikanz (p jeweils $< 0,001$). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die GI_{50} -Werte für SN38 im Schnitt um 2 Log-Stufen niedriger lagen (Mittelwert der GI_{50} -Werte für Etoposid: $4,97 \mu\text{mol/l}$, Mittelwert der GI_{50} -Werte für SN38: $0,05 \mu\text{mol/l}$).

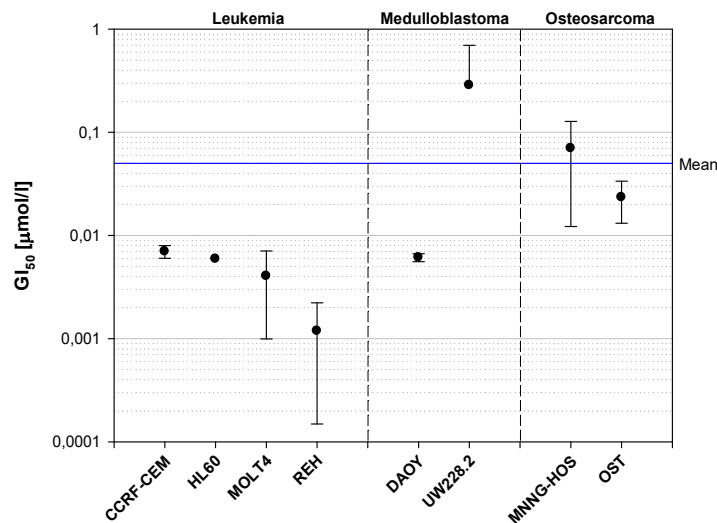


Abbildung 4.5: Logarithmische Darstellung der GI₅₀ von SN38 bei den verschiedenen Zelllinien. Fehlerbalken = Standardabweichung; angezeigt ist der Mittelwert von n Versuchswiederholungen: CCRF-CEM n = 3, HL-60 GI₅₀ bei n = 3 nur 1mal erreicht, MOLT4 n = 3, REH n = 4, DAOY n = 3, UW228.2 n = 3, MNNG-HOS n = 4, OST n = 3

4.1.1.6 Temozolomid

Das Alkylanz Temozolomid wies von den anderen in diesem Kapitel aufgeführten konventionellen Zytostatika grundsätzlich abweichende zytotoxische Parameter auf: Die Zelllinien der Entität Leukämie zeigten die höchsten GI₅₀-Werte (von 406 µmol/l (REH) bis 723 µmol/l (MOLT4)), die Zelllinien der Entitäten Medulloblastom und Osteosarkom waren sensibler. Unter den beiden letztgenannten Entitäten war die Zelllinie UW228.2 jedoch auch hier die resistanteste (GI₅₀: 245 µmol/l). Es bestand eine signifikante negative Korrelation zwischen der Sensibilität der Zelllinien gegenüber Temozolomid (repräsentiert durch die GI₅₀ der Zelllinien) und DCA bei 10 mmol/l (repräsentiert durch das relative Zell-Überleben, vgl. Kap. 4.1.1.1): Korrelationskoeffizient nach Pearson = -0,731, p = 0,0392; Korrelation nach Spearman = -0,905, p = < 0,001).

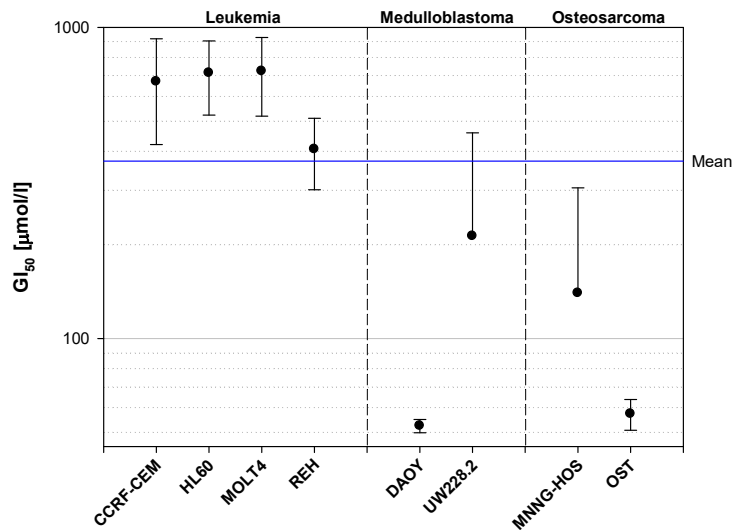


Abbildung 4.6: Logarithmische Darstellung der GI₅₀ von Temozolomid bei den verschiedenen Zelllinien. Fehlerbalken = Standardabweichung; angezeigt ist der Mittelwert von n Versuchswiederholungen: CCRF-CEM n = 4, HL-60 n = 3, MOLT4 n = 5, REH n = 4, DAOY n = 3, UW228.2 n = 3, MNNG-HOS n = 4, OST n = 3

4.1.1.7 Übersicht der Korrelationen

	GI ₅₀ Doxorubicin	GI ₅₀ Etoposid	GI ₅₀ SN38	RÜ DCA [10 mmol/l]
GI ₅₀ Cisplatin	<u>Pearson</u> r: 0,781 p: 0,0382	<u>Pearson</u> r: 0,777 p: 0,0398		
GI ₅₀ Doxorubicin		<u>Spearman</u> r _s : 0,929 p: 0,2 x 10 ⁻⁶	<u>Spearman</u> r _s : 0,905 p: 0,2 x 10 ⁻⁶	
GI ₅₀ Etoposid			<u>Pearson</u> r: 0,993 p: 0,912 x 10 ⁻⁶ <u>Spearman</u> r _s : 0,976 p: 0,2 x 10 ⁻⁶	
GI ₅₀ Temozolomid				<u>Pearson</u> r: -0,731 p: 0,0392 <u>Spearman</u> r _s : -0,905 p: 0,2 x 10 ⁻⁶

Tabelle 4: Tabellarische Übersicht der signifikanten (p < 0,05) Korrelationen nach Pearson und Spearman bezüglich der Toxizität der verwendeten Substanzen; RÜ: relatives Zell-Überleben

4.1.2 Effekt der Kombinationen

4.1.2.1 Überblick

Eine detaillierte nach Substanzkombination und Zelllinie sortierte tabellarische Darstellung der Ergebnisse des in Kap. 3.2.12.3 aufgeführten Algorithmus befindet sich in Unterkapitel 9.1 (Anhang). Der Übersichtlichkeit halber ist in diesem Kapitel lediglich eine tabellarische Zusammenfassung dieser Ergebnisse aufgeführt und dies auch nur, wenn diese Effekte überhaupt in relevanter Anzahl auftraten.

Additive/supraadditive Effekte traten bei den hier analysierten 400 Kombinationstestungen (8 Zelllinien \times 5 unterschiedliche konventionelle Zytostatika \times 5 verschiedene Konzentrationen des jeweiligen konventionellen Zytostatikum \times 2 divergierende Konzentrationen von DCA) in insgesamt $71 = 17,75\%$ der Fälle auf. Dabei fanden sich diese Effekte in 35 Fällen bei einer DCA-Kombination von 10 mmol/l sowie in 36 Fällen bei einer Konzentration von 25 mmol/l. Hiervon kam es in 17 Fällen zu einer supraadditiven Wachstumshemmung von $\geq 5\%$ (davon 12 Fälle bei 10 mmol/l sowie 5 Fälle bei 25 mmol/l DCA). In 6 Fällen kam es zu einer supraadditiven Wachstumshemmung von $\geq 10\%$ (4 davon bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l und 2 davon bei einer Konzentration von 25 mmol/l). Eine detailliertere substanz- und zelllinienspezifische Analyse erfolgt in den folgenden Unterkapiteln.

Antagonistische Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum zeigten sich von den insgesamt 400 Kombinationstestungen (s. o.) in 41 Fällen (25 hiervon bei 10 mmol/l sowie 16 hiervon bei 25 mmol/l DCA). In 14 dieser Fälle kam es zu Herabsetzungen der Toxizität des konventionellen Zytostatikums von $\geq 5\%$ (8 bei 10 mmol/l sowie 6 bei 25 mmol/l DCA) und in 5 Fällen zu entsprechenden Wirkungsverlusten von $\geq 10\%$ (2 Fälle hiervon bei 10 mmol/l sowie 3 Fälle bei 25 mmol/l DCA). Diese Effekte traten lediglich bei den Zelllinien der Entitäten Medulloblastom sowie Osteosarkom auf – bei den Leukämie-Zelllinien fanden sich keine antagonistischen Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum. Anzahl und Ausmaß dieser Effekte waren nicht nur abhängig von der Zelllinie, sondern auch vom verwendeten konventionellen Zytostatikum (s. folgende Unterkapitel).

Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung hingegen zeigten sich in insgesamt 32 Fällen der 400 Kombinationstestungen: In 18 Fällen bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l sowie in 14 Fällen bei 25 mmol/l DCA. In 9 dieser Fälle zeigten sich Abschwächungen der Zytotoxizität $\geq 2\%$ (5 bei 10 mmol/l sowie 4 bei 25 mmol/l DCA). In einer Kombinationstestung (bei 10 mmol/l DCA) ergab sich eine Zytotoxizitätsreduktion um $\geq 4\%$. Werte $\geq 5\%$ wurden nicht erreicht.

Auch zu den Ergebnissen dieses Algorithmus findet man eine detaillierte Darstellung im Anhang.

Wie den Balkendiagrammen in den folgenden Unterkapiteln zu entnehmen ist, zeichnete sich in allen getesteten Zelllinien weitgehend eine dosisabhängige Zytotoxizität für die verwendeten konventionellen Zytostatika und DCA ab (= je höher die jeweilige Konzentration, umso geringer das Zell-Überleben).

4.1.2.2 Effekt der Kombination von DCA und Cisplatin

Für die Kombination von Cisplatin mit DCA zeigten sich insgesamt 27 **additive/ supraadditive Effekte** bei den insgesamt 80 Kombinationstestungen⁹. 13 davon traten bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l auf, 14 zeigten sich bei einer DCA-Konzentration von 25 mmol/l (s. Tabelle). Sowohl bei 10 als auch bei 25 mmol/l DCA traten diese Art von Effekt numerisch am häufigsten bei einer Cisplatin-Konzentration von 1 µmol/l – bzw. einem molaren Verhältnis von 1:10.000 respektive 1:25.000 – auf (s. entsprechende Markierungen an den Graphen). Supraadditive Effekte von ≥ 10 % traten bei dieser Cisplatin-Konzentration jedoch lediglich einmal auf (Zelllinie: MNNG-HOS, DCA-Konzentration: 25 mmol/l), während diese bei 10 µmol/l zweimal auftraten (Zelllinie MNNG-HOS, DCA-Konzentration: 10 sowie 25 mmol/l; s. auch Kap. 9.1.1).

Cisplatin-Konzentration [µmol/l]	10 mmol/l DCA				25 mmol/l DCA			
	Molares Verhältnis KC : DCA	Effekte insg.	Effekte ≥5%	Effekte ≥10%	Molares Verhältnis KC : DCA	Effekte insg.	Effekte ≥5%	Effekte ≥10%
0,01	1:1.000.000	3			1:2.500.000	4		
0,1	1:100.000	2	1 (DAOY)		1:250.000	3		
1	1:10.000	4	1 (DAOY)		1:25.000	5	1 (MNNG-HOS)	1 (MNNG-HOS)
10	1:1.000	3	1 (MNNG-HOS)	1 (MNNG-HOS)	1:2.500	2	1 (MNNG-HOS)	1 (MNNG-HOS)
100	1:100	1			1:250			

Tabelle 5: Zusammenfassung der additiven/ supraadditiven Effekte bei den 8 verwendeten Zelllinien

Ein **Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung** zeichnete sich lediglich bei der Zelllinie OST bei der Substanzkombinationskonstellation von Cisplatin 10 µmol/l und DCA 10 mmol/l ab (Wirkungsabschwächung von Cisplatin von 2,9 %).

Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung ergaben sich bei den 80 Kombinationstestungen insgesamt 9-mal: 7-mal bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l, 2-mal bei einer DCA-Konzentration von 25 mmol/l (s. entsprechende Markierungen an den Graphen).

⁹ ← 8 Zelllinien x 5 verschiedene Konzentrationen des jeweiligen konventionellen Zytostatikums x 2 divergierende Konzentrationen von DCA

Leukämie-Zelllinien

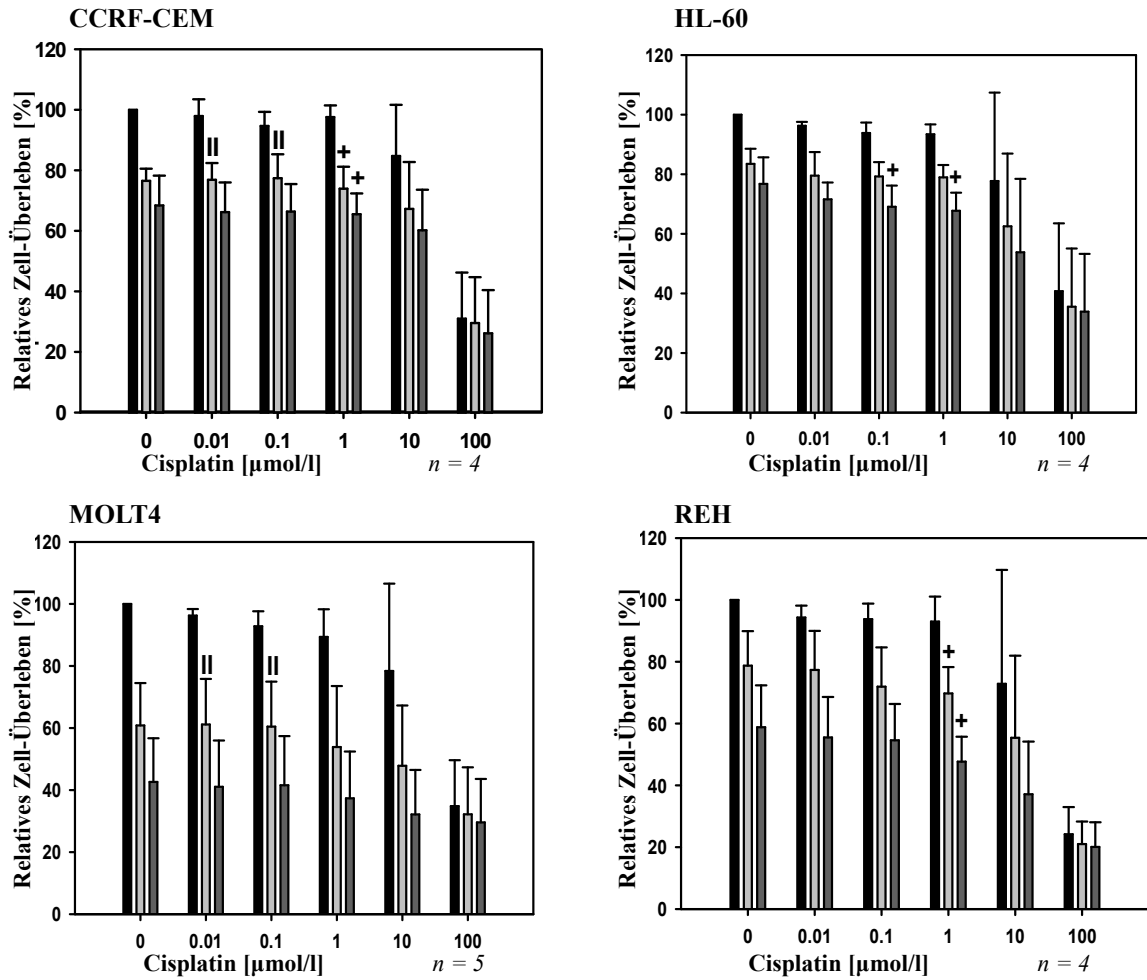


Abbildung 4.7: Kombination von DCA und Cisplatin in den verschiedenen Leukämie-Zelllinien

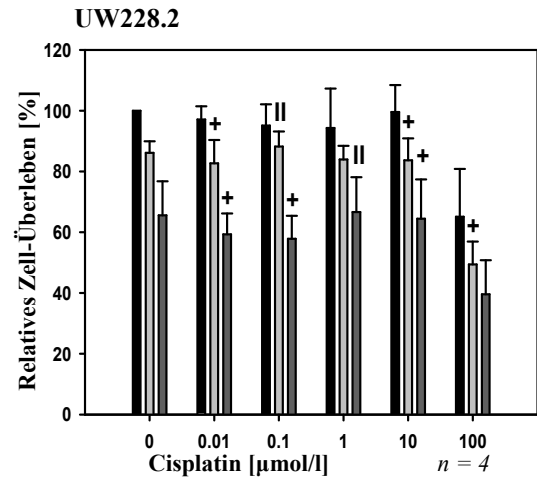
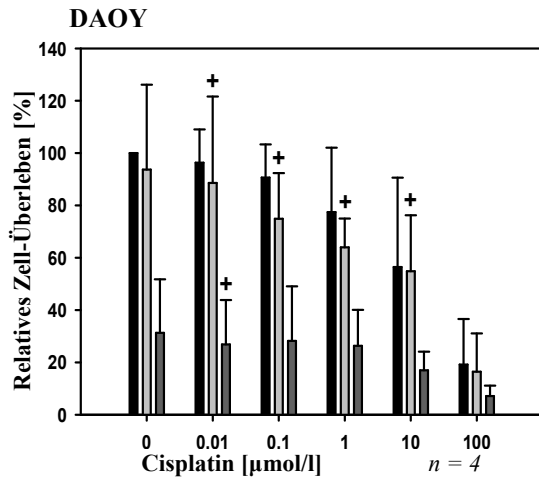
Relatives Zell-Überleben: Definition s. Kap. 3.2.12.158

n: Unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze

+: additiver/ supraadditiver Effekt; I: antagon. Effekt gegenüber dem KC; II: antagon. Effekt gegenüber DCA

■: Cisplatin alleine; □: Cisplatin + 10 mmol/l DCA; ▒: Cisplatin + 25 mmol/l DCA

Medulloblastom-Zelllinien



Osteosarkom-Zelllinien

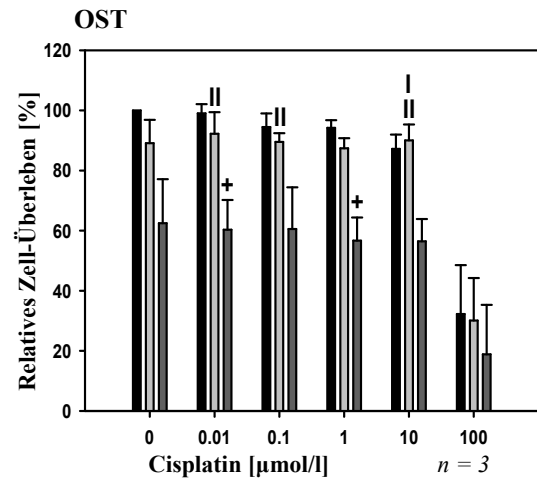
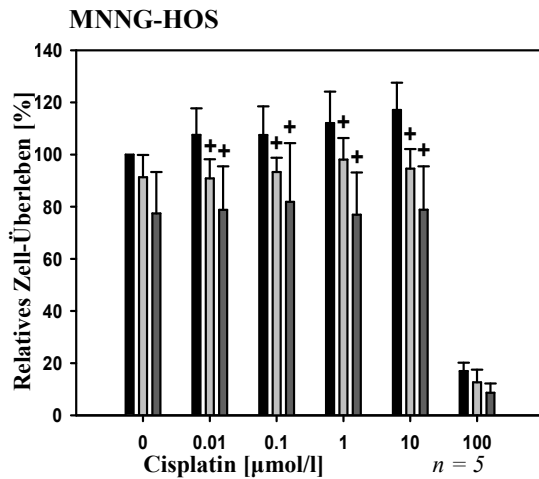


Abbildung 4.8: Kombination von DCA und Cisplatin in den in den jeweiligen Zelllinien der Entitäten Medulloblastom und Osteosarkom

Relatives Zell-Überleben: Definition s. Kap. 3.2.12.158

n : Unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze

+: additiver/ supraadditiver Effekt; I: antag. Effekt gegenüber dem KC; II: antag. Effekt gegenüber DCA

■: Cisplatin alleine; □: Cisplatin + 10 mmol/l DCA; ▒: Cisplatin + 25 mmol/l DCA

4.1.2.3 Effekt der Kombination von DCA und Doxorubicin

Für die Kombination von Doxorubicin mit DCA zeigten sich insgesamt lediglich in 5 von 80 Fällen **additive/ supraadditive Effekte**. Vier dieser Effekte traten auf bei einer Doxorubicin-Konzentration von 0,01 $\mu\text{mol/l}$: Jeweils zwei davon bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l (= molares Verhältnis von 1:1.000.000, Zelllinien: DAOY und OST) sowie 25 mmol/l (= molares Verhältnis von 1:2.500.000, Zelllinien: DAOY und MNNG-HOS). Eine zusätzliche Wachstumshemmung $\geq 5\%$ (6,85 %) ergab sich lediglich bei der Zelllinie DAOY bei 0,01 $\mu\text{mol/l}$ und 10 mmol/l DCA. Der fünfte additive/ supraadditive Effekt zeigte sich bei der Zelllinie HL-60 in der Konstellation mit 0,001 $\mu\text{mol/l}$ Doxorubicin bei 25 mmol/l DCA (4,9 %).

Antagonistische Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum ergaben sich bei den 80 Kombinationstestungen insgesamt 4-mal: In der Zelllinie DAOY bei 10 mmol/l DCA und 0,1 sowie 1 $\mu\text{mol/l}$ Doxorubicin, außerdem in der Zelllinie OST bei 10 $\mu\text{mol/l}$ Doxorubicin mit 10 sowie 25 mmol/l DCA. Die maximale Wirkungsabschwächung betrug hier 1,1 % (vgl. Kap. 9.1.2).

Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung ergaben sich insgesamt 5- von 80-mal (s. entsprechende Markierungen an den Graphen). Eine niedrigere Wachstumshemmung in Bezug zum Effekt von DCA allein von $\geq 2\%$ zeigte sich lediglich einmal bei der Zelllinie MNNG-HOS (DCA: 25 mmol/l , Doxorubicin: 0,001 $\mu\text{mol/l}$).

Leukämie-Zelllinien

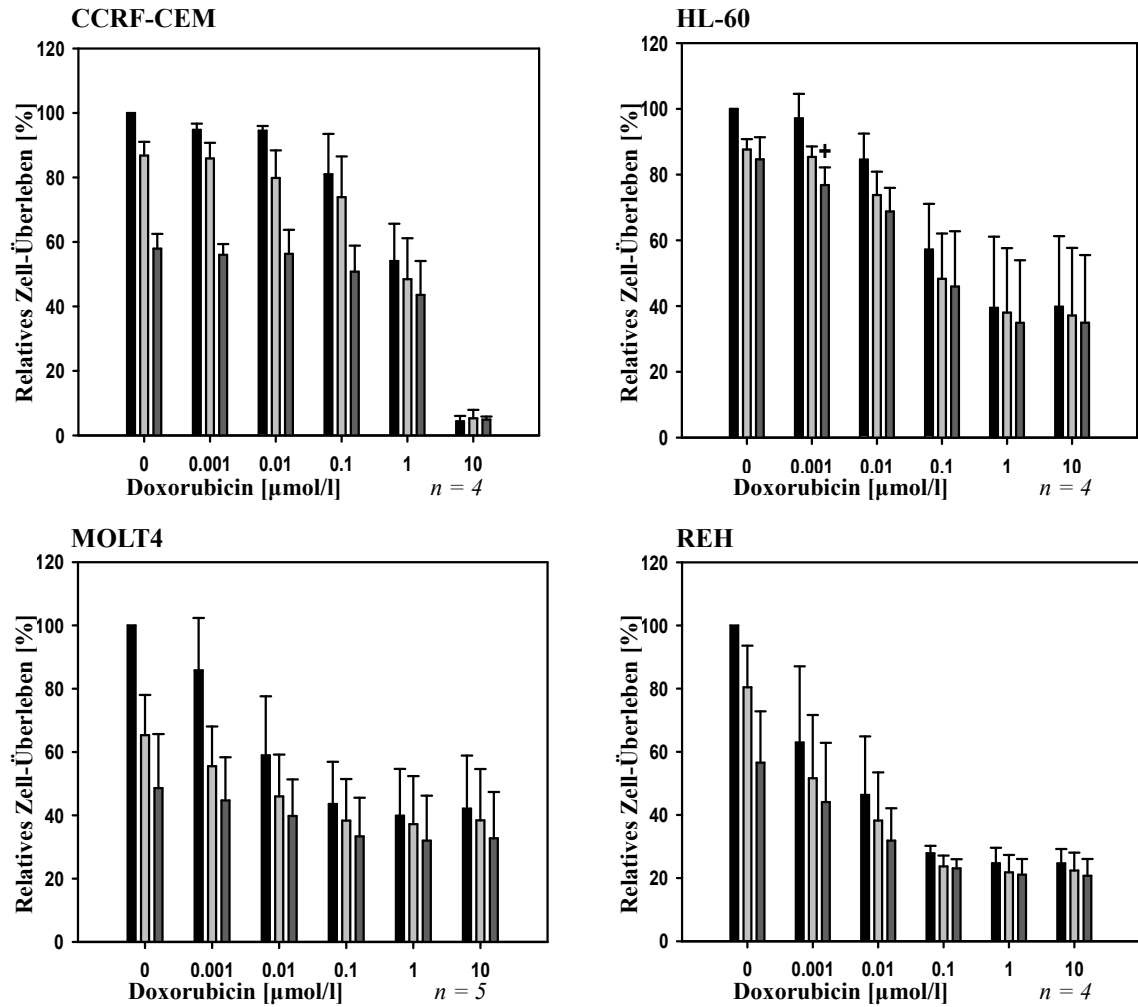
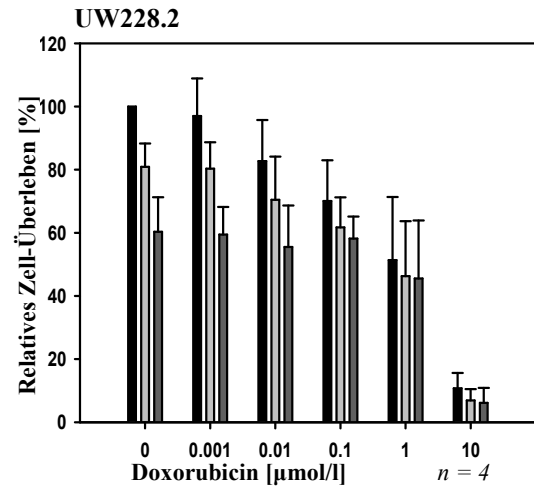
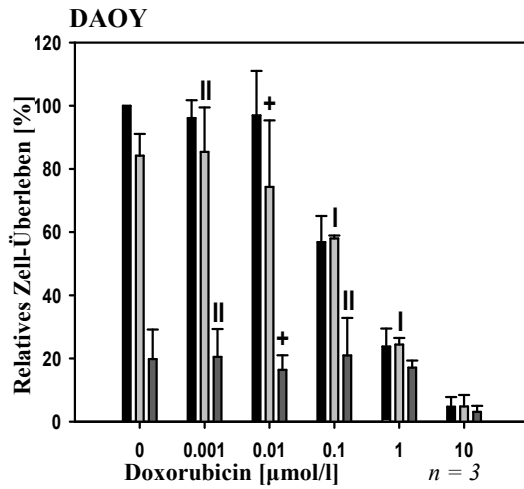


Abbildung 4.9: Kombination von DCA und Doxorubicin in den verschiedenen Leukämie-Zelllinien
 Relatives Zell-Überleben: Definition s. Kap. 3.2.12.158
 n: Unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze
 +: additiver/ supraadditiver Effekt; I: antag. Effekt gegenüber dem KC; II: antag. Effekt gegenüber DCA
 ■: Doxorubicin alleine; □: Doxorubicin + 10 mmol/l DCA; ▒: Dox. + 25 mmol/l DCA

Medulloblastom-Zelllinien



Osteosarkom-Zelllinien

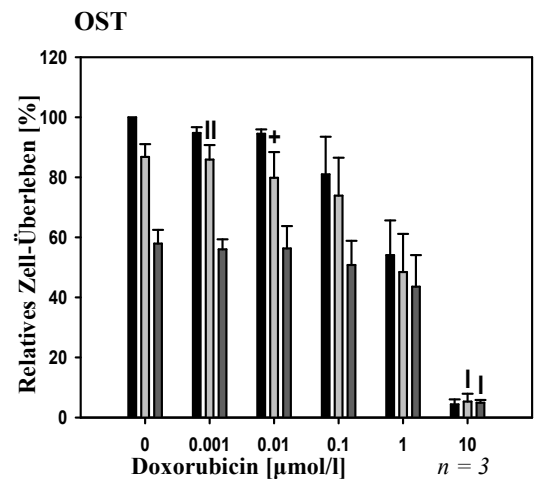
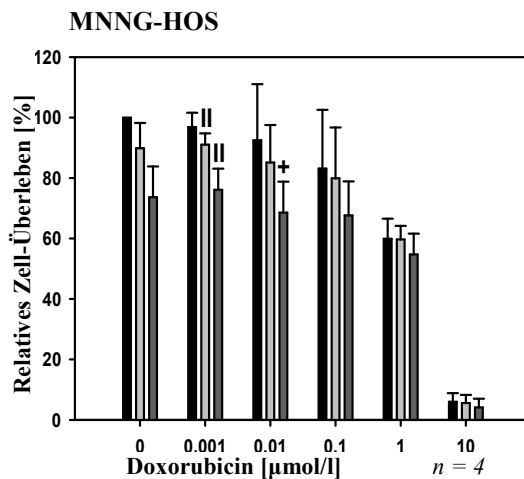


Abbildung 4.10: Kombination von DCA und Doxorubicin in den in den jeweiligen Zelllinien der Entitäten Medulloblastom und Osteosarkom

Relatives Zell-Überleben: Definition s. Kap. 3.2.12.158

n: Unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze

+: additiver/ supraadditiver Effekt; I: antag. Effekt gegenüber dem KC; II: antag. Effekt gegenüber DCA

■: Doxorubicin alleine; □: Doxorubicin + 10 mmol/l DCA; ▒: Dox. + 25 mmol/l DCA

4.1.2.4 Effekt der Kombination von DCA und Etoposid

Additive/ supraadditive Effekte ergaben sich für die Kombination von Etoposid mit DCA in 12 von den 80 Fällen: 7-mal bei 10 mmol/l DCA und 5-mal bei 25 mmol/l. Die molaren Verhältnisse 1:1.000.000, 1: 2.500.000 und 1:100.000 schienen durch ein Auftreten dieser Effekte in jeweils 3 Zelllinien besonders günstig für eine produktive Interaktion der Substanzen zu sein (zur Zuordnung zu den Zelllinien s. entsprechende Markierung an den Graphen). Insbesondere die Zelllinie DAOY schien auf die Kombination aus Etoposid und DCA sensibel zu reagieren: Bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l fand sich in Kombination mit 0,01 µmol/l Etoposid eine supraadditive Wachstumshemmung von 19 % sowie in Kombination mit 0,1 µmol/l eine entsprechende Wachstumshemmung von 16 %.

Etoposid-Konzentration [µmol/l]	10 mmol/l DCA				25 mmol/l DCA			
	Molares Verhältnis KC : DCA	Effekte insg.	Effekte ≥5%	Effekte ≥10%	Molares Verhältnis KC : DCA	Effekte insg.	Effekte ≥5%	Effekte ≥10%
0,01	1:1.000.000	3	1 (DAOY)	1 (DAOY)	1:2.500.000	3		
0,1	1:100.000	3	2 (DAOY, UW228.2)	1 (DAOY)	1:250.000	1		
1	1:10.000	1			1:25.000	1		
10	1:1.000				1:2.500			
100	1:100				1:250			

Tabelle 6: Zusammenfassung der additiven/ supraadditiven Effekte bei den 8 verwendeten Zelllinien

Antagonistische Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum ergaben sich insgesamt in 19 von den 80 Fällen: 11 Fälle bei 10 mmol/l DCA sowie 8 Fälle bei 25 mmol/l DCA. Besonders ungünstig für eine Zytotoxizität waren die molaren Verhältnisse 1:1000 sowie 1:2500: Hier zeigten sich nicht nur numerisch, sondern auch qualitativ die relevantesten Wirkungsabschwächungen. Der stärkste „Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ fand sich bei DCA 25 mmol/l und Etoposid 10 µmol/l in der Zelllinie OST (Wirkungsabschwächung gegenüber Etoposid alleine: 16,9 %). Der zweitstärkste entsprechende Effekt ergab sich in derselben Zelllinie und Etoposidkonzentration bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l mit einer Wirkungsabschwächung von 12,7 %. Bei Etoposidkonzentrationen von 0,01 sowie 0,1 µmol/l wurden keine antagonistischen Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum beobachtet. Wie eingangs erwähnt, fanden sich diese generell bzw. über alle Konzentrationsschemata ebenso nicht in den Leukämie-Zelllinien (s. auch Kap. 9.1.3).

Etoposid-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	10 mmol/l DCA				25 mmol/l DCA			
	Molares Verhältnis KC : DCA	Effekte insg.	Effekte $\geq 5\%$	Effekte $\geq 10\%$	Molares Verhältnis KC : DCA	Effekte insg.	Effekte $\geq 5\%$	Effekte $\geq 10\%$
0,01	1:1.000.000				1:2.500.000			
0,1	1:100.000				1:250.000			
1	1:10.000	3	1 (DAOY)		1:25.000	1		
10	1:1.000	4	3 (OST, MNNG-HOS, UW228.2)	2 (OST, MNNG-HOS)	1:2.500	4	3 (OST, UW228.2, MNNG-HOS)	2 (OST, UW228.2),
100	1:100	4			1:250	3	1 (UW228.2)	1 (UW228.2)

Tabelle 7: Zusammenfassung der antagonistischen Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum bei den 8 verwendeten Zelllinien

Es fanden sich keine „Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung“ für die Kombinationsversuche von DCA mit Etoposid.

Leukämie-Zelllinien

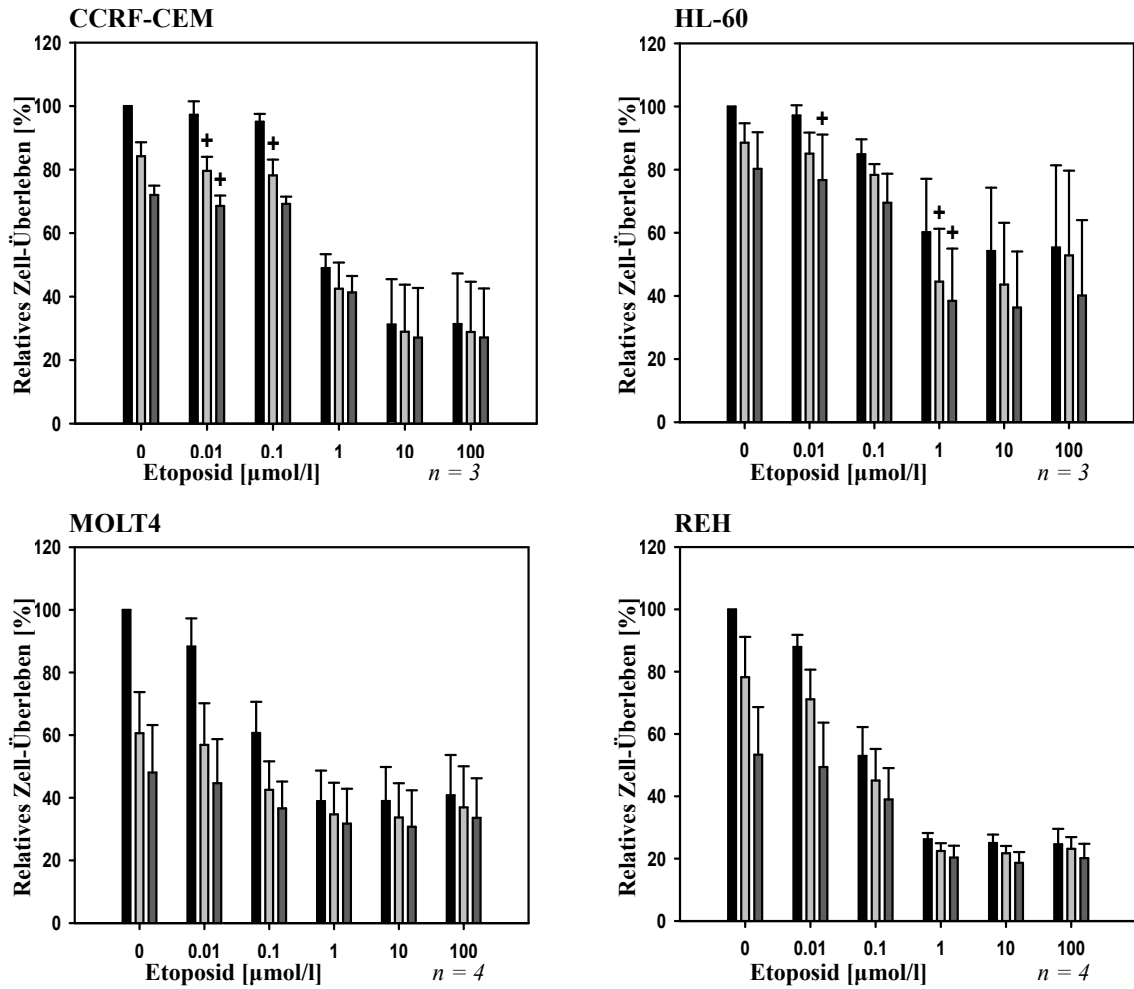


Abbildung 4.11: Kombination von DCA und Etoposid in den verschiedenen Leukämie-Zelllinien

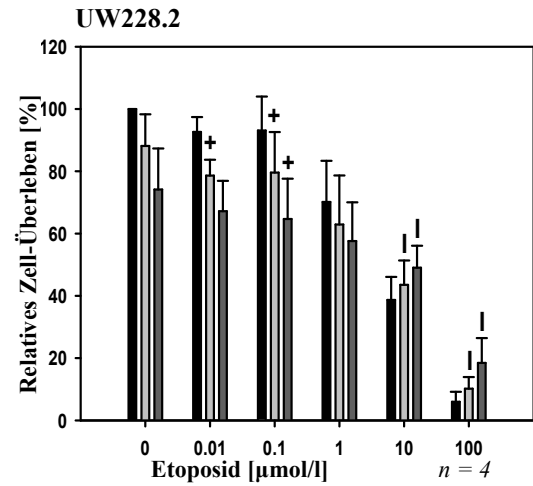
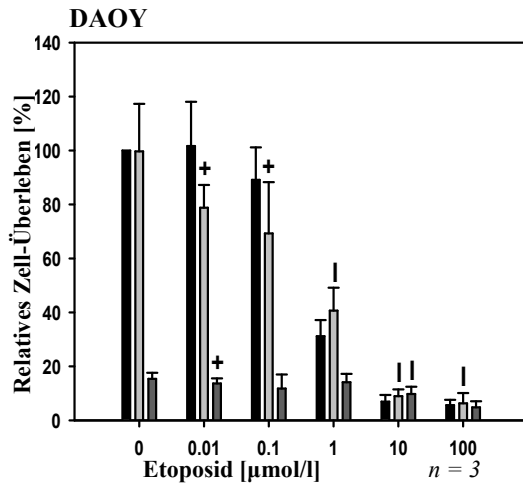
Relatives Zell-Überleben: Definition s. Kap. 3.2.12.158

n: Unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze

+: additiver/ supraadditiver Effekt; I: antag. Effekt gegenüber dem KC; II: antag. Effekt gegenüber DCA

■: Etoposid alleine; □: Etoposid + 10 mmol/l DCA; ▒: Etoposid + 25 mmol/l DCA

Medulloblastom-Zelllinien



Osteosarkom-Zelllinien

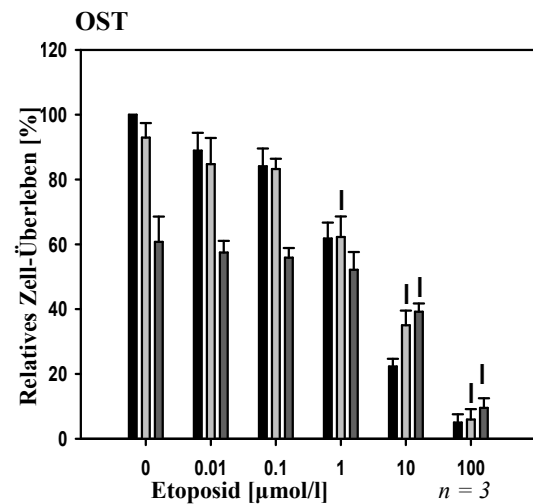
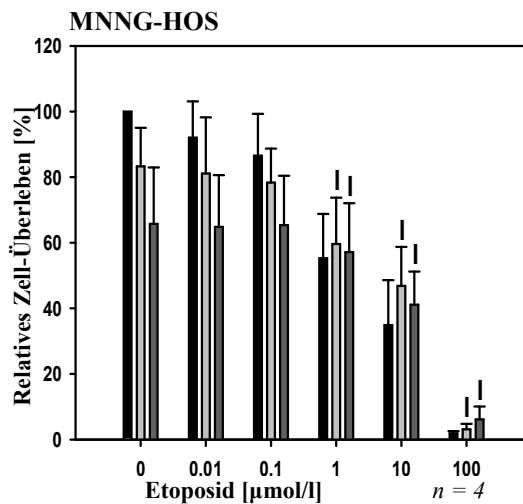


Abbildung 4.12: Kombination von DCA und Etoposid in den in den jeweiligen Zelllinien der Entitäten Medulloblastom und Osteosarkom

Relatives Zell-Überleben: Definition s. Kap. 3.2.12.158

n : Unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze

+: additiver/ supraadditiver Effekt; I: antag. Effekt gegenüber dem KC; II: antag. Effekt gegenüber DCA

■: Etoposid alleine; □: Etoposid + 10 mmol/l DCA; ▒: Etoposid + 25 mmol/l DCA

4.1.2.5 Effekt der Kombination von DCA und SN38

Insgesamt ergaben sich **additive/supraadditive Effekte** bei den Kombinationstestungen von DCA mit SN38 viermal (in den 80 Kombinationstestungen): dreimal bei 10 mmol/l DCA und 0,0001 µmol/l SN38 (molares Verhältnis 1:10⁸, Zelllinien: REH, UW2282, MNNG-HOS) sowie einmal bei 25 mmol/l DCA und 0,001 µmol/l SN38 (molares Verhältnis 1:25x10⁶, Zelllinie: HL-60). Supraadditive Wachstumshemmungen ≥ 5 % zeigten sich nicht.

Antagonistische Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum traten hingegen 12- von 80-mal auf: 7-mal bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l und 5-mal bei 25 mmol/l. Das molare Verhältnis von 1:10.000 bzw. 1:25.000 erwies sich als besonders kontraproduktiv im Hinblick auf eine gewünschte zytotoxische Wirkung in Kombination (vgl. Kap. 9.1.4).

SN38-Konzentration [µmol/l]	10 mmol/l DCA				25 mmol/l DCA			
	Molares Verhältnis KC : DCA	Effekte insg.	Effekte ≥5%	Effekte ≥10%	Molares Verhältnis KC : DCA	Effekte insg.	Effekte ≥5%	Effekte ≥10%
0,0001	1:10 ⁸	1			1:25x10 ⁷			
0,001	1:10 ⁷				1:25x10 ⁶			
0,01	1:10 ⁶	1	1 (DAOY)		1:25x10 ⁵			
0,1	1:10 ⁵	2	2 (DAOY, MNNG-HOS)		1:25x10 ⁴	2		
1	1:10.000	3	1 (MNNG-HOS)		1:25.000	3	1 (MNNG-HOS)	

Tabelle 8: Zusammenfassung der antagonistischen Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum bei den 8 verwendeten Zelllinien

Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung zeigten sich zweimal in den 80 Kombinationstestungen mit dieser Substanz: Bei einem molaren Verhältnis von 1:10⁸ in der Zelllinie DAOY (-1,5 % Wirkungsabschwächung in Bezug zur Wachstumshemmung durch Inkubation mit DCA allein) sowie bei einem molaren Verhältnis von 1:25x10⁷ in der Zelllinie MNNG-HOS (-1,8 % entsprechender „Wachstumshemmungs-Verlust“).

Leukämie-Zelllinien

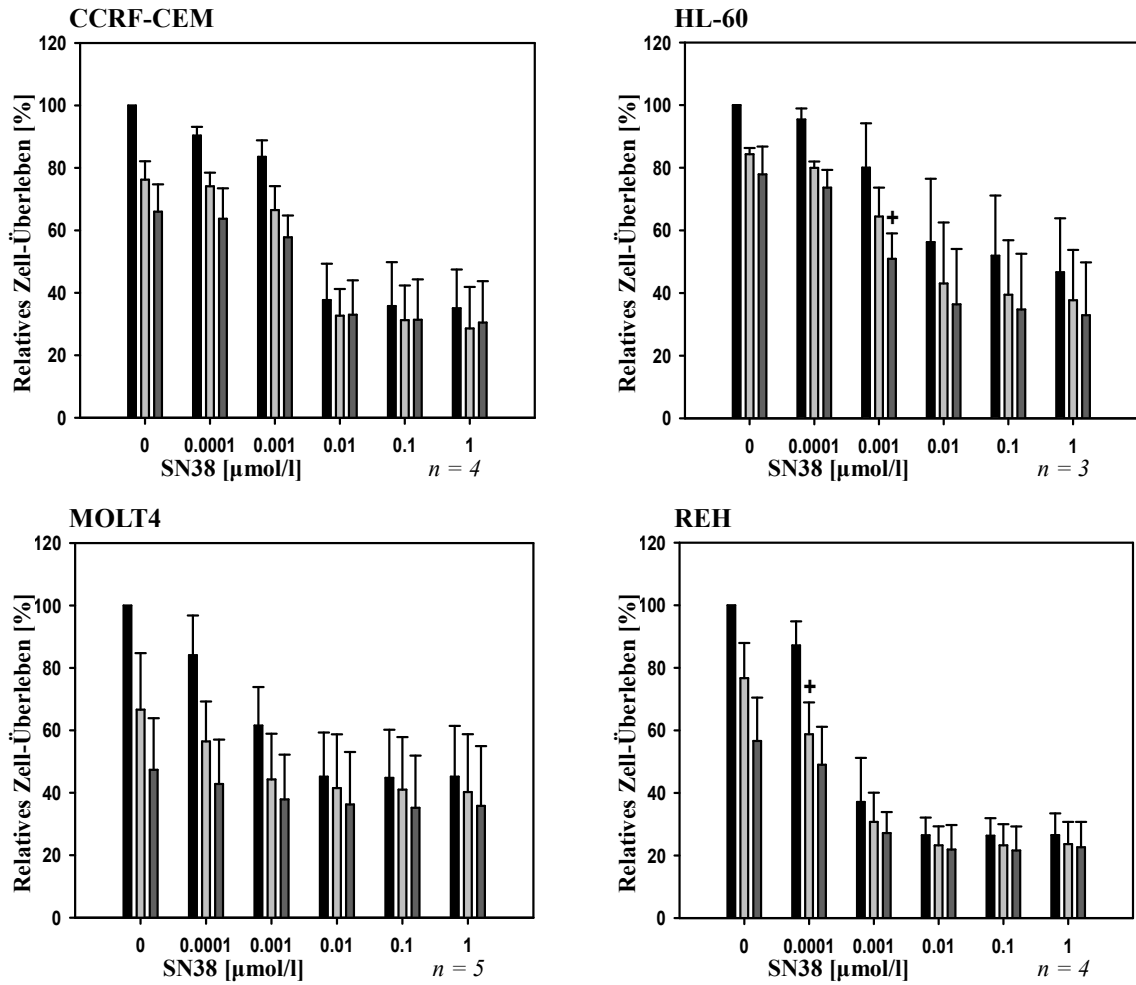


Abbildung 4.13: Kombination von DCA und SN38 in den verschiedenen Leukämie-Zelllinien

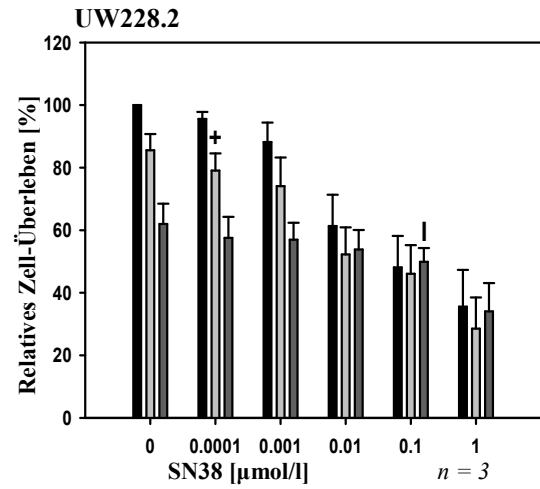
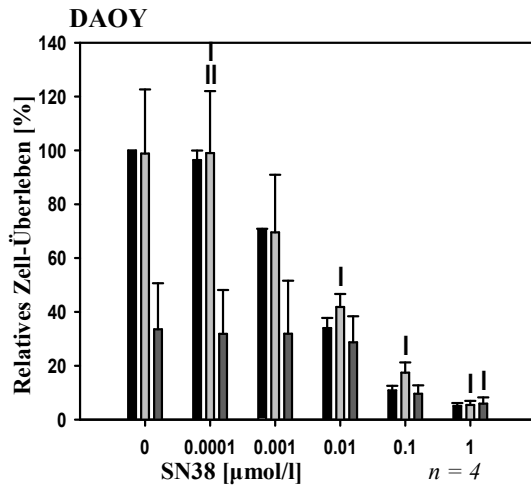
Relatives Zell-Überleben: Definition s. Kap. 3.2.12.158

n: Unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze

+: additiver/ supraadditiver Effekt; I: antagon. Effekt gegenüber dem KC; II: antagon. Effekt gegenüber DCA

■: SN38 alleine; ■: SN38 + 10 mmol/l DCA; ■: SN38 + 25 mmol/l DCA

Medulloblastom-Zelllinien



Osteosarkom-Zelllinien

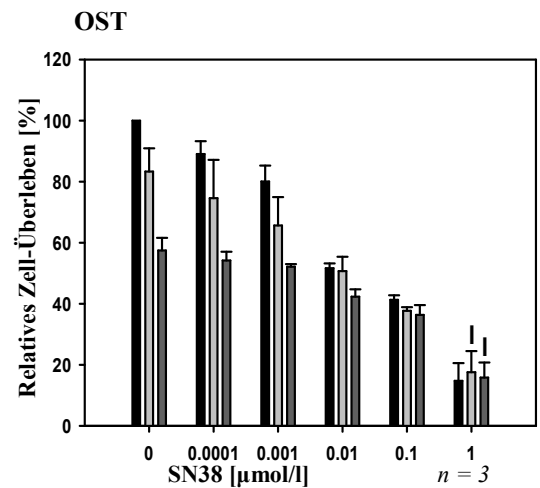
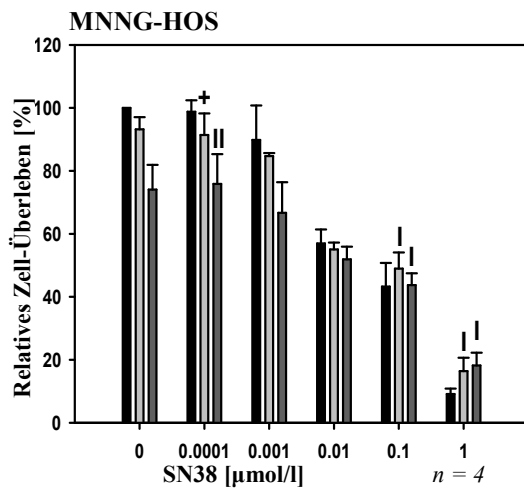


Abbildung 4.14: Kombination von DCA und SN38 in den in den jeweiligen Zelllinien der Entitäten Medulloblastom und Osteosarkom

Relatives Zell-Überleben: Definition s. Kap. 3.2.12.158

n : Unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze

+: additiver/ supraadditiver Effekt; I: antagon. Effekt gegenüber dem KC; II: antagon. Effekt gegenüber DCA

■: SN38 alleine; □: SN38 + 10 mmol/l DCA; ▒: SN38 + 25 mmol/l DCA

4.1.2.6 Effekt der Kombination von DCA und Temozolomid

Additive/ supraadditive Effekte ergaben sich für die Kombination von DCA mit Temozolomid in insgesamt 23 von den 80 Fällen: Bei 10 Kombinationskonstellationen mit 10 mmol/l DCA sowie 13 Konstellationen mit 25 mmol/l DCA. Im Hinblick auf diesen Effekt besonders günstige molare Verhältnisse von Temozolomid zu DCA waren 1:1.000 bzw. 1:2.500 (s. folgende Tabelle). Der stärkste supraadditive Effekt zeigte sich mit einer zusätzlichen Wachstumshemmung von 16,6 % (im Vergleich zur Summe der Einzeleffekte) in der Zelllinie DAOY bei 1 µmol Temozolomid und 10 mmol/l DCA (vgl. Kap. 9.1.5).

KC-Konzentration [µmol/l]	10 mmol/l DCA				25 mmol/l DCA			
	Molares Verhältnis KC : DCA	Effekte insg.	Effekte ≥5%	Effekte ≥10%	Molares Verhältnis KC : DCA	Effekte insg.	Effekte ≥5%	Effekte ≥10%
0,1	1:1.00.000	2			1:2.50.000	2	1 (OST)	
1	1:10.000	2	2 (DAOY, OST)	1 (DAOY)	1:25.000	4	1 (DOAY)	
10	1:1.000	5	2 (DAOY, OST)		1:2.500	5	1 (MNNG-HOS)	
100	1:100	1	1 (UW228.2)		1:250	2		
1000	1:10				1:25			

Tabelle 9: Zusammenfassung der additiven/ supraadditiven Effekte bei den 8 verwendeten Zelllinien

Antagonistische Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum zeichneten sich bei 5 von 80 Kombinationskonstellationen ab. 3 dieser Effekte ergaben sich bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l: In der Zelllinie DAOY bei 100 und 1000 µmol/l Temozolomid sowie in der Zelllinie OST bei 100 µmol/l Temozolomid. Die Wirkungsabschwächung durch die zusätzliche Inkubation mit DCA betrug in diesen Fällen < 1 %. Zwei dieser Effekte zeigten sich bei einer DCA-Konzentration von 25 mmol/l: Bei einer Temozolomid-Konzentration von jeweils 100 µmol/l in den Zelllinien MNNG-HOS (Wirkungsabschwächung durch DCA-Inkubation um 3 %) sowie OST (Wirkungsabschwächung 8,2 %). Während die molaren Verhältnisse 1:1.000 bzw. 1:2.500 für das Entstehen von additiven/supraadditiven Effekten besonders geeignet zu sein schienen (s. o.), zeigten sich „Antagonismen gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ überwiegend bei Verhältnissen um eine Zehnerpotenz niedriger (1:100 sowie 1:250).

Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung ergaben sich in 14 von den 80 Fällen (s. entsprechende Markierung an den Graphen). sechsmal ergab sich eine Wirkungsabschwächung um ≥ 2 %. Wirkungsabschwächungen der Wirkung von DCA ≥ 4 % durch eine zusätzliche Inkubation mit Temozolomid zeigten sich nicht.

Leukämie-Zelllinien

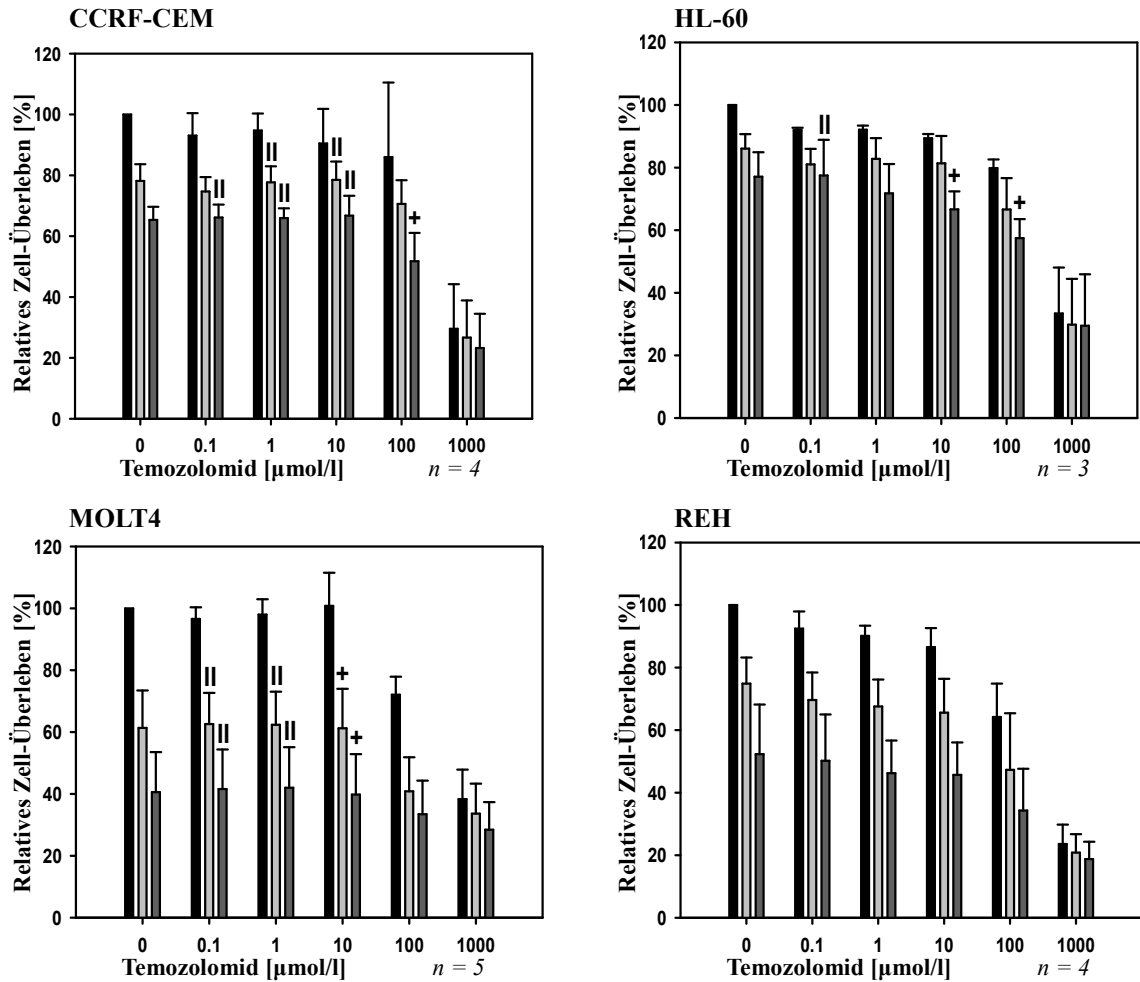


Abbildung 4.15: Kombination von DCA und Temozolomid in den verschiedenen Leukämie-Zelllinien

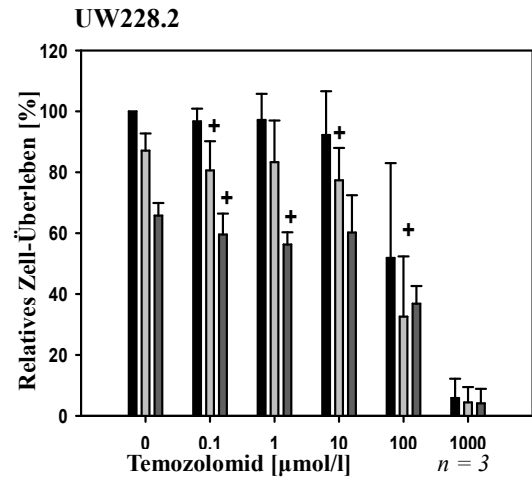
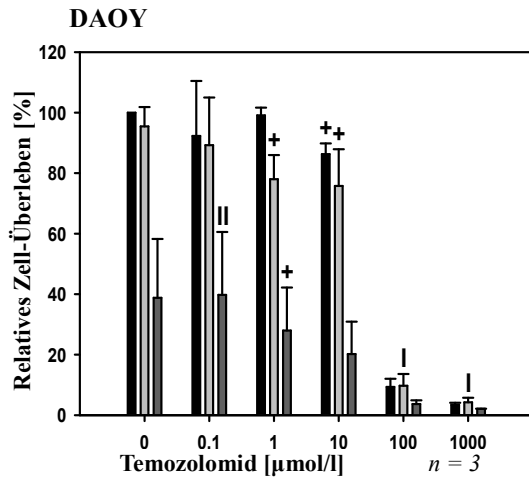
Relatives Zell-Überleben: Definition s. Kap. 3.2.12.158

n: Unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze

+: additiver/ supraadditiver Effekt; I: antag. Effekt gegenüber dem KC; II: antag. Effekt gegenüber DCA

■: Temozolomid alleine; ▒: Temozolomid + 10 mmol/l DCA; ■: Tem. + 25 mmol/l DCA

Medulloblastom-Zelllinien



Osteosarkom-Zelllinien

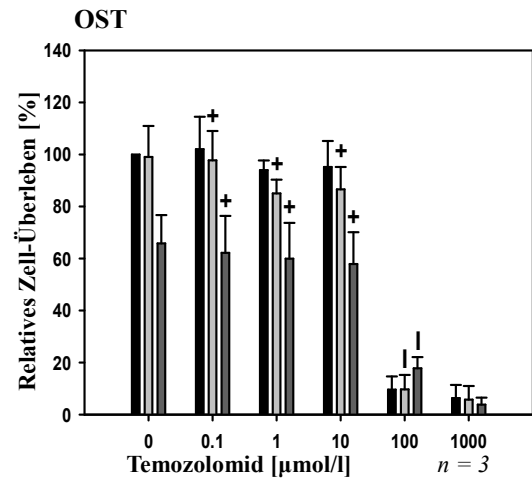
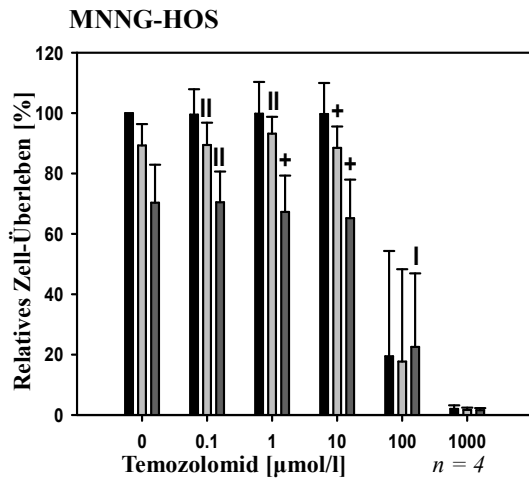


Abbildung 4.16: Kombination von DCA und Temozolomid in den in den jeweiligen Zelllinien der Entitäten Medulloblastom und Osteosarkom

Relatives Zell-Überleben: Definition s. Kap. 3.2.12.158

n : Unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsansätze

+: additiver/ supraadditiver Effekt; I: antag. Effekt gegenüber dem KC; II: antag. Effekt gegenüber DCA

■: Temozolomid alleine; □: Temozolomid + 10 mmol/l DCA; ▒: Tem. + 25 mmol/l DCA

4.2 Ergebnisse der mRNA-Expressions-Analysen

4.2.1 Kv1.5

Die Expression (angegeben in „Fold Change“ (FC), vgl. Kap. 3.2.10.4) von Kv1.5 zwischen den verschiedenen Entitäten und Zelllinien variierte zum Teil erheblich. So war dieser Kaliumkanal in der Neuroblastom-Zelllinie SMS-KCN (FC = 141) 3300-mal stärker exprimiert als in der Ewing-Sarkom-Zelllinie STA-ET1 (FC = 0,043). Jeweils zehn der neoplastischen Zelllinien wiesen eine höhere bzw. niedrigere Expression von Kv1.5 im Vergleich zur nichtneoplastischen Referenz-Zelllinie HEK-293 (FC = 1) auf. Die Expression war weitestgehend abhängig von der Entität der Zelllinien:

- Die Ewing-Sarkom-Zelllinien gehören der einzigen der sechs getesteten pädiatrischen neoplastischen Entitäten an, welche in Bezug auf die Referenz-Zelllinie sowohl eine höhere als auch niedrigere Expression an Kv1.5 aufwiesen: Der Ionenkanal lag bei der Zelllinie CADO-ES1 höher und bei den anderen drei Zelllinien dieser Entität niedriger exprimiert vor. Mit einem Fold Change von 5,5 war Kv1.5 bei CADO-ES1 außerdem über zehnmal stärker exprimiert als der Mittelwert der drei anderen Zelllinien dieser Entität ($\bar{x} = 0,52$).
- Die Expressionsraten von Kv1.5 in den vier leukämischen Zelllinien betragen im Mittel ein Fünftel (FC = 0,19) der Expressionsrate in der Referenzzelllinie. Eine relativ geringe Standardabweichung von 0,16 indiziert zudem eine relativ homogene niedrige Expression.
- Beide getesteten Medulloblastom-Zelllinien exprimierten den Kanal Kv1.5 mit einem Mittelwert der FCs von 14 deutlich stärker als die Referenz-Zelllinie.
- Kv1.5 wurde zwar in allen vier getesteten Zelllinien der Entität Neuroblastom einheitlich stärker exprimiert als in der Referenz-Zelllinie. Die Streuung war hier jedoch die größte von allen getesteten Entitäten: Die FCs lagen hier in einem Wertebereich von 1,1 für SH-SY5Y bis 141 für SMS-KCN (Standardabweichung 64,6).
- Die beiden Zelllinien der Entität Osteosarkom zeigten vergleichbare Expressionslevel, die deutlich über denen der Referenzzelllinie lagen ($\bar{\text{FC}}$: 21).
- Die Expression von Kv1.5 in beiden getesteten Rhabdomyosarkom-Zelllinien lag mit einem Fold Change von $\bar{\text{FC}}$ 0,71 unter der Referenz. Die Streuung war, wie bei den Leukämie-Zelllinien, mit einer Standardabweichung von 0,16 relativ gering.

- Die beiden adulten neoplastischen Zelllinien A549 und HTB-56 wichen in Bezug auf die Expression von Kv1.5 mit einem Fold Change von 0,67 bzw. 1,43 nicht stark von der nicht-neoplastischen Referenz ab.

	Zelllinie	FC	σ
ES	CADO-ES1	5,47*	6,48
	STA-ET1	0,04	0,03
	STA-ET2.1	0,88	0,05
	VH-64	0,65	0,63
L	CCRF-CEM	0,11	0,10
	HL-60	0,43	0,28
	MOLT4	0,09*	0,08
	REH	0,12	0,11
MB	DAOY	16,7	21,04
	UW228.2	11,9	16,2
NB	IMR-5	31,3	51,9
	SMS-KCN	141*	101
	SHEP	10,5	7,15
	SH-SY5Y	1,1	1,25
OS	MNNG-HOS	19,2	22,1
	OST	22,8	30,1
RS	RD	0,6*	0,14
	RH-30	0,8*	0,20
AN	A549	0,67	0,15
	HTB-56	1,43*	1,32

Tabelle 10: Relative mRNA-Expression des Gens Kv1.5 in Bezug auf die nicht-neoplastische embryonale Zelllinie HEK-293 (FC = 1). Zwecks Erhöhung der Reliabilität bzw. Reduktion von messfehlerbedingten Abweichungen wurden jeweils die Ergebnisse der Messungen aus 3 Pellets pro Zelllinie gemittelt. Entsprechen sich zwei Werte und der dritte Wert divergierte davon mit mehr als der 3-fachen Standardabweichung, wurde dieser nicht mit in diese Auswertung übernommen. Die entsprechenden Werte sind mit * indiziert. σ : Standardabweichung; ES: Ewing-Sarkom; L: Leukämie; MB: Medulloblastom; NB: Neuroblastom; OS: Osteosarkom; RS: Rhabdomyosarkom; AN: Adulte neoplastische Zelllinien.

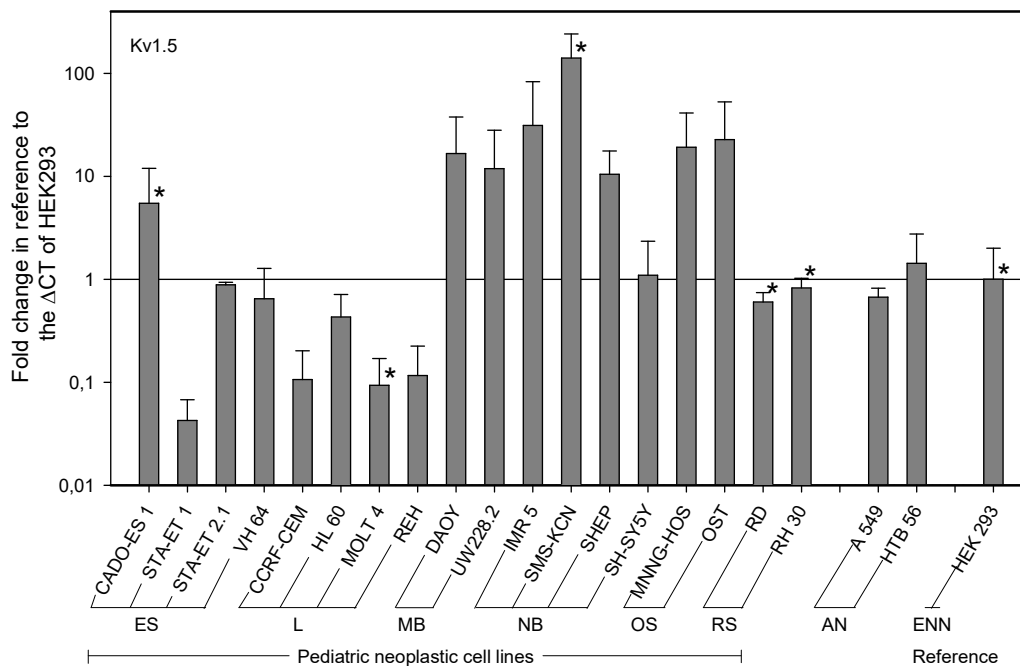


Abbildung 4.17: Logarithmische Darstellung der relativen mRNA-Expressions-Level des Gens Kv1.5 in den verschiedenen neoplastischen Zelllinien in Bezug auf die embryonale nicht-neoplastische Zelllinie HEK-293. Zwecks Erhöhung der Reliabilität bzw. Reduktion von messfehlerbedingten Abweichungen wurden jeweils die Ergebnisse der Messungen aus 3 Pellets pro Zelllinie gemittelt. Die Streuung dieser 3 Messungen ist jeweils durch den Fehlerbalken dargestellt. Entsprechen sich zwei Werte und der dritte Wert divergierte davon mit mehr als der 3-fachen Standardabweichung, wurde dieser nicht mit in dieses Diagramm übernommen. Die entsprechenden Balken sind mit * indiziert. ES: Ewing-Sarkom; L: Leukämie; MB: Medulloblastom; NB: Neuroblastom; OS: Osteosarkom; RS: Rhabdomyosarkom; AN: Adulte neoplastische Zelllinien; ENN: Embryonale nicht-neoplastische Zelllinie.

4.2.1.1 Korrelation der Kv1.5-mRNA-Expressionsrate mit dem Ansprechen auf die Substanzen

In die Korrelationstests gingen die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests der acht hierbei getesteten Zelllinien mit den fünf verwendeten konventionellen Zytostatika sowie DCA ein (s. Kap. „4.1.1 Effekt der Substanzen allein“). Es konnten insgesamt drei signifikante Korrelationen zwischen der Expression der mRNA des Gens von Kv1.5 und diesen genannten Parametern ermittelt werden, auf welche im Folgenden näher eingegangen wird:

DCA, 10 mmol/l

Anhand der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem relativen Zell-Überleben nach Inkubation mit DCA bei einer Konzentration von 10 mmol/l – nicht jedoch bei 25 mmol/l – und der Expression von mRNA für Kv1.5 lediglich nach Spearmans Rangkorrelationskoeffizient ($r_s = 0,905$, $p = 2 \times 10^{-7}$). Die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson ($r = 0,707$) war mit $p = 0,0501$ knapp nicht mehr signifikant. Die Korrelationskoeffizienten wiesen einen positiven Wert auf, was im Kontext der Versuchsdurchführungen dieser Arbeit bedeutet, dass eine Zelllinie weniger sensibel gegenüber einer Inkubation mit DCA war, wenn die mRNA für Kv1.5 in höherer Rate exprimiert war.

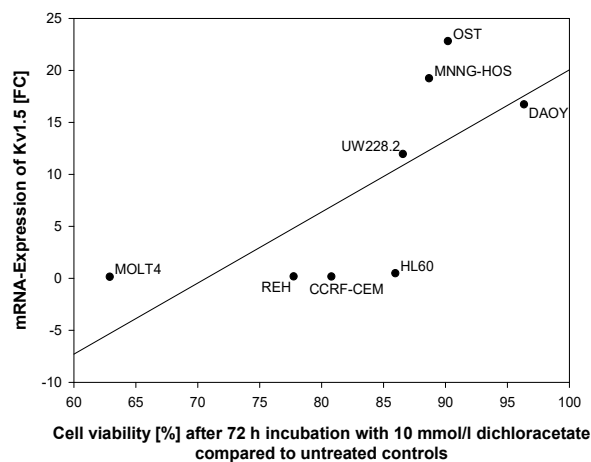


Abbildung 4.18: Darstellung der Korrelation zwischen dem Ansprechen der Zelllinien auf 10 mmol/l DCA und der jeweiligen Kv1.5-mRNA-Expressionsrate

Doxorubicin

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen den GI_{50} -Werten der verschiedenen Zelllinien für Doxorubicin und der Expression der mRNA für Kv1.5 betrug 0,771 ($p = 0,025$). Dies bedeutet, dass die getesteten Zelllinien auch gegenüber Doxorubicin einen Selektionsvorteil hatten, wenn sie eine höhere Expressionsrate von Kv1.5-mRNA aufweisen.

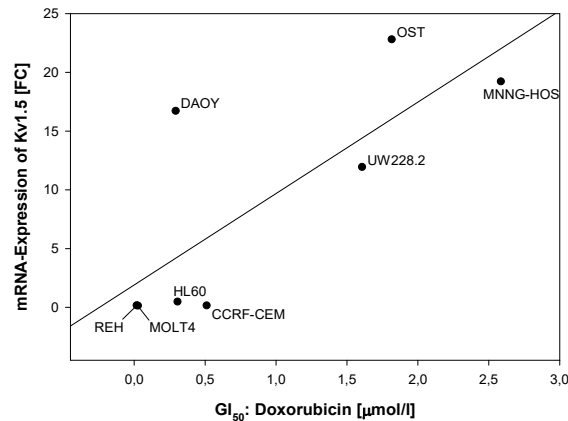


Abbildung 4.19: Darstellung der Korrelation zwischen dem Ansprechen der Zelllinien auf Doxorubicin und der jeweiligen Kv1.5-mRNA-Expressionsrate

Temozolomid

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson von $-0,857$ ($p = 0,00178$) zeigte durch sein negatives Vorzeichen eine konträre Beziehung zwischen der Expression von mRNA für Kv1.5 und den GI₅₀-Werten nach Inkubation mit Temozolomid in Bezug zu den oben genannten Substanzen: Je mehr Kv1.5 exprimiert war, umso sensibler waren die Zelllinien gegenüber dem Wirkstoff Temozolomid.

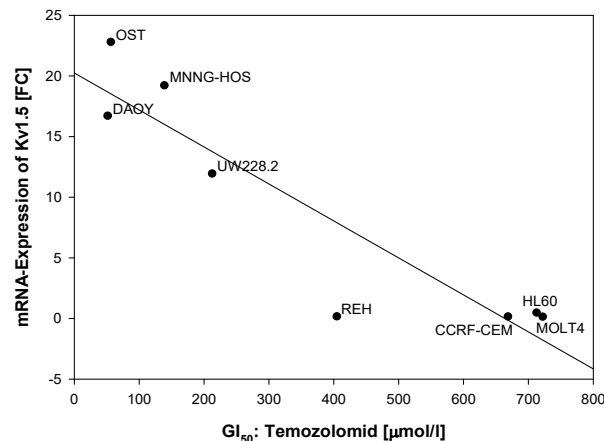


Abbildung 4.20: Darstellung der Korrelation zwischen dem Ansprechen der Zelllinien auf Temozolomid und der jeweiligen Kv1.5-mRNA-Expressionsrate

4.2.2 PKM2

Das Gen für die PKM2 war insgesamt – im Vergleich zur nicht-neoplastischen embryonalen Referenzzelllinie – gering exprimiert: Lediglich vier der 20 neoplastischen Zelllinien wiesen eine höhere Expression auf. Drei dieser vier Zelllinien gehörten der Entität Leukämie an. Mit einem Range von 0,3 (UW228.2) bis 2,13 (MOLT) war die Streuung der Expressionsraten relativ klein und entsprach in etwa der von Survivin (s. u.).

	Zelllinie	FC	σ
ES	CADO-ES1	0,75	0,30
	STA-ET1	0,48	0,11
	STA-ET2.1	0,67	0,19
	VH-64	1,05	0,19
L	CCRF-CEM	0,54	0,46
	HL-60	1,74	0,90
	MOLT4	2,13	0,58
	REH	1,51	1,10
MB	DAOY	0,42	0,05
	UW228.2	0,30	0,02

	Zelllinie	FC	σ
NB	IMR-5	0,66	0,32
	SMS-KCN	0,34	0,03
	SHEP	0,43	0,04
	SH-SY5Y	0,44	0,18
OS	MNNG-HOS	0,43	0,05
	OST	0,51	0,07
RMS	RD	0,66	0,18
	RH-30	0,82	0,09
AN	A549	0,97	0,20
	HTB-56	0,51	0,06

Tabelle 11: Relative mRNA-Expression des Gens PKM in Bezug auf die nicht-neoplastische embryonale Zelllinie HEK-293 ($FC = 1$). Zwecks Erhöhung der Reliabilität bzw. Reduktion von messfehlerbedingten Abweichungen wurden jeweils die Ergebnisse der Messungen aus 3 Pellets pro Zelllinie gemittelt. σ : Standardabweichung; ES: Ewing-Sarkom; L: Leukämie; MB: Medulloblastom; NB: Neuroblastom; OS: Osteosarkom; RMS: Rhabdomyosarkom; AN: Adulte neoplastische Zelllinien.

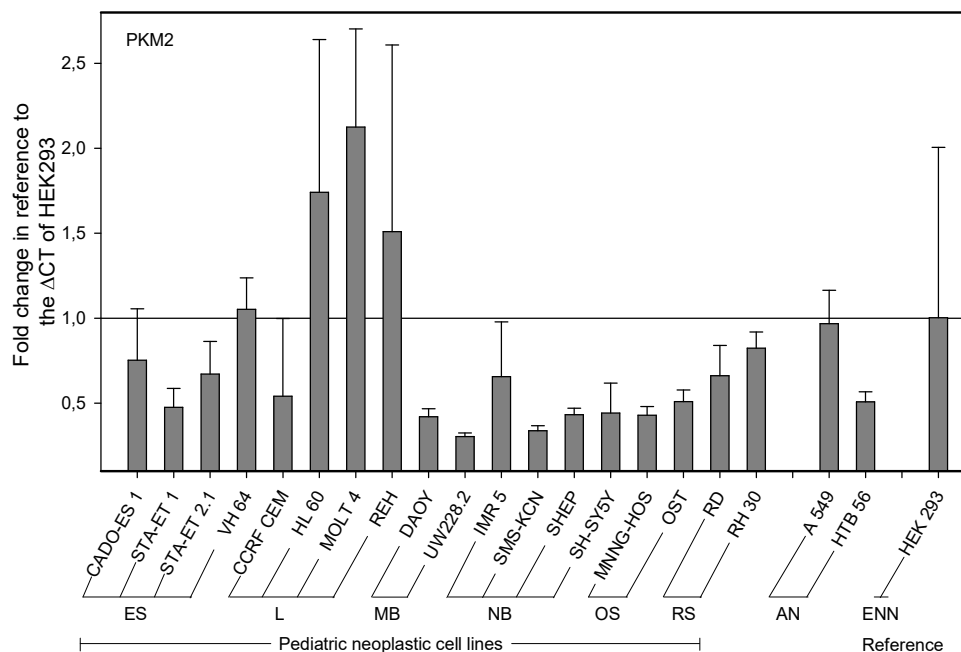


Abbildung 4.21: Lineare Darstellung der relativen mRNA-Expressions-Level des Gens PKM2 in den verschiedenen neoplastischen Zelllinien in Bezug auf die embryonale, nicht-neoplastische Zelllinie HEK-293. Zwecks Erhöhung der Reliabilität bzw. Reduktion von messfehlerbedingten Abweichungen wurden jeweils die Ergebnisse der Messungen aus 3 Pellets pro Zelllinie gemittelt. Die Streuung dieser 3 Messungen ist jeweils durch den Fehlerbalken dargestellt. ES: Ewing-Sarkom; L: Leukämie; MB: Medulloblastom; NB: Neuroblastom; OS: Osteosarkom; RS: Rhabdomyosarkom; AN: Adulte neoplastische Zelllinien; ENN: Embryonale nicht-neoplastische Zelllinie.

4.2.2.1 Korrelation der PKM2-mRNA-Expressionsrate mit dem Ansprechen auf die Substanzen

Für die Expressionsrate der mRNA für die PKM2 wurden ebenfalls drei signifikante Korrelationen mit den Ergebnissen der Zytotoxizitätstests festgestellt:

DCA, 10 mmol/l

Der Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient für die Expressionsrate der mRNA für die PKM2 mit dem relativen Zell-Überleben der Zelllinien nach Inkubation mit 10 mmol/l DCA betrug -0,759 ($p = 0,0291$). Wie auch die Abbildung 4.22 verdeutlicht, ging eine höhere Expressionsrate somit mit einer höheren Sensibilität gegenüber 10 mmol/l DCA einher. Analog zu den Korrelationsanalysen bei der Kv1.5-Expression war die Korrelation für die Expression der PKM2 mit dem relativen Zell-Überleben nach Inkubation mit DCA, 25 mmol/l, nicht signifikant.

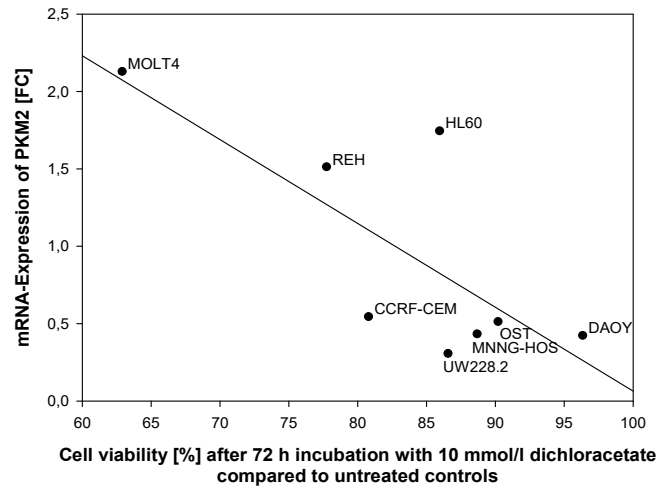


Abbildung 4.22: Darstellung der Korrelation zwischen dem Ansprechen der Zelllinien auf 10 mmol/l DCA und der jeweiligen PKM2-mRNA-Expressionsrate.

SN38

Eine signifikante Korrelation zwischen der mRNA-Expression für die PKM2 und der Sensibilität gegenüber SN38 bestand nur nach dem Spearman'schen Korrelationskoeffizienten ($r_s = -0,786$, $p = 0,0149$). Der Korrelationskoeffizient nach Pearson war nicht signifikant ($p = 0,25$). Dem Ergebnis zufolge war eine Zelllinie umso sensibler gegenüber SN38, je mehr PKM2-mRNA sie exprimierte.

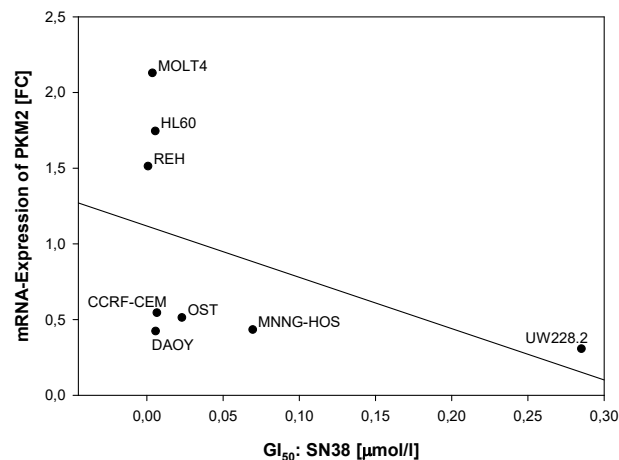


Abbildung 4.23: Darstellung der Korrelation zwischen dem Ansprechen der Zelllinien auf SN38 und der jeweiligen PKM2-mRNA-Expressionsrate.

Temozolomid

Dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson ($r = 0,81$, $p = 0,0096$) zufolge verminderte eine erhöhte Expression der mRNA für die PKM2 die Sensibilität der Zelllinien gegenüber der alkylierenden Substanz Temozolomid.

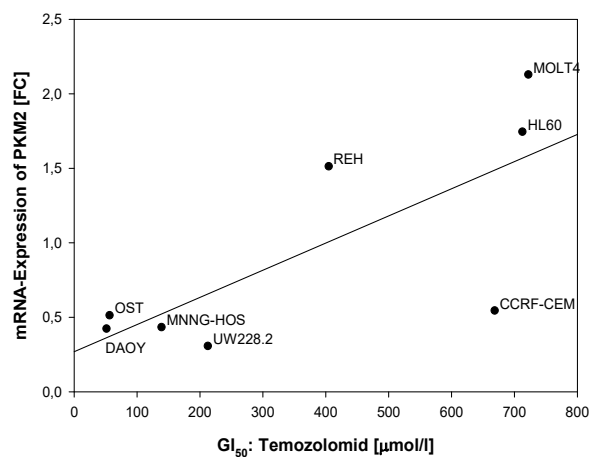


Abbildung 4.24: Darstellung der Korrelation zwischen dem Ansprechen der Zelllinien auf Temozolomid und der jeweiligen PKM2-mRNA-Expressionsrate.

4.2.3 Survivin

Der Wertebereich der Fold Changes war mit einem Intervall von 1,79 (von 0,71 [MNNG-HOS] bis 2,5 (SHEP)) relativ klein. Survivin wurde in 13 der 20 neoplastischen Zelllinien stärker exprimiert als in der nicht-neoplastischen Referenz-Zelllinie HEK-293. Eine gleichsinnige Expressionsrate aller Zelllinien pro Entität in Bezug auf die Referenz bestand nur in den Entitäten Medulloblastom (> 1), Osteosarkom (< 1) und den adulten neoplastischen Zelllinien ($>> 1$). Die beiden adulten neoplastischen Zelllinien exprimierten Survivin bei einem Mittelwert der Fold Changes von 14,86 wesentlich stärker als die pädiatrischen neoplastischen Zelllinien (Mittelwert 1,34).

	Zelllinie	FC	σ
ES	CADO-ES1	0,86	0,59
	STA-ET1	2,35	0,25
	STA-ET2.1	0,94	0,23
	VH-64	2,06	0,54
L	CCRF-CEM	1,57	0,47
	HL-60	1,23	0,18
	MOLT4	0,89	0,32
	REH	1,10	0,39
MB	DAOY	1,32	0,07
	UW228.2	1,32	0,57
NB	IMR-5	1,15	0,14
	SMS-KCN	1,80	0,75
	SHEP	2,50	1,94
	SH-SY5Y	0,91	0,60
OS	MNNG-HOS	0,71	0,23
	OST	0,94	0,06
RMS	RD	0,98	0,44
	RH-30	1,46	0,12
AN	A549	19,36	16,86
	HTB-56	10,37	7,24

Tabelle 12: Relative mRNA-Expression des Gens Survivin in Bezug auf die nicht-neoplastische embryonale Zelllinie HEK-293 (Fold Change = 1). Zwecks Erhöhung der Reliabilität bzw. Reduktion von messfehlerbedingten Abweichungen wurden jeweils die Ergebnisse der Messungen aus 3 Pellets pro Zelllinie gemittelt. σ : Standardabweichung; ES: Ewing-Sarkom; L: Leukämie; MB: Medulloblastom; NB: Neuroblastom; OS: Osteosarkom; RMS: Rhabdomyosarkom; AN: Adulte neoplastische Zelllinien.

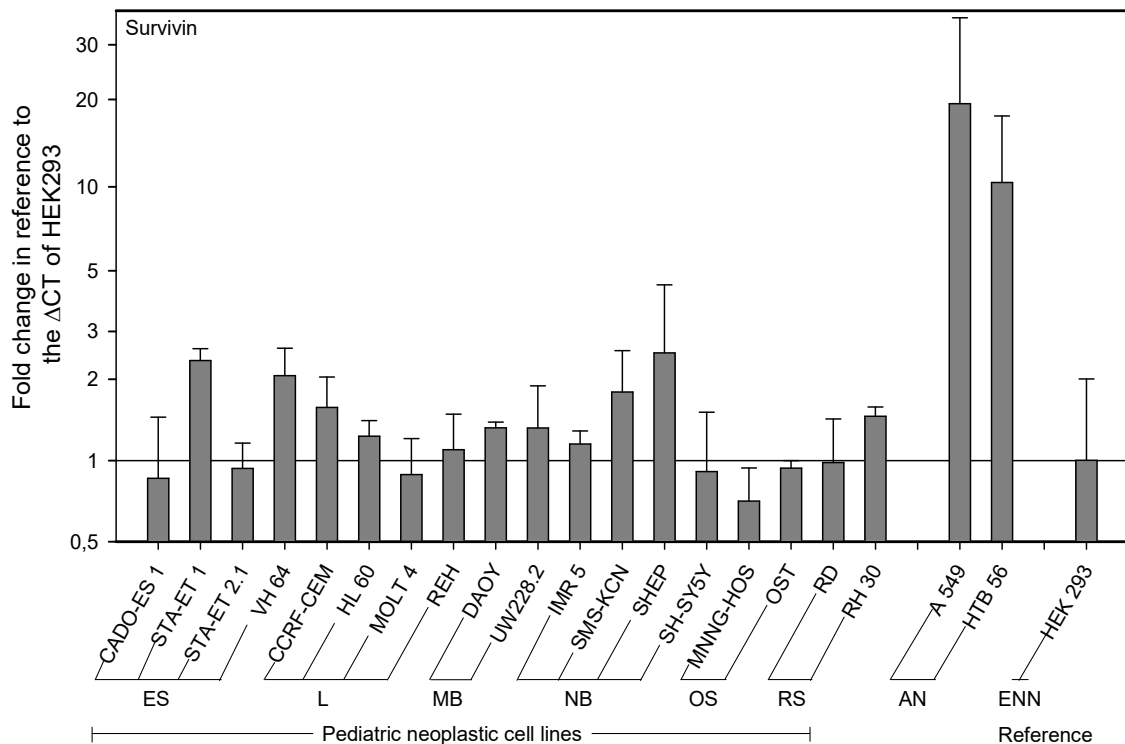


Abbildung 4.25: Logarithmische Darstellung der relativen mRNA-Expressions-Level des Gens Survivin in den verschiedenen neoplastischen Zelllinien in Bezug auf die embryonale, nicht-neoplastische Zelllinie HEK-293. Zwecks Erhöhung der Reliabilität bzw. Reduktion von messfehlerbedingten Abweichungen wurden jeweils die Ergebnisse der Messungen aus 3 Pellets pro Zelllinie gemittelt. Die Streuung dieser 3 Messungen ist jeweils durch den Fehlerbalken dargestellt. ES: Ewing-Sarkom; L: Leukämie; MB: Medulloblastom; NB: Neuroblastom; OS: Osteosarkom; RS: Rhabdomyosarkom; AN: Adulte neoplastische Zelllinien; ENN: Embryonale nicht-neoplastische Zelllinie.

4.2.3.1 Korrelation der Survivin-mRNA-Expressionsrate mit dem Ansprechen auf die Substanzen

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Expressionsrate der mRNA für Survivin mit den relativen Zell-Überleben der getesteten acht Zelllinien nach Inkubation mit DCA oder den GI₅₀-Werten nach Inkubation mit den Substanzen Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid, SN38 oder Temozolomid festgestellt werden.

4.2.4 VDAC1

VDAC1 wurde in jeweils 10 der 20 neoplastischen Zelllinien stärker bzw. schwächer exprimiert als in der nicht-neoplastischen Referenz-Zelllinie HEK-293. Die Streuung der Expressionen war bei einem Intervall der Fold Changes von 1,11 (0,6 [SMS-KCN] bis 1,72 [STA-ET1]) die geringste von allen getesteten Genen. Lediglich die Entität Osteosarkom (< 1) und die adulten neoplastischen Zelllinien (> 1) wiesen jeweils gleichsinnige Expressionsraten in Bezug auf die Referenz auf.

	Zelllinie	FC	σ
ES	CADO-ES1	1,04	0,50
	STA-ET1	1,72	0,41
	STA-ET2.1	0,85	0,22
	VH-64	1,56	0,17
L	CCRF-CEM	0,99	0,34
	HL-60	1,27	0,74
	MOLT4	1,46	0,46
	REH	1,17	0,44
MB	DAOY	0,65	0,06
	UW228.2	1,04	0,15
NB	IMR-5	0,89	0,35
	SMS-KCN	0,60	0,01
	SHEP	0,98	0,24
	SH-SY5Y	0,92	0,59
OS	MNNG-HOS	0,77	0,22
	OST	0,96	0,35
RMS	RD	0,75	0,11
	RH-30	1,40	0,37
AN	A549	1,51	0,29
	HTB-56	1,16	0,19

Tabelle 13: Relative mRNA-Expression des Gens VDAC1 in Bezug auf die nicht-neoplastische embryonale Zelllinie HEK-293 (Fold Change = 1). Zwecks Erhöhung der Reliabilität bzw. Reduktion von messfehlerbedingten Abweichungen wurden jeweils die Ergebnisse der Messungen aus 3 Pellets pro Zelllinie gemittelt. σ : Standardabweichung; ES: Ewing-Sarkom; L: Leukämie; MB: Medulloblastom; NB: Neuroblastom; OS: Osteosarkom; RMS: Rhabdomyosarkom; AN: Adulte neoplastische Zelllinien.

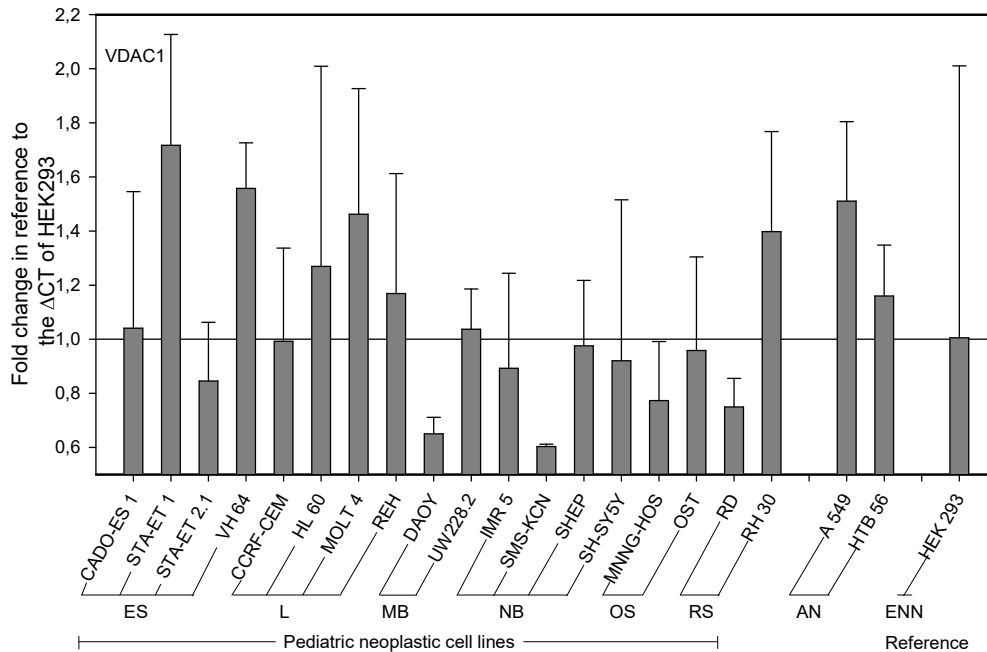


Abbildung 4.26: Lineare Darstellung der relativen mRNA-Expressions-Level des Gens VDAC1 in den verschiedenen neoplastischen Zelllinien in Bezug auf die embryonale, nicht-neoplastische Zelllinie HEK-293. Zwecks Zwecks Erhöhung der Reliabilität bzw. Reduktion von messfehlerbedingten Abweichungen wurden jeweils die Ergebnisse der Messungen aus 3 Pellets pro Zelllinie gemittelt. Die Streuung dieser 3 Messungen ist jeweils durch den Fehlerbalken dargestellt. ES: Ewing-Sarkom; L: Leukämie; MB: Medulloblastom; NB: Neuroblastom; OS: Osteosarkom; RS: Rhabdomyosarkom; AN: Adulte neoplastische Zelllinien; ENN: Embryonale nicht-neoplastische Zelllinie.

4.2.4.1 Korrelation der VDAC1-mRNA-Expressionsrate mit dem Ansprechen auf die Substanzen

Eine signifikante Korrelation der Expressionsrate der mRNA für das Porin VDAC1 mit dem relativen Zell-Überleben bzw. GI_{50} nach Inkubation mit den verwendeten Substanzen wurde für zwei Beziehungen festgestellt:

DCA

Eine erhöhte Expression von mRNA für den VDAC1 ging gemäß dem Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten $r = -0,857$ ($p = 0,00178$) mit verminderten relativen Zell-Überleben der Zelllinien gegenüber 10 mmol/l DCA einher.

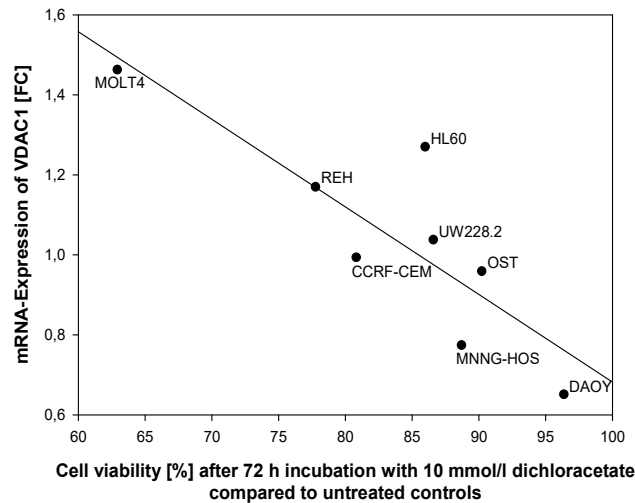


Abbildung 4.27: Darstellung der Korrelation zwischen dem Ansprechen der Zelllinien auf 10 mmol/l DCA und der jeweiligen VDAC1-mRNA-Expressionsrate.

Temozolomid

Es bestand in den durchgeführten Untersuchungen eine positive signifikante Beziehung zwischen der Expression der mRNA für VDAC1 und der Resistenz der Zelllinien gegenüber Temozolomid (Korrelationskoeffizient nach Pearson ($r = 0,905$, $p = 2 \times 10^{-7}$)).

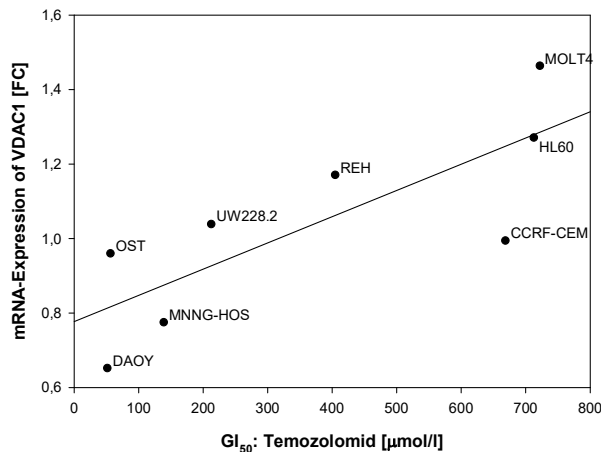


Abbildung 4.28: Darstellung der Korrelation zwischen dem Ansprechen der Zelllinien auf Temozolomid und der jeweiligen VDAC1-mRNA-Expressionsrate.

4.2.5 Korrelationen der mRNA-Expression der getesteten Targets untereinander

Es wurden drei signifikante Korrelationen zwischen der Expressionsrate der mRNA der vier getesteten Targets untereinander ermittelt:

Kv1.5 und PKM2

Die Beziehung zwischen der mRNA-Expression für die PKM2 und den Kv1.5 war negativ (Korrelationskoeffizient nach Pearson ($r = -0,725$, $p = 0,0418$): Je mehr mRNA für die PKM2 exprimiert war, umso niedriger war die jeweilige Expressionsrate für den Kv1.5.

Kv1.5 und VDAC1

Es bestand eine negative Korrelation zwischen der Expression der mRNA vom VDAC1 und dem Kv1.5 (Korrelationskoeffizient nach Pearson ($r = -0,741$, $p = 0,0354$).

PKM2 und VDAC1

Der Pearson-Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient für die Beziehung zwischen der mRNA-Expression von PKM2 und VDAC1 betrug 0,871 ($p = 0,00485$). Eine hohe Expressionsrate der mRNA für die PKM2 ging dementsprechend mit einer hohen Expression der mRNA für den VDAC1 einher.

4.3 Ergebnisse der Western-Blots

Um zu ermitteln, ob sich die Ergebnisse der mRNA-Expression mit der Expression auf Proteinebene decken oder ob post-translational (nach Umcodieren der Gen-Information von RNA- auf Aminosäuresequenz) weitere Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien vorlagen, sollten für die im letzten Kapitel genannten Expressionsprodukte zusätzlich Western-Blots an allen 18 in Kapitel 3.1.1 genannten pädiatrischen neoplastischen Zelllinien durchgeführt werden.

4.3.1 Kv1.5

Beim Versuch der Quantifizierung bzw. des Nachweises der Expression des Gens Kv1.5 auf Proteinebene konnten trotz diverser Optimierungsversuche aufgrund unspezifischer Bindungen des Antikörpers keine auswertbaren Blots erhalten werden, sodass auf die Analyse der Proteinexpression von Kv1.5 verzichtet wurde. Die verwendete Standardproteinlösung (s. Kap. 3.2.11.5) sowie die β -Actin-Bande wurden hingegen bei jeder Versuchswiederholung regelrecht dargestellt.

Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte eine zu geringe Konzentration des Antigens gewesen sein. Ein Indiz, dass dies hier vorgelegen haben könnte, waren die hohen CT-Werte (Threshold-Cycle, vgl. Kap. 3.2.10.4) bei der qRT-PCR für die Ermittlung der mRNA-Expression für dieses Gen: Der Mittelwert der CT-Werte aller Zelllinien für dieses Gen betrug 30, war damit der höchste unter allen vier getesteten Genen und lag im Mittel über 78 % höher als der Mittelwert der CT-Werte für das Referenzgen. Je niedriger die Protein-Expression, umso höher sind die Ansprüche an die Spezifität des verwendeten Antikörpers. Auch, wenn der Hersteller des

verwendeten Antikörpers eine hohe Spezifität angibt, könnten die Anforderungen an diese bei den verwendeten Zelllinien zu hoch gewesen sein.

Leanza et al. (2014) [202] hatten für sich das Problem einer zu niedrigen Kv1.5-Proteinexpression erkannt und ihre Western-Blots daher nicht an Zell-Lysaten, sondern an membran-angereicherten subzellulären Fraktionen durchgeführt [202].

Eine proteolytische Zersetzung der untersuchten Antigene als Grund für die nachgewiesenen unspezifischen Bindungen konnte ausgeschlossen werden, da diese zum Teil Proteinen mit höheren Molekulargewichten als das Zielprotein zuzuordnen waren.

Zwecks Vermeidung einer ineffizienten Blockierung der Membran wurden verschiedene Zusammensetzungen des Blockingpuffers angewendet. Dies hatte jedoch leider keinen Einfluss auf die hier beschriebene Problematik.

Eine Überladung des Gels mit Protein, welche zu unspezifischen Bindungen des Antikörpers IgG führen kann, ist eine häufige Fehlerquelle und ebenfalls für die angewendete Versuchsdurchführung denkbar.

4.3.2 PKM2

Auch für dieses Protein war, trotz regelrechter Darstellung der verwendeten Standardproteinlösung (s. Kap. 3.2.11.5) sowie der β -Actin-Bande bei keiner einzigen Zelllinie ein Nachweis im Western-Blot gelungen. Jedoch war der Grund hierfür das Ausbleiben einer Bindung. Ob eine Kreuz-Reaktion zwischen Blockingpuffer und einem der Antikörper, ein insuffizienter Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran, ein zu exzessives Waschen der Membran, zu geringe Antikörperkonzentrationen oder eine andere der zahlreichen Fehlerquellen Ursache hierfür war, konnte nicht eruiert werden.

4.3.3 Survivin

Das antiapoptotische Protein Survivin (s. Kap. 2.2.1) mit der relativen Molekülmasse von 16 kDa konnte in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.29). Mit dem Ziel einer objektiveren Quantifizierung der jeweiligen zelllinien-spezifischen Menge an Survivin wurden die Signalstärken der chemolumineszenten Reaktionen an der Survivin-Bande mit denen an der β -Actin-Bande durch die Software „ImageJ“ ins Verhältnis gesetzt. Die so erhaltenen Zahlenwerte (s. Tabelle 14) sind aufgrund einer besseren Anschaulichkeit in Abbildung 4.30 graphisch dargestellt.

Die relativen Expressionsraten auf Proteinebene variierten deutlich innerhalb des untersuchten Panels pädiatrischer Tumorzelllinien: Die Werte reichen von 0,11 für die Neuroblastom-Zelllinie SHEP bis 1,5 für die Leukämie-Zelllinie CCRF-CEM.

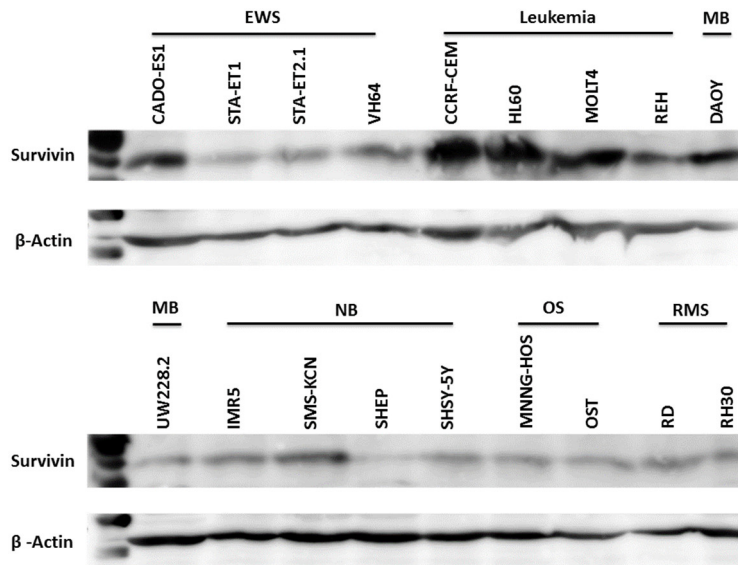


Abbildung 4.29: Western-Blot zur Quantifizierung des Apoptose-Inhibitors Survivin und der Referenz β -Actin in den verschiedenen pädiatrischen neoplastischen Zelllinien. Dargestellt ist das Ausmaß der chemolumineszenten Reaktionen an den jeweiligen Banden. Dieser Versuch wurde gemeinsam mit der ehemaligen Doktorandin Johanna Möllenkamp durchgeführt und diese Graphik wird so auch in ihrer Dissertation aufgeführt [203]

	Zelllinie	Relative Expression
ES	CADO-ES1	0,46
	STA-ET1	0,15
	STA-ET2.1	0,22
	VH-64	0,42
L	CCRF-CEM	1,50
	HL-60	1,09
	MOLT4	0,79
	REH	0,18
MB	DAOY	0,89
	UW228.2	0,32
NB	IMR-5	0,62
	SMS-KCN	1,00
	SHEP	0,11
	SH-SY5Y	0,48
OS	MNNG-HOS	0,41
	OST	0,55
RS	RD	0,97
	RH-30	0,32

Tabelle 14: Densitometrische Auswertung der Abbildung 4.29.

Es ist das Verhältnis der Signalstärke der chemolumineszenten Reaktion an der Survivin-Bande in Bezug zu derjenigen an der β -Actin-Bande dargestellt.

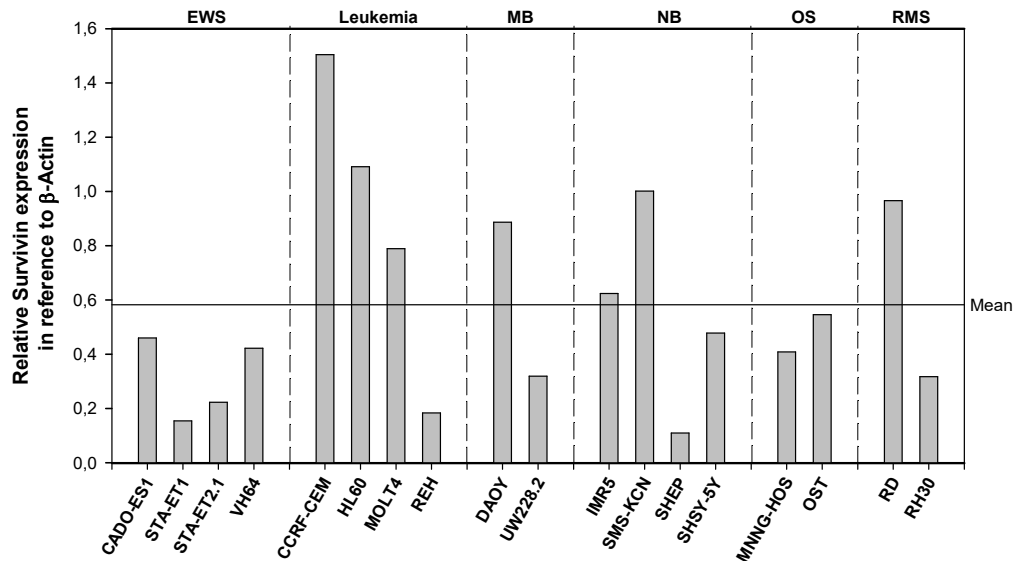


Abbildung 4.30: Visuelle Darstellung der Ergebnisse der densitometrischen Auswertung zur Survivin-Expression (s. Tabelle 14).

4.3.3.1 Korrelation der Proteinexpressionsrate von Survivin mit der entsprechenden mRNA-Expressionsrate und der Sensibilität gegenüber den Substanzen

Es wurden keine signifikanten Korrelationen zwischen der Expressionsrate von Survivin auf mRNA und derjenigen auf Proteinebene ermittelt. Ebenfalls fanden sich keinerlei signifikante Korrelationen zwischen der Proteinexpression von Survivin mit den Zellüberlebens-Parametern nach Inkubation mit den hier getesteten konventionellen Zytostatika (GI_{50}) oder DCA (relatives Zell-Überleben).

4.3.4 VDAC1

Das Porin VDAC1 (vgl. Kap. 2.1.2.1.2) besitzt eine relative Molekülmasse von 32 kDa und wurde in allen getesteten Zelllinien exprimiert (s. Abbildung 4.31).

Auch hier wurden die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung (s. Tabelle 15 auf S. 104) in einer Abbildung graphisch dargestellt (s. Abbildung 4.33).

Die relativen Expressionsraten auf Proteinebene reichten von 0,1 für die Medulloblastom-Zelllinie UW228.2 bis 2,58 für die Neuroblastom-Zelllinie IMR-5.

Wie schon bei der relativen Expression von VDAC1 auf mRNA-Ebene zeigte sich auch auf Proteinebene zumeist keine Entitäts-spezifische Expression.

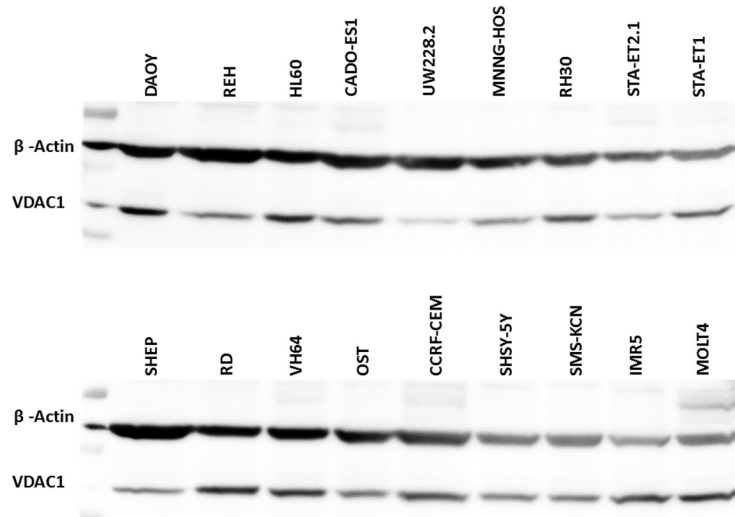


Abbildung 4.31: Western-Blot zur Quantifizierung des Porins VDAC1 und Referenzproteins β -Actin in den verschiedenen pädiatrischen neoplastischen Zelllinien. Dargestellt ist die originale (nicht nach Entitäten sortierte) Aufnahme von der Membran.

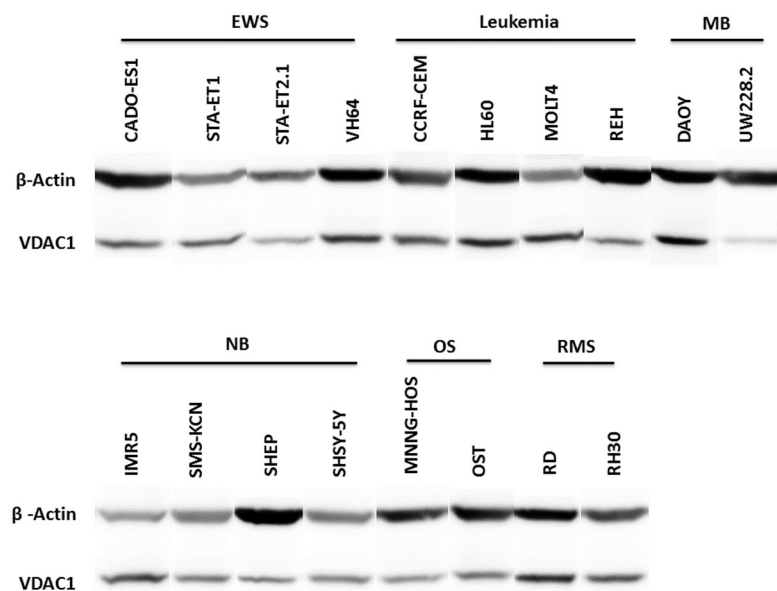


Abbildung 4.32: Zerschnittene und nach Entitäten angeordnete Aufnahme von Abbildung 4.31. EWS: Ewing-Sarkom, MB: Medulloblastom, NB: Neuroblastom, OS: Osteosarkom, RMS: Rhabdomyosarkom.

	Zelllinie	Relative Expression
ES	CADO-ES1	0,51
	STA-ET1	0,85
	STA-ET2.1	0,42
	VH-64	0,98
L	CCRF-CEM	1,25
	HL-60	0,64
	MOLT4	1,85
	REH	0,28
MB	DAOY	0,75
	UW228.2	0,10

	Zelllinie	Relative Expression
NB	IMR-5	2,58
	SMS-KCN	1,15
	SHEP	0,31
	SH-SY5Y	1,17
OS	MNNG-HOS	0,47
	OST	0,73
RMS	RD	1,24
	RH-30	0,80

Tabelle 15: Densitometrische Auswertung der Abbildung 4.31. Es ist das Verhältnis der Signalstärke der chemolumineszenten Reaktion an der VDAC1-Bande in Bezug zu derjenigen an der β -Actin-Bande dargestellt. ES: Ewing-Sarkom, L: Leukämie, MB: Medulloblastom, NB: Neuroblastom, OS: Osteosarkom, RMS: Rhabdomyosarkom.

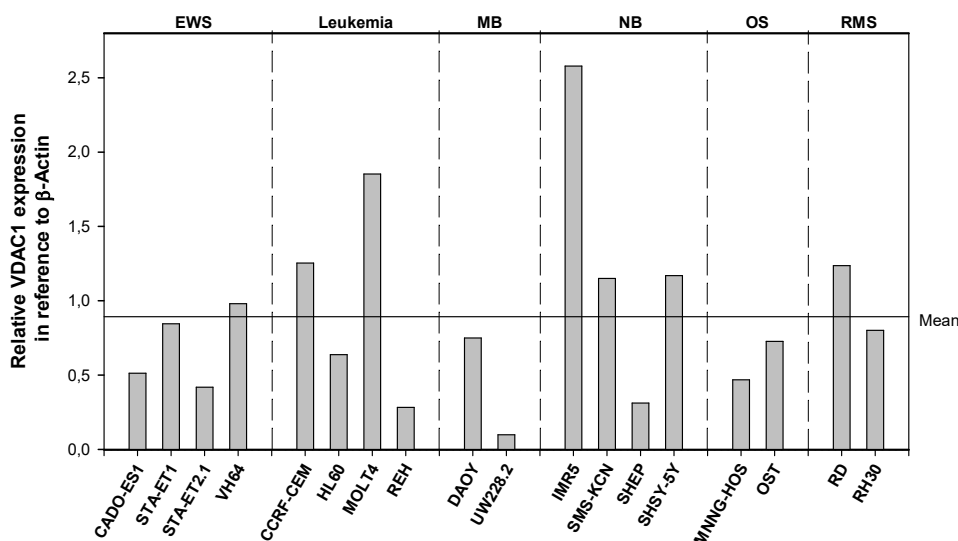


Abbildung 4.33: Visuelle Darstellung der Ergebnisse der densitometrischen Auswertung zur VDAC1-Expression (s. Tabelle 15).

4.3.4.1 Korrelation der Proteinexpressionsrate von VDAC1 mit der entsprechenden mRNA-Expressionsrate und der Sensibilität gegenüber den Substanzen

Gleichsam wie für Survivin haben sich für die Proteinexpression von VDAC1 weder mit der VDAC1-Expressionsrate auf mRNA-Ebene noch mit den Toxizitätsdaten der verwendeten Substanzen (repräsentiert durch GI_{50} -Parameter bzw. relatives Zell-Überleben) signifikante Korrelationen abgezeichnet. Aussagen der Fachliteratur zur post-transkriptionalen Steuerung dieser Gene werden in der Diskussion (Kap. 5.3) aufgeführt.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der In-vitro-Zytotoxizitäts-Tests

5.1.1 Effekt von DCA alleine

5.1.1.1 Überblick über die aktuelle Datenlage

Im Hinblick auf die meisten pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Daten von DCA, wie z. B. die Aktivierung der PDH, die Reduktion des $\Delta\Psi_m$ und die Erhöhung der Konzentration von ROS durch DCA bei Konzentrationen im Bereich von 0,2 mmol/l, besteht in der Literatur weitestgehend Übereinstimmung.

Hinsichtlich der antineoplastischen Wirkung von DCA gehen die Ergebnisse verschiedener Forschergruppen sowie deren Bewertung jedoch zum Teil auseinander: Während die meisten anfangs in Kapitel 2 genannten Studien erfolgversprechende Ergebnisse (in vivo und in vitro) mit starken Reduktionen der Zellviabilität und Induktion der Apoptose bei Konzentrationen von 0,5 bis 5 mmol/l beschreiben, ermittelten die ebenfalls dort genannten Studien von Heshe et al. (2011) [12] und Stockwin et al. (2010) [13] (in vitro) eher moderate Effekte. Heshe et al. (2011) [12] untersuchte die relativen Zell-Überleben nach einer Inkubation von 72 Stunden mit 10 mmol/l DCA¹⁰ an den 18 in Kapitel 3.1.1 genannten pädiatrischen neoplastischen Zelllinien. Hier ergab sich ein Mittelwert von 80,8 %. Des Weiteren konnte in der Arbeit von Heshe et al. (2011) [12] bei einer Konzentration von 10 mmol/l DCA (Inkubationsdauer: 48 Stunden), nur eine sehr geringe Apoptose-Induktion nachgewiesen werden. Erst bei einer Konzentration von 50 mmol/l DCA stieg diese auf einen Wert über 80 % an [12].

In-vitro-Zell-Viabilitätstests aus der Arbeit von Stockwin et al. (2010) [13] von 13 verschiedenen adulten neoplastischen Zelllinien ergaben einen Mittelwert der IC_{50} ¹¹ von 27 ± 6 mmol/l DCA. Erhöhte Level einer Apoptoseinduktion wurden erst bei einer DCA-Konzentration von 25 mmol/l erreicht [13].

Die DCA-vermittelte Hemmung des Zellwachstums erfolgt den Autoren zufolge demnach ohne Apoptoseinduktion. Dies steht im Einklang mit der Arbeit von Sun et al. (2010) [4], welche nach vier Tagen Inkubation mit 5 mmol/l DCA zwar eine Abnahme der Zellviabilität von 60-80 % in

¹⁰ die erreichbare Konzentration mit einem akzeptablem Profil an UAW bei adulten Menschen in vivo beträgt ca. 0,5 mmol/l; s. Kap. 2.4.2

¹¹ Definition IC_{50} : Substanzkonzentration, welche zu einer Reduktion einer ¹⁴C-Leucin-Aufnahme von 50 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen führte. Dieser Prozess diente als Indikator der Proteinsyntheserate insgesamt, über welche auf die Zellviabilität geschlossen wurde [13]

drei verschiedenen Mammakarzinom-Zelllinien ermittelte, was jedoch ebenfalls ohne Apoptoseinduktion geschah. Stockwin et al. (2010) [13] folgerten aus ihren Ergebnissen, dass die Depolarisierung der (hyperpolarisierten) Mitochondrienmembran nicht zwangsläufig in einer Apoptose resultiert und widersprechen somit einer gängigen Meinung, womit ein wichtiger Wirkmechanismus von DCA in Frage gestellt wird (s. Kap. 2.4.1).

Die unterschiedlichen Ergebnisse sind u. a. darauf zurückzuführen, dass die ermittelten Parameter aus Versuchen in-vitro generell moderat waren, während sich starke Effekte vor allem bei In-vivo-Experimenten zeigten [126], [204]. Diese Beobachtung lässt auf einen niedrigeren Stellenwert des Einflusses von DCA auf die einzelne neoplastische Zelle als auf die Interaktion der Zelle mit dem Organismus schließen. Für Ersteres seien hier beispielsweise die – auch in In-vitro-Versuchen machbaren – Beobachtungen einer (vermeintlichen, s. o.) Induzierung der Apoptose und einer Hemmung der für die Proliferation bedeutsamen abnormen Synthese von essentiellen Substraten, proliferativen Metaboliten und Transkriptionsfaktoren (s. Kap. 2.4.1 und 2.2.3) genannt. Im Gegensatz hierzu können die Effekte von DCA im Hinblick auf eine Minderung des metastatischen Potentials, der Neoangiogenese, der Sekretion hämatopoetischer Faktoren (durch Abbau von HIF-1 α , siehe ebenfalls o. g. Kap.), etc. nur in vivo ermittelt werden. Folgerichtig stellen Papandreou et al. die alleinige Evaluation von DCA durch In-vitro-Versuche in Frage [204]. Eine weitere Begründung der eher moderaten Effekte in vitro könnte die – in vivo eigentlich erwünschte – DCA-vermittelte Minderung der „Microenvironmental Acidosis“ darstellen: H⁺-Ionen schädigen sowohl nicht-neoplastische als auch neoplastische Zelllinien, wobei letztere durch verschiedene Resistenzmechanismen weniger sensibel sind (vgl. Kap.: 2.2.3.1). Während die von neoplastischen Zellen induzierte Azidose in Verbindung mit ihrer relativen Insensibilität im Organismus einen Selektionsvorteil darstellt, würde diese sich in einer Monokultur in der Petrischale durch seine toxischen Eigenschaften mit der Folge einer niedrigeren Wachstumsrate als Nachteil auswirken. Überdies verteilen sich H⁺-Ionen im Organismus über ein größeres Volumen, sodass Neoplasien hier mit geringeren Konzentrationen konfrontiert sein dürften. Durch eine Minderung der „Microenvironmental Acidosis“ würde DCA folglich den durch Azidose hervorgerufenen Selektionsdruck auf neoplastische Zelllinien in vitro reduzieren und somit, zumindest teilweise, seine antineoplastischen Effekte kompensieren.

5.1.1.2 Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Datenlage

Angesichts der oben genannten Erkenntnisse ist es retrospektiv bzw. nach Studium der aktuellen Literatur nicht überraschend, dass auch in dieser Arbeit eher moderate Effekte durch eine Inkubation mit DCA allein erzielt wurden. Die Ergebnisse bei einer Konzentration von 10 mmol/l DCA entsprachen weitestgehend denen aus der Arbeit von Heshe et al. (2011) [12]. Der Mittelwert der relativen Zell-Überleben für die acht pädiatrischen neoplastischen Zelllinien der Entitäten

Leukämie, Medulloblastom und Osteosarkom unterschied sich zwischen diesen beiden Versuchsreihen um 2,5 Prozentpunkte (GI_{50} wurden in beiden Arbeiten nicht erreicht):

- Ergebnis in dieser Arbeit: 83,7 %
- Ergebnis von Heshe et al. (2011) [12]: 81,2 %

Ein Vergleich der Mittelwerte der relativen Zell-Überleben der einzelnen Entitäten zeigt hingegen größere Unterschiede auf:

- Ergebnisse in dieser Arbeit: Ø Leukämie 77 %, Ø Medulloblastom 91 %, Ø Osteosarkom 89 %
- Ergebnisse von Heshe et al. (2011) [12]: Ø Leukämie 87,5 %, Ø Medulloblastom 67,5 %, Ø Osteosarkom 82,5 %

Die Wirkung von DCA allein auf pädiatrische neoplastische Zelllinien ist lediglich ein Nebenaspekt dieser Dissertation. Hauptfokus soll auf den Interaktionen mit den konventionellen Zytostatika liegen. Daher wird an dieser Stelle auf eine detailliertere Gegenüberstellung der Ergebnisse verzichtet. Ein Vergleich dieser Ergebnisse ist jedoch zwecks Evaluation der Reproduzierbarkeit relevant. Hierauf wird jedoch in Kapitel 5.1.2.1.2 noch differenziert eingegangen.

Die Effekte bei Inkubation mit 25 mmol/l DCA waren stärker, wie die durch Stockwin et al. (2010) [13] ermittelten erhöhten Level der Apoptoseinduktion bei dieser Konzentration erwarten ließen (s. o.). Jedoch waren auch diese mit einem im Schnitt 24 % niedrigeren relativen Zell-Überleben nur moderat (Mittelwert aus allen acht getesteten Zelllinien: 60 %). Heshe et al. (2011) [12] hat bei einer Konzentration von 25 mmol/l nicht getestet, weshalb ein Vergleich der Ergebnisse an dieser Stelle entfällt.

Nennenswerte entitätsspezifische Effekte von DCA fanden sich nicht: Die auf die in dieser Arbeit getesteten Entitäten bezogenen Mittelwerte der relativen Zell-Überleben unterschieden sich nach Inkubation mit 10 mmol/l um maximal 14,6 % (s. o.). Diese Beobachtungen decken sich mit denen von Heshe et al. (2011) [12], bei welchen sich die Mittelwerte der relativen Zell-Überleben der verschiedenen Entitäten lediglich um maximal 15 % unterschieden (s. o.). Bei 25 mmol/l zeigte sich zwischen den entsprechenden relativen Zell-Überleben eine maximale Differenz von lediglich < 18 %. Aus diesem Grunde wird hier auf ein näheres Eingehen auf entitätsspezifische Effekte verzichtet.

Für das unterschiedliche Ansprechen der Medulloblastom-Zelllinie DAOY bei 10 mmol/l (relatives Zell-Überleben: 96 % → resistenste aller hier getesteten Entitäten) und 25 mmol/l (relatives Zell-Überleben: 30,5 % → sensibelste aller hier getesteten Zelllinien) DCA konnte keine Erklärung gefunden werden.

Nicht erwünschte, die Zytotoxizität gegenüber neoplastischen Zelllinien abschwächende Effekte einer Substanz treten in der Regel bei zunehmender Konzentration dieser Substanz stärker hervor. Um diese Effekte besser bewerten zu können, haben Versuche unter Einsatz von hohen Konzentrationen der zu evaluierenden Substanz einen hohen Stellenwert. Die in dieser Arbeit durchgeführten In-vitro-Zytotoxizitätstests bei einer niemals zuvor an pädiatrischen neoplastischen Zelllinien geprüften Konzentration von 25 mmol/l, bei welchen sich derartige unerwünschte zytotoxizitätsmindernde Effekte nicht zeigten, leisten somit einen Beitrag dazu, Anhaltspunkte für diese Effekte bei DCA alleine in (pädiatrischen) neoplastischen Zelllinien, in vitro, weiter auszuräumen. Diese Resultate ergänzen hierdurch die in der Einleitung (s. Kap. 2) genannten, an adulten Zelllinien erlangten Ergebnisse sowie diejenigen von Heshe et al. (2011) [12], und leisten somit einen zusätzlichen Beitrag im Evaluationsprozess hinsichtlich einer Indikation für eine potentiell erfolgversprechendere Studie (alleiniger) Applikation von DCA bei pädiatrischen Zelllinien in vivo (zur Motivation hierfür vgl. letztes Unterkapitel 5.1.1.1).

5.1.2 Diskussion der In-vitro-Kombinations-Zytotoxizitätstests

Wie in Kapitel „2.5 Zielsetzung der Arbeit“ beschrieben, kann die Kombination verschiedener Pharmaka sowohl erwünschte als auch unerwünschte Effekte haben. Neben dem Ausschluss antagonistischer Interaktionen ist daher von Interesse, ob additive oder gar synergistische Effekte nachweisbar sind. Eine DCA-vermittelte Apoptoseinduktion wurde durch zahlreiche Studien festgestellt und ist nach herrschender Meinung Folge einer Wiederherstellung der Möglichkeit einer intrinsischen Apoptoseinduktion (vgl. Kap. 2), wenngleich dies von manchen Forschungsgruppen nicht beobachtet werden konnte (vgl. Kap. 5.1.1.1). In Kapitel 3.2.1 wurde bereits dargelegt, dass sich Erwartungen auf erwünschte Effekte im Hinblick auf eine Kombination von DCA mit Substanzen ergeben, welche ihre Wirkung über diesen Mechanismus ausüben. Zahlreiche Studien, die diese Erwartungen bestätigen, sowie Begründungen zur Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten konventionellen Zytostatika wurden dort ebenfalls genannt. Ergebnisse aus Studien, welche die Kombination von DCA mit letzteren untersucht haben, werden in den jeweiligen folgenden Unterkapiteln vorgestellt. Hier sei lediglich vorweggenommen, dass die oben genannte Studie von Stockwin et al. (2010) [13], welche aufgrund ihrer In-vitro-Versuche den Effekten von DCA alleine verhalten gegenübersteht (s. o.), Kombinationstherapien mit DCA eine potentielle Bedeutung beimessen und demzufolge diesbezüglich zu einer weitergehenden präklinischen Evaluation anregen. Dies beruht auf dem Nachweis einer Wirkungsverstärkung bei Kombinations-Zytotoxizitätstests mit DCA + Cisplatin sowie DCA + Topotecan, welche durch diese Arbeitsgruppe ebenfalls durchgeführt wurden.

Ferner sind Synergismen in anderen Wirkmechanismen beschrieben. Sowohl der monoklonale Antikörper Bevacizumab als auch DCA (s. Kap. 2.4.1) inhibieren durch Hemmung von VEGF die Neoangiogenese. Durch Kombination dieser beide Wirkstoffe konnte eine, verglichen mit den jeweiligen Monotherapien, ausgeprägt stärkere Hemmung des Wachstums von zwei Glioblastom-Xenografts in Mäusen nachgewiesen werden [205]. Ebenfalls wurde bei Korrelation mit einer HIF1- α -Suppression durch Kombination von Arsentrioxid mit DCA eine Potenzierung der Zytotoxizität dieser Substanz in Mammakarzinom-Zelllinien beobachtet [206].

Sorafenib ist ein Proteinkinase-Hemmer gegen die RAF- und Tyrosinkinase, welcher u. a. auch den VEGF-Signalweg beeinträchtigt. Die Kombination von Sorafenib mit DCA ergab in sechs hepatozellulären Karzinom-Xenografts ähnliche Ergebnisse (Tumorgröße in Kombination -87 % vs. Kontrolle -36 %) [207]. Auf weitere Beispiele mit synergistischen Effekten (vgl. ebenfalls die eingangs in Kap. 2 genannten Studien), auch mit anderen Wirkmechanismen¹² wird hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht näher eingegangen.

Antagonistische Interaktionen, im Gegensatz zu oben Genanntem, beschreibt lediglich das Paper von Heshe et al. (2011) [12], demzufolge die Zytotoxizität von Cisplatin und Doxorubicin in einigen der getesteten pädiatrischen neoplastischen Zelllinien durch eine Koinkubation mit DCA, *in vitro*, reduziert und sogar aufgehoben wurde.

Mit Ausnahme des Papers von Heshe et al. (2011) [12] lässt sich durch das Studium der Literatur bezüglich der Kombination von DCA mit anderen Zytostatika eine zukünftig potentiell bedeutsame Rolle in der klinischen Onkologie ableiten. Auch bei den Kombinationsversuchen zeigten sich gewichtige Wirkungsverstärkungen insbesondere *in vivo*.

Dennoch ist diese Arbeit, trotz fehlender Versuche *in vivo*, von Relevanz, da sie die einzigen veröffentlichten beobachteten antagonistischen Interaktionen von DCA mit konventionellen Zytostatika bei gleichzeitiger Inkubation¹³ unter ähnlichen Bedingungen und in demselben Labor erneut untersucht. Insbesondere die Tatsache, dass die Arbeit von Heshe et al. (2011) [12] die einzige Studie ist, welche die Effekte einer Kombination an pädiatrischen Zelllinien ermittelt hat, macht eine erneute Untersuchung an diesen Zelllinien bedeutsam:

- Vergleichbare Ergebnisse in dieser Arbeit mit denen von Heshe et al. (2011) [12] wären ein weiterer Anhaltspunkt für ein divergierendes Ansprechen pädiatrischer gegenüber adulten Zelllinien auf eine Kombinationstherapie mit DCA.
- Vergleichbare Ergebnisse dieser Arbeit mit den zahlreichen Studien aus der internistischen Onkologie, bzw. von Heshe et al. (2011) [12] abweichende

¹² z. B. Proteasominhibitoren wie Bortezomib [208], COX-Inhibitoren wie Sulindac [209], Hormonrezeptormodulatoren wie Tamoxifen [210]

¹³ s. Ergebnisse bei sequentieller Inkubation von Olszewski et al. (2010) [196] im nächsten Unterkapitel

Beobachtungen wären ein Hinweis auf eine mangelnde Reliabilität¹⁴ des verwendeten präklinischen Versuchsmodells zur Evaluation der Effekte von DCA in Kombination mit anderen Substanzen.

Auf die in dieser Arbeit erhobenen Parameter hinsichtlich der beobachteten Effekte soll in den einzelnen Unterkapiteln spezifisch eingegangen werden. An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, was für alle Kombinationstestungen gleichermaßen gilt: Auch in den Fällen, in denen die Definition eines „Antagonismus gegenüber der DCA-Wirkung“ (s. Kap. 3.2.12.3 auf S. 59) erfüllt ist, bewirkt die gleichzeitige Inkubation von DCA mit dem konventionellen Zytostatikum immer noch eine höhere Zytotoxizität als die alleinige Inkubation mit dem konventionellen Zytostatikum. Wenn nicht gleichzeitig ein „Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ vorliegt (Definition s. ebenfalls Kap. 3.2.12.3 auf S. 59), wird in diesen Fällen somit das eigentliche Ziel der Kombination einer zusätzlichen Zytotoxizität gegenüber neoplastischen Zelllinien erreicht. Wie in Kapitel 4.1.2 genannt, waren die „Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung“ zudem schwach ausgeprägt¹⁵.

Eine bedeutsame Wachstumshemmung zeigte sich in der Regel erst bei höheren Konzentrationen des konventionellen Zytostatikums. Dies spiegelt sich in einer, in den Graphen zu den Zytotoxizitäts-Kombinationstests anfangs (bzw. auf der linken Seite der X-Achse) recht konstanten Höhe der gleichfarbigen Säulen wider, welche erst bei hohen Konzentrationen des konventionellen Zytostatikums abnehmen. Dies führt dazu, dass im Bereich niedriger Zytostatika-Konzentrationen bereits durch kleine Schwankungen des relativen Zell-Überlebens nach oben – beispielsweise durch eine Variation der Ergebnisse – die Definition eines „Antagonismus gegenüber der DCA-Wirkung“ (vgl. Kap. 3.2.12.3 auf S. 59) erfüllt ist. Siehe hierzu beispielsweise Abbildung 4.7 auf S. 73 zu der Kombinationstestung Cisplatin-DCA an der Zelllinie MOLT4: Bei 10 mmol/l DCA in Kombination mit 0,01 sowie 0,1 µmol/l Cisplatin wurden „Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung“ nachgewiesen. Im Gegensatz zum „Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ (welcher nicht bei den leukämischen Zelllinien auftrat) zeigte sich der „Antagonismus gegenüber der DCA-Wirkung“ verteilt in allen untersuchten Zelllinien sowie bei allen konventionellen Zytostatika. Dies könnte ein Indiz für die oben bereits genannte zugrundeliegende mangelnde Reliabilität bzw. gegen einen manifesten zelllinienspezifischen Effekt darstellen. Darüber hinaus ist eines der Ziele dieser Arbeit eine Evaluation des Einflusses von DCA auf die Zytotoxizität von konventionellen Zytostatika und

¹⁴ Definition: Grad der Replizierbarkeit von Ergebnissen unter gleichen Bedingungen. Da diese Thematik in Kap. 5.1.2.1.2 ausführlich diskutiert wird, wurde diesbezüglich kein eigenständiges Auswertekapitel verfasst..

¹⁵ Auftreten in insgesamt 32 von 400 Fällen, 9 Fälle mit einer Wirkungsabschwächung ≥ 2 %, ein Fall mit einer Wirkungsabschwächung ≥ 4 %

nicht vice versa. Vor diesem Hintergrund wird den „Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung“ in der Diskussion lediglich eine untergeordnete Rolle beigemessen. Der Vollständigkeit halber sollen diese dennoch erwähnt werden.

5.1.2.1 Kombination von DCA und Cisplatin

5.1.2.1.1 Überblick über den publizierten Wissensstand

Die im letzten Kapitel erwähnten, durch Stockwin et al. (2010) [13] beschriebenen, synergistischen Effekte wurden bei Versuchsreihen mit Konzentrationen im Bereich von 0,3-30 mmol/l für DCA und 0,1-10 µmol/l für Cisplatin an der Zelllinie A549 (etabliert aus einem humanen Lungen-Adenokarzinom eines Erwachsenen) beobachtet. Es wurde hierfür ein Combination Index von 0,004 errechnet (CI; additiver Effekt: CI = 1, Synergismus: CI < 1, Antagonismus: CI > 1) [13].

Xie et al. (2011) [211] führten In-vitro-Zytotoxizitätstests im Bereich von 2-16 mmol/l DCA in Kombination mit 0,5-16 µmol/l Cisplatin an der Zelllinie HeLa (etabliert aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms bei einer 30-jährigen Patientin) durch. Eine Synergie dieser Substanzen wurde erst ab einer DCA-Konzentration von ≥ 4 mmol/l und Cisplatin-Konzentration von ≥ 4 µmol/l beobachtet. Gleichsam nahm die Synergie mit steigender Konzentration zu, sodass der R-Index (RI; additiver Effekt: RI = 1, Synergismus: RI > 1) bei 16 mmol/l DCA in Kombination mit 16 µmol/l Cisplatin am höchsten war (RI = 1,6, p = 0,01). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden In-vivo-Studien an Zervixkarzinom-Xenografts durch diese Forschergruppe bereits begonnen [211]. Olszewski et al. (2010) [196] untersuchten die Effekte einer Kombination von verschiedenen Platinverbindungen mit DCA an zwei SCLC-Zelllinien. Eine gleichzeitige Inkubation von DCA und Cisplatin, Oxaliplatin oder Picoplatin zeigte den Autoren zufolge wenig Einfluss auf das relative Zell-Überleben. Hingegen wurde eine signifikant verstärkte Zytotoxizität bei den Platinverbindungen Carboplatin, Satraplatin, JM118 und Oxoplatin durch eine gleichzeitige Kombination mit DCA beobachtet (u. a. Ratio: $\frac{IC_{50}Oxaliplatin}{IC_{50}Oxaliplatin+DCA} > 4$: bei der SCLC-Zelllinie DMS 153 → Senkung der IC₅₀ durch Kombination auf < 1/4). Eine Applikation von DCA drei Tage nach einer Vorinkubation mit Platinverbindungen schwächte die Zytotoxizität fast aller dieser Substanzen in zwei NSLC-Zelllinien ab. Ebenso wurde der Effekt von DCA durch eine nachträgliche Inkubation mit Cisplatin oder Etoposid drei Tage nach Vorinkubation mit DCA abgeschwächt [196]. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Effekt einer Kombination mit DCA nicht nur von der gewählten Platinverbindung, sondern auch von der zeitlichen Abfolge der Applikation abhängt.

Zytotoxizitätstests von Fiebigler et al. (2011) [212] ermittelten für die (hochresistente) NSCLC-Zelllinie UMC-11 eine Potenzierung der Wirkung von Carboplatin, Satraplatin und JM118 durch Kombination mit DCA (10 mmol/l) um das 1,4 - 2,4-Fache.

Eine Studie von Garon et al. (2014) [213] konnte keine Synergie durch die Kombination von Cisplatin (0,03-2 $\mu\text{mol/l}$) mit DCA (0,15-10 mmol/l) unter normoxischen Bedingungen bei den zwei untersuchten NSCLC-Zelllinien feststellen. Diese traten jedoch bei einer Wiederholung der Versuche unter hypoxischen Bedingungen (0,5 % O_2 , 5 % CO_2) zutage. Sauerstoffmangel stellt einen wichtigen Stimulus für die Expression der PDK dar. Dadurch gewinnt, laut These der Autoren, die Hemmung der PDK durch DCA unter hypoxischen Bedingungen an Bedeutung, womit die stärkeren Effekte der Kombination mit DCA in diesem Milieu zu erklären sind [213]. Durch Synthese einer Substanz, bestehend aus zwei Molekülen DCA und einem Molekül Platin, welches „Mitaplatin“ getauft wurde, ließ sich die Wirkung der Kombination noch weiter verstärken. So ermittelten Xue et al. (2012) [214] an einer cisplatin-resistenten humanen epidermoiden Adenokarzinom-Zelllinie nach Inkubation mit:

- DCA alleine ein relatives Zell-Überleben von 78 %,
- Cisplatin alleine ein relatives Zell-Überleben: von 51%,
- einer Kombination von Cisplatin und DCA ein relatives Zell-Überleben von 49 %,
- Mitaplatin ein relatives Zell-Überleben von 38 %.

Auch in einer Induktion der Apoptose war diese Substanz effektiver als die anderen genannten Versuchsreihen [214].

Wie eingangs erwähnt, ergaben sich hingegen in den von Heshe et al. (2011) [12] durchgeführten Zytotoxizitätstests an pädiatrischen neoplastischen Zelllinien durch Koinkubation von DCA zu Cisplatin Reduzierungen bis hin zu kompletter Aufhebung der Zytotoxizität von Cisplatin. Diese Effekte waren hier weitestgehend konzentrations- und zelllinienunspezifisch: Sie traten sowohl bei 1 mmol/l DCA in Kombination mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Cisplatin (= Konzentrationsverhältnis 100:1) an den vier auch in dieser Dissertation verwendeten Zelllinien der Entität Leukämie und an zwei Rhabdomyosarkom-Zelllinien wie auch bei 10 mmol/l DCA in Kombination mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Cisplatin (= Konzentrationsverhältnis ebenfalls 100:1) an den jeweils zwei auch in dieser Dissertation untersuchten Zelllinien der Entitäten Osteosarkom (MNNG-HOS, OST) und Medulloblastom (DAOY, UW228.2) auf.

Weiterhin wurde in der Arbeit von Heshe et al. (2011) [12] eine verminderte Cisplatin-vermittelte Caspase 3-Aktivierung bei zunehmender DCA-Konzentration beobachtet.

5.1.2.1.2 Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Datenlage

Die in dieser Arbeit ermittelten und in Kapitel 4.1.2.2 dargestellten überwiegenden „nicht-additiven, nicht-antagonistischen kombinatorischen“¹⁶ bis „additiven/ supraadditiven“ Effekte¹⁷ bei Kombination von DCA und Cisplatin in vitro sind schwächer als die in der Mehrzahl eher synergistischen als additiven Effekte, welche in oben genannter Literatur an adulten neoplastischen Zelllinien ermittelt wurden.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse von Heshe et al. (2011) [12] mit denjenigen dieser Arbeit ist nur in einem Teil der Fälle möglich. Identische Konzentrationsverhältnisse und identische Wirkstoffkonzentrationen wurden lediglich in folgenden Zelllinien getestet:

Zelllinie	Wirkstoffkonzentrationen in beiden Arbeiten	Ermittelter Effekt bei Heshe et al. 2011	Ermittelter Effekt in dieser Arbeit
DAOY	Cisplatin: 100 µmol/l DCA: 10 mmol/l Verhältnis: 1:100	NANAK	NANAK
UW228.2		Antagonistisch	Additiv/supraadditiv
MNNG-HOS		Antagonistisch	NANAK
OST		Antagonistisch	NANAK

Tabelle 16: Identische Konzentrationsverhältnisse sowie Konzentrationen und deren Effekte in dieser Arbeit und bei Heshe et al. 2011 [12]; NANAK-Effekt: nicht-additiver, nicht-antagonistischer kombinatorischer Effekt (Definition s. Kapitel 4.1.2.2)

Die Ergebnisse von Heshe et al. (2011) [12] hinsichtlich dieser Zelllinien- und Wirkstoffkonstellation konnten mit Ausnahme von DAOY also nicht reproduziert werden. Bei der Zelllinie UW228.2 ergaben sich sogar entgegengesetzte Effekte.

Bei den leukämischen Zelllinien CCRF-CEM, HL60, MOLT4 und REH gibt es in dieser Arbeit zwar Konzentrationsverhältnisse, welche sich mit denjenigen von Heshe et al. (2011) [12] (1:100) decken, jedoch wurde in dieser Arbeit die von Heshe et al. (2011) [12] angewendete Wirkstoffkonzentration von 1 mmol/l DCA nicht getestet.

Zelllinie	Wirkstoffkonzentrationen bei Heshe et al. 2011	Ermittelter Effekt bei Heshe et al.	Wirkstoffkonzentrationen in dieser Arbeit	Ermittelter Effekt in dieser Arbeit
CCRF-CEM	Cisplatin: 10 µmol/l DCA: 1 mmol/l Verhältnis: 1:100	Antagonistisch	Cisplatin: 100 mol/l DCA: 10 mmol/l	NANAK
HL60		Antagonistisch		NANAK
MOLT4		Antagonistisch	Verhältnis: 1:100	NANAK
REH		Antagonistisch		NANAK

Tabelle 17: Identische Konzentrationsverhältnisse bei unterschiedlichen Konzentrationen und deren Effekte in dieser Arbeit und bei Heshe et al. (2011) [12]; NANAK-Effekt: nicht-additiver, nicht-antagonistischer kombinatorischer Effekt (Definition s. Kapitel 4.1.2.2)

¹⁶ NANAK-Effekte: in 52 von 80 Kombinationsschemata

¹⁷ additive/ supraadditive Effekte: in 27/ 80 Kombinationsschemata

Vor dem Hintergrund der o. g. divergierenden Ergebnisse bei identischen Konzentrationsschemata nicht überraschend, wurden auch die in diesen Konstellationen von Heshe et al. (2011) [12] ermittelten Effekte nicht reproduziert.

Dies ist auch daher von Bedeutung, weil das potentiell therapeutische Konzentrationsverhältnis in ebendiesem Bereich von ungefähr 1:100 liegen würde:

- Ermittelte durchschnittliche Blutplasma-Spitzenkonzentration in einer Studie zum Cisplatin-Drug-Monitoring: 1,93 mg/l [215] \approx 6,5 μ mol/l
 - DCA-Konzentration mit einem tolerablem Auftreten von UAW: ca. 0,5 mmol/l (vgl. Kap. 2.4.2)
- 6,5 μ mol/l: 0,5 mmol/l \approx 1:100

In diesem Konzentrationsverhältnis wurde hier lediglich einer der 27 additiven/ supraadditiven Effekte ermittelt (UW228.2, s. Tabelle 16).

Der einzige in dieser Arbeit ermittelte „Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ bei der Substanzkombination DCA-Cisplatin wurde bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:1000 festgestellt (10 μ mol/l Cisplatin, 10 mmol/l DCA, in der Zelllinie OST. s. Kap. 4.1.2.2).

Diese Dissertation wiederholte die von Heshe et al. (2011) [12] durchgeführten In-vitro-Kombinations-Zytotoxizitätstests an zwei Zelllinien der Entität Rhabdomyosarkom nicht, weil sich dort ohnehin nur schwach ausgeprägte Effekte zeigten.

Wie auch die durch Heshe et al. (2011) [12] bei 1 und 10 mmol/l DCA ermittelten (antagonistischen) Effekte war auch die Anzahl der durch diese Dissertation bei 10 und 25 mmol/l DCA ermittelten NANAK- bis additiven/ supraadditiven Effekte nicht abhängig von der DCA-Konzentration¹⁸. Eine Zunahme der Effekte mit steigender Cisplatin-Konzentration zeichnete sich ebenfalls nicht ab¹⁹. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der im letzten Unterkapitel genannten Arbeit von Xie et al. (2011) [211], in welcher von einer positiven Korrelation der synergistischen Effekte bei zunehmender DCA- und Cisplatin-Konzentration berichtet wird. Grund hierfür könnten jedoch die unterschiedlichen verwendeten Konzentrationen sein: Xie et al. (2011) [211] testeten im Bereich DCA 2, 4, 8 und 16 mmol/l und Cisplatin 4, 8, 12 und 16 μ mol/l. Wie man den Fehlerbalken der Graphen zu den MTT-Substanzkombinationstestungen dieser Arbeit und derjenigen von Heshe et al. (2011) [12] entnehmen kann, waren die Ergebnisse zu den jeweiligen Versuchszeiträumen – im Gegensatz zu den Ergebnissen der zwei Arbeiten

¹⁸ 13 additive/ supraadditive Effekte bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l, 14 additive/supraadditive Effekte bei 25 mmol/l, vgl. Tabelle 5 auf S. 77

¹⁹ vgl. ebenfalls Tabelle 5 auf S. 78

untereinander – reproduzierbar (Einreichung der Publikation von Heshe et al. (2011) [12]: Februar 2010, Zeitpunkt der MTT-Kombinationstestungen dieser Arbeit: 2011).

Ein gewisses Ausmaß an Variabilität des Zell-Überlebens nach Inkubation mit Substanzen beim MTT-Test bei verschiedenen Versuchsdurchführungen (vor allem mit großem zeitlichem Abstand) ist bekannt und wird allgemein toleriert. Diese können beispielsweise bedingt sein durch unterschiedliche Zellteilungsraten der Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Zelllinien proliferieren direkt nach dem Auftauen aus der Kryokonservierung meist langsamer, auch im späteren Verlauf zeichnet sich eine phasenweise schnellere und langsamere Proliferation ab). Auch aufgrund von Versuchsdurchführungen durch verschiedene Laboranten können Schwankungen auftreten – selbst wenn alle nach derselben „Standard Operating Procedure“ (SOP) arbeiten.

Die divergierenden Ergebnisse zwischen der Arbeit von Heshe et al. (2011) [12]²⁰ und dieser Arbeit²¹, welche in demselben Labor mit denselben Zelllinien (identische Quelle aus der Kryokonservierung), Materialien, Apparaten und den gleichen Medien generiert wurden, zeigen eine schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Änderung der „Standard Operating Procedure“ beim MTT-Test, welche im Zeitraum zwischen dem Beginn der beiden Arbeiten erfolgte: Die Vorinkubation vor Zugabe der Substanzen zwecks Gewährleistung eines normalen Wachstums der Zelllinien betrug in dieser Arbeit 24 Stunden (vgl. Kapitel 3.2.8.5), während sie bei Heshe et al. (2011) [12] 72 Stunden betrug. Auch wenn die Zelllinien in beiden Arbeiten anschließend für 72 Stunden mit den Substanzen inkubiert wurden, könnte eine divergierende Vorinkubation das Endresultat beeinflussen: nach längerer Vorinkubationszeit ist zum Zeitpunkt der Auswertung des MTT-Tests mehr Nährmedium umgesetzt. Dies bedeutet unter anderem einen niedrigeren Glukosegehalt sowie eine erhöhte Laktatkonzentration, welche wiederum einen erniedrigten pH-Wert bedingt. In Kapitel 5.1.1.1 wurde bereits die Hypothese dargelegt, dass DCA durch Hemmung des Warburg-Effekts und damit einhergehender Minderung der Microenvironmental Acidosis in einer, wie hier vorliegenden, Monokultur zu einer Erhöhung des relativen Zell-Überlebens und somit zu vermeintlich antagonistischen Effekten führen kann.

Es erscheint zudem wahrscheinlich, dass auch unterschiedliche Glukosekonzentrationen einen starken Einfluss auf die Ergebnisse bei der Evaluation der Effekte von DCA haben dürften, welches in seinen Wirkmechanismen selbst fulminant den Glukose-Stoffwechsel beeinflusst (vgl. Kap.2.4.1): Eine durch äußere Umstände hervorgerufene Veränderung der Glukosekonzentration dürfte erwarteter Weise wiederum einen Einfluss auf die Wirkung von DCA haben.

²⁰ weitestgehend antagonistische Effekte durch Kombination

²¹ bis auf eine Ausnahme NANAK- bis additive/ supraadditive Effekte durch Kombination

Bereits eine durch verschiedene Laboranten unterschiedlich gewählte Zellteilungsrate für die Passage der Zellkultur hat u. a. einen Einfluss auf den pH-Wert, die Nährstoffversorgung im Allgemeinen und den Glukose-Stoffwechsel im Speziellen. Die bereits als Ursache für eine Variabilität der Ergebnisse des MTT-Tests aufgeführte Abhängigkeit von dem durchführenden Laboranten könnte hier folglich eine größere Rolle spielen als bei anderen Fragestellungen und dadurch ebenfalls zu stark abweichenden Ergebnissen führen.

Hinzu kommt, dass In-Vitro-Versuche die bereits in Kapitel 5.1.1.1 genannten Wirkmechanismen (Minderung der Neoangiogenese, Minderung der Sekretion hämatopoetischer Faktoren, etc.) nicht berücksichtigt, woraus die allgemein positiveren Ergebnisse aus In-Vivo-Studien resultieren.

Bei der präklinischen Evaluation von DCA sollte man die hier genannte Kritik am Versuchsmodell berücksichtigen und die auf diesem Wege gewonnenen Erkenntnisse entsprechend werten.

Auch wenn diese Arbeit mehr Zelllinien in zahlreicheren Konzentrationskonstellationen sowie bei höheren DCA-Konzentrationen (vgl. Kap. 5.1.1.2) getestet hat, ist bei den genannten fulminanten Auswirkungen abweichender Assayvariablen (Vorinkubationszeit, Wahl der Zellteilungsrate, etc.) den Ergebnissen dieser Arbeit im Vergleich zu den Resultaten von Heshe et al. (2011) [12] keine höhere Validität zuzuschreiben. Dennoch entkräften sie eine potentiell aufgrund der von Heshe et al. (2011) [12] ermittelten Ergebnisse aufgestellte Vermutung eines grundlegend unterschiedlichen Ansprechens von pädiatrischen und adulten neoplastischen Zelllinien. Hieraus ergibt sich nicht nur eine weiterhin eventual bedeutsame Rolle von DCA auch in der Therapie pädiatrischer Patienten, sondern auch die Folgerung, dass die weitaus zahlreicheren Erkenntnisse aus der Erforschung adulter neoplastischer Erkrankungen in Bezug auf DCA, zumindest teilweise, auf die pädiatrische Onkologie übertragbar sein könnten.

19 der insgesamt 27 additiven/ supraadditiven Effekte traten in den Zelllinien DAOY, UW228.2 und MNNG-HOS auf, was für eine besonders günstige Interaktion der Substanzen in diesen Zelllinien spricht. Interessanterweise wurde bei der Zelllinie OST hingegen nur für zwei der 10 Kombinationskonstellationen ein additiver/ supraadditiver Effekt festgestellt. Außerdem zeigte sich auch in dieser Zelllinie der einzige ermittelte „Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ für die Kombination Cisplatin-DCA. Eine entitätenspezifische Empfehlung für diese Kombination kann somit auf Grundlage dieser Erkenntnisse nicht ausgesprochen werden. Es wären folglich weitere Tests unter Hinzunahme weiterer Zelllinien dieser Entität aufschlussreich. Auf die neun bei dieser Kombination ermittelten „Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung“ wird aus genannten Gründen (s. Kap. 5.1.2) sowie im Hinblick auf eine Priorisierung in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

Die hier genannten synergistischen Effekte bei den Versuchsdurchführungen anderer Forschungsgruppen, wurden für Cisplatin im Bereich therapeutischer Dosierungen in vivo erzielt ($\approx 6,5 \mu\text{mol/l}$ [215], s. o.). Dies ist auch der Konzentrationsbereich, bei dem diese Arbeit die größte Anzahl²² sowie Ausmaß²³ an additiven/ supraadditiven Effekten beobachten konnte (vgl. Kap. 4.1.2.2). Für DCA wurden Synergismen in dieser Kombination jedoch in den häufigeren Fällen an adulten neoplastischen Zelllinien (vgl. letztes Kapitel) erst bei Konzentrationen über dem therapeutischen Bereich (ca. $0,5 \text{ mmol/l}$, s. o.) ermittelt.

Trotzdem sollte eine weitere Evaluation von DCA-Cisplatin-Kombinationstherapien erfolgen, da bereits additive Effekte die Prognose signifikant verbessern können. Des Weiteren sind, analog zu den Erkenntnissen über eine Inkubation mit DCA alleine (s. Kap. 5.1.1), auch in Kombination mit Cisplatin stärkere Effekte in vivo zu erwarten. Die hier aufgezeigten Erkenntnisse zeugen von einem noch großen Bedarf weiterer Forschung, welche auch im Fachbereich der pädiatrischen Onkologie sinnvoll ist.

Eine weitere präklinische Evaluation sollte als Schlussfolgerung dieser Erkenntnisse...

- durch In-vivo-Versuche stattfinden, um der Modulation des Metabolismus der Neoplasie im Hinblick auf die Interaktion mit dem Organismus (Neoangiogenese, Microenvironmental Acidosis, etc.) durch DCA Rechnung zu tragen. Hier wären beispielsweise Xenograft-Transplantationen mit den hier verwendeten pädiatrischen Tumor-Zelllinien sinnvoll.
- die Beobachtungen über die Abhängigkeit der Wirkung von der zeitlichen Applikation bei pädiatrischen neoplastischen Zelllinien prüfen (Wirkungsverstärkung bei Koinkubation, Wirkungsabschwächung bei Vorinkubation mit einer der beiden Substanzen; vgl. Ergebnisse von Olszewski et al. (2010) [196] im letzten Unterkapitel 5.1.2.1.1). Dies ließe sich sowohl in vivo als auch in vitro realisieren.
- die Beobachtung der Abhängigkeit der Wirkung von den atmosphärischen Bedingungen implizieren (stärkere Wirkung unter hypoxischen Bedingungen; vgl. Studie von Garon et al. (2014) [213] im letzten Unterkapitel 5.1.2.1.1). Von besonderem Interesse wären dabei Tests, welche den Einfluss von Änderungen der atmosphärischen CO_2 - (Einfluss auf den pH-Wert) und O_2 -Konzentration (Einfluss auf die PDK-Expression [213]) unabhängig voneinander untersuchen. Dies ließe sich in vitro durch Versuchswiederholungen unter entsprechenden Einstellungen am Inkubator leicht bewerkstelligen.

²² 9 Fälle bei $1 \mu\text{mol/l}$ Cisplatin (= Konzentrationsverhältnis von 1:10.000 bzw. 1:25.000), 5 Fälle bei $10 \mu\text{mol/l}$ Cisplatin (= Konzentrationsverhältnis 1:1000 – 1:2.500)

²³ alle 3 supraadditiven Effekte $\geq 10 \%$ bei 1 und $10 \mu\text{mol/l}$ Cisplatin

- die Erfahrung über die Abhängigkeit der Wirkung von der Art der Platinverbindungen beachten (vgl. Beobachtungen von Olszewski et al. (2010) [196] im letzten Unterkapitel: Stärkere Wirkung bei Carboplatin, Satraplatin, JM118 und Oxoplatin als bei Cisplatin, Oxaliplatin oder Picoplatin; außerdem Xue et al. (2012) [214]: Höhere Sensibilität gegenüber Mitaplatin).

Sollten trotz der genannten Vorzüge *in vivo* künftige Untersuchungen zu therapeutischen Zugängen zum Warburg Effekt *in vitro* erfolgen, wären ergänzende Untersuchungen zu *In-vitro*-Artefakten obligatorisch. Um ein potentiell geeignetes prädiktives *In-vitro*-Modell für DCA-Wirkungen zu erhalten, sollten aus diesem Grund die diskutierten Einflussgrößen wie bspw. eine unterschiedliche Vorinkubation der Zelllinien vor Auftragen der toxischen Substanzen, unterschiedliche Glukosekonzentrationen, Ausmaß der DCA-vermittelten Reduktion des Selektionsdruckes durch Azidose (vgl. letzter Abschnitt von Kap. 5.1.1.1) geprüft werden.

Die hier postulierte Abhängigkeit der Ergebnisse von den genannten Versuchsbedingungen lässt alle vorhandenen *In-vitro*-Daten kritisch hinterfragen und verbietet direkte klinische Konsequenzen im Sinne von Heilversuchen.

5.1.2.2 Kombination von DCA und Doxorubicin

5.1.2.2.1 Überblick über den publizierten Wissensstand

Die Erkenntnisse über Kombinationsversuche von Doxorubicin und DCA sind noch gering: Diese Arbeit ist erst die dritte überhaupt, welche sich mit diesem Thema auseinandergesetzt hat und nach Heshe et al. (2011) [12] die zweite im Zusammenhang mit pädiatrischen neoplastischen Zelllinien.

Durch die zusätzliche Inkubation von (DCA 20 mmol/l) zu Doxorubicin (0,5 µmol/l) wurde in einer Arbeit von Dai et al. (2014) [216] das relative Zell-Überleben einer adulten humanen Leberzellkarzinom-Zelllinie (HCC-LM₃) durch additive Effekte von 72 % auf 39,5 % verringert (relatives Zell-Überleben nach Inkubation mit DCA [20 mmol/l] alleine: 79 %). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer anderen Zelllinie (SMMC-7721) der gleichen Entität beobachtet: relatives Zell-Überleben bei Inkubation von DCA alleine: 89 %, relatives Zell-Überleben bei Inkubation mit Doxorubicin alleine: 47 %; relatives Zell-Überleben bei Inkubation mit DCA + Doxorubicin: 37 %). DCA alleine zeigte bei der nicht-neoplastischen Hepatozyten-Zelllinie LO₂ keine zytotoxischen Eigenschaften. Auch erhöhte es in dieser Zelllinie die Zytotoxizität von Doxorubicin durch Koinkubation nicht (relatives Zell-Überleben 42.89% versus 43.62%, $p > 0.05$). Darüber hinaus traten durch Kombination hervorgerufene signifikant erhöhte ROS-Level und Apoptoseraten nur in den beiden neoplastischen, jedoch nicht in der nicht-neoplastischen Hepatozyten-Zelllinie auf. Gleichsinnig mit der Reduzierung der ROS durch

zusätzliche Inkubation mit dem Thiol-Antioxidanten NAC (10 mmol/l) nahmen die Zytotoxizität von DCA komplett und diejenige von Doxorubicin und der Kombination beider Substanzen stark ab. Umgekehrt erhöhten sich diese Parameter durch zusätzliche Inkubation von BSO (Inhibitor der γ -Glutamylcystein-Synthetase; führt durch verminderte Synthese des Antioxidans Glutathion zu geringerer ROS-Reduzierung, wodurch deren Konzentration steigt). Die Autoren unterstreichen hiermit die bedeutungsvolle Rolle der ROS im Wirkungsmechanismus von DCA (auch in Kombination mit anderen Substanzen) [216].

Eine signifikante Wirkungsverstärkung durch die Kombination von DCA mit Doxorubicin zeigte sich auch in vivo durch ein vermindertes Tumorwachstum von HCC-LM3-Xenografts in Mäusen (Vergleich Gewicht zur Kontrolle: Doxorubicin 75,5%, DCA: 82 %, Doxorubicin + DCA: 56 %) [216].

Heshe et al. (2011) [12] untersuchten den Einfluss der Koinkubation von DCA zu Doxorubicin lediglich an den Leukämie-Zelllinien MOLT4 und CCRF-CEM. Für diese Versuche wurde eine DCA-Konzentration von 1 mmol/l und eine Doxorubicin-Konzentration von 10 μ mol/l gewählt (= Konzentrationsverhältnis 1:100). Hier zeigten sich ein kompletter Verlust der Zytotoxizität und eine verminderte Caspase-3-Aktivierung von bzw. durch Doxorubicin in Kombination mit DCA, ähnlich zu den oben genannten Ergebnissen bei Cisplatin [12].

In einer Studie zur Doxorubicin-Plasmaspitzenkonzentration bei Kindern wurde nach Infusion von 30 mg/ m² Körperoberfläche aus 87 Blutproben von 27 Kindern im Alter von 1,6 - 20 (\bar{x} 4,3) Jahren ein Mittelwert von 273 μ g/l ermittelt (geometrischer Variationskoeffizient = 46 %) [217]. Dies entspricht umgerechnet einer Konzentration von \approx 0,5 μ mol/l.

5.1.2.2.2 Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Datenlage

Auch wenn über die Kombination DCA-Doxorubicin im Vergleich zu DCA-Cisplatin nur wenige Erkenntnisse vorliegen, sind die Ergebnisse dieser Arbeit in einen ähnlichen Zusammenhang zu setzen: Es wurden in der vorhandenen Literatur für diese Kombination antagonistische bis additive Effekte ermittelt (s. Kap 5.1.2.2.1) und gleichermaßen liegen die in dieser Arbeit ermittelten überwiegenden NANAK-Effekte²⁴ (vgl. Kap. 4.1.2.3) zwischen diesen beiden Polen. Im Gegensatz zu den Kombinationstestungen zu DCA-Cisplatin, wo ein Teil der Kombinationstestungen dieser Arbeit mit denen von Heshe et al. (2011) [12] teilweise vergleichbar (gleiches Konzentrationsverhältnis) bis identisch (auch kongruente absolute Konzentrationen) waren, sind die Versuche zur Kombination DCA-Doxorubicin weniger konform: Heshe et al. (2011) [12] testete bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:100 bei 1

²⁴ NANAK-Effekte: 65 von 80 Kombinationskonstellationen; neben vier „Antagonismen gegenüber der Zytostatika-Wirkung“, 6 „Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung“ und 5 additiven/supraadditiven Effekten (vgl. Kap. 4.1.2.3)

mmol/l DCA und 10 µmol/l Doxorubicin, während diese Arbeit die Effekte bei Konzentrationsverhältnissen von 1:2,5 x 10⁷ bis 1:1000 sowie DCA-Konzentrationen um eine Zehnerpotenz höher und mehr evaluierte. Somit opponieren die in diesem Unterkapitel diskutierten Ergebnisse den von Heshe et al. (2011) [12] gemachten Beobachtungen weniger aussagekräftig als im letzten Unterkapitel 5.1.2.1: Es wäre möglich, dass bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:100 in der Tat vermehrt antagonistische Effekte auftreten als bei den in dieser Dissertation verwendeten Konzentrationsverhältnissen.

Einen Anhaltspunkt für diese These lässt sich auch aus den Ergebnissen dieser Dissertation ableiten: Mehr als noch bei der Kombination DCA-Cisplatin zeichnete sich hier (ebenso bei den übrigen konventionellen Zytostatika, s. folgende Unterkapitel) eine Abhängigkeit der Effektqualität (antagonistisch, additiv, etc.) von der Doxorubicin-Konzentration bzw. dem Konzentrationsverhältnis zwischen DCA und Doxorubicin ab: Die additiven/ supraadditiven Effekte traten ausschließlich bei Doxorubicin-Konzentrationen bis 0,01 µmol/l (= Konzentrationsverhältnisse: 1:2,5 x 10⁷ bis 1:1.000.000) zutage, während „Antagonismen gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ erst ab Doxorubicin-Konzentrationen ≥ 0,1 µmol/l (= Konzentrationsverhältnisse 1:100.000 bis 1:1000) auftraten. Es wäre also möglich, dass dieser Trend sich bei einem Verhältnis von 1:100 fortgesetzt hätte. Trotzdem ist nicht damit zu rechnen, dass bei diesem Konzentrationsverhältnis in Versuchsreihen dieser Arbeit die unerwünschten Interaktionen die Mehrzahl ausgemacht hätten – oder wie bei Heshe et al. (2011) [12] ausschließlich aufgetreten wären²⁵. Abgesehen davon ist das in dieser Arbeit mitgetestete Konzentrationsverhältnis von 1:1000 klinisch relevanter: Bei einer an Kindern in vivo ermittelten Plasma-Spitzenkonzentrationen nach Doxorubicin-Standard-Dosis-Applikation von ≈ 0,5 µmol/l (s. letztes 5.1.2.2.1) und der therapeutischen DCA-Konzentration von ≈ 0,5 mmol/l (vgl. Kap. 1.4.2.1.2) ergibt sich ebendieses therapeutisch potentiell relevante Konzentrationsverhältnis.

Hier muss jedoch angemerkt werden, dass die Abhängigkeit der Effektqualität von der Konzentration auch durch das verwendete Versuchsmodell bedingt sein kann: Niedrige Einzeldosis-Konzentrationen korrelieren mit niedrigen Einzeldosis-Effekten. Bewirken beispielsweise Substanz A und Substanz B alleine jeweils in niedriger Konzentration eine Wachstumshemmung von 10 %, so muss der kombinatorische Effekt für die Erfüllung der Definition eines additiven Effektes lediglich 20 % betragen. Bewirken diese Substanzen in höherer Konzentration bei Einzel-Inkubation jeweils eine Wachstumshemmung von 50 %, so

²⁵ bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:100.000, 1:10.000 und 1:2500 sowie 1:1000 traten in dieser Arbeit lediglich in jeweils einem von 16 Kombinationstestungen ein Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung auf; bei den anderen sechs getesteten Konzentrationskonstellationen (1:25.000, 1:250.000, 1:1.000.000, 1:2.500.000, 1:10⁷, 1:2,5x10⁷) ergaben sich keinerlei entsprechenden Effekte)

muss die Kombination für die Erfüllung der Definition eines additiven Effektes zur Abtötung aller Zellen führen. Es ist offensichtlich, dass dies wesentlich weniger wahrscheinlicher ist. Auch sind Ergebnisse bei niedrigem relativen Zell-Überleben weniger reliabel, da „Ausreißer“ bei niedriger Zellzahl mehr zum Tragen kommen.

Über die Eignung des angewendeten Versuchsmodells und (neben unterschiedlichen Wirkstoff-Konzentrationen und Konzentrations-Verhältnissen potentielle weitere) Erklärungen zu den divergierenden Ergebnissen zwischen dieser Arbeit und denjenigen von Heshe et al. (2011) [12] wurde in Kapitel 5.1.2.1.2 bereits differenziert diskutiert. Demgemäß wird an dieser Stelle hierauf verzichtet und lediglich darauf hingewiesen, dass auch die Ergebnisse aus dem angewendeten In-vitro-Modell zur Kombination von DCA mit Doxorubicin sowie infolgedessen die daraus gezogenen Schlussfolgerungen vor dem Hintergrund der genannten Kritik zu werten sind. Dennoch tragen diese Ergebnisse auch hier zum weiteren Wissensstand bei: Während Dai et al. und Heshe et al.(2011) [12] in ihren Veröffentlichungen jeweils lediglich über die Effekte an zwei neoplastischen Zelllinien einer Entität und bei jeweils einer Konzentration von DCA berichten (s. o.), sind in dieser Arbeit die entsprechenden Effekte bei acht Zelllinien aus drei verschiedenen Entitäten unter Inkubationsschemata mit zwei verschiedenen DCA-Konzentrationen in Kombination mit jeweils fünf verschiedenen Doxorubicin-Konzentrationen dargelegt. Wie auch bei DCA-Cisplatin war keine eindeutige Abhängigkeit der Kombinations-Effekte von der DCA-Konzentration zu verzeichnen²⁶.

Interessanterweise zeigten sich bei den beiden Zelllinien, welche die einzigen antagonistischen Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum aufwiesen (DAOY und OST) – gleichsam wie in der Zelllinie OST bei der Kombination DCA-Cisplatin – gleichzeitig auch 3 der 5 hier ermittelten additiven/supraadditiven Effekte. Auch wenn sowohl „Antagonismen gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ (wie bei allen anderen Kombinationstests auch) sowie „Antagonismen gegenüber der DCA-Wirkung“ hier bei den leukämischen Zelllinien nicht auftraten, kann man somit nicht undifferenziert der Kombination DCA-Doxorubicin in dieser Entität eine stärkere kombinatorische Wirksamkeit zuschreiben.

Stockwin et al. (2010) [13] ermittelten, dass Zelllinien mit mitochondrialen Defekten in besonderem Maße DCA-sensibel sind. Aus diesem Grunde empfehlen sie für eine weitere klinische Evaluation die Selektion von Patienten, welche sich durch Neoplasien mit dieser Eigenschaft auszeichnen oder alternativ die Kombination von DCA mit Substanzen, welche die

²⁶ 2 additive/ supraadditive Effekte bei 10 mmol/l DCA vs. 3 entsprechende Effekte bei 25 mmol/ DCA; 3 antagonistische Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum bei 10 mmol/l DCA vs. 1 entsprechender Effekt bei 25 mmol/l DCA; jeweils 3 antag. Effekte gegenüber DCA bei 10 und 25 mmol/l DCA, s. Kap. 4.1.2.3

Mitochondrien schädigen [13]. Sowohl für Cisplatin als auch für Doxorubicin wurde, neben den in Kapitel 5.1.2 genannten Interaktionen mit der DNA im Nukleus, eine Schädigung der mitochondrialen DNA in besonderem Maße nachgewiesen [218], [219]. Die Ähnlichkeit in der Wirkungsweise und die in dieser Arbeit ermittelte positive Korrelation von Doxorubicin und Cisplatin auf das relative Zell-Überleben der hier untersuchten acht pädiatrischen neoplastischen Zelllinien²⁷ wären eine mögliche Erklärung für die Analogie der genannten Erkenntnisse über die Kombinationen DCA-Cisplatin und DCA-Doxorubicin (neben vielen anderen, wie bspw. Resistenzmechanismen wie z. B. Drug-Efflux). Würde dies zutreffen, so ließen sich auch für zukünftige Arbeiten vergleichbare Ergebnisse erwarten.

Das Fazit zur Kombination von DCA mit Doxorubicin fällt ähnlich aus wie für die Kombination mit Cisplatin: Es handelt sich um eine potentiell gewinnbringende Kombination, welche unter den in Kapitel 5.1.2.1.2 genannten Forschungsanregungen weiter evaluiert werden sollte.

5.1.2.3 Kombination von DCA und Etoposid

5.1.2.3.1 Überblick über den publizierten Wissensstand

In der in Kapitel 5.1.2.1.1 genannten Studie von Olszewski et al. (2010) [196] über die Kombination von DCA mit verschiedenen Platinverbindungen wurde gleichfalls die Kombination von DCA mit Etoposid untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls eine signifikant erhöhte Zytotoxizität durch die Koinkubation von DCA (10 mmol/l) zu Etoposid in den beiden getesteten SCLC-Zelllinien. Den Ergebnissen zu den Platinverbindungen entsprechend führte eine Vorinkubation von DCA (drei Tage) vor Etoposid und eine Vorinkubation von Etoposid (vier Tage) vor DCA zu einer Wirkungsabschwächung (erstere jedoch nicht signifikant) [196].

Morfouace et al. veröffentlichten im Jahre 2012 [220] eine Studie, in welcher die Effekte der Kombination von DCA mit Etoposid in zwei aus Ratten gewonnenen Gliom-Stammzellen und einer ebenfalls aus Ratten gewonnenen, nicht-neoplastischen neuralen Stammzelle untersucht wurden. DCA alleine erhöhte hier in den beiden neoplastischen Zelllinien bei einer Konzentration von 1 mmol/l die Expression von p53 (10 bzw. 27fach) und Foxo3 (4 bzw. 31fach). Beides sind u. a. Transkriptionsfaktoren für die proapoptotischen Faktoren Noxa, Puma, Bim und Bad. So wurde auch eine erhöhte Expression der die Bax-abhängige Apoptose vermittelnden (vgl. Kap. 2.1.2.1.2) Faktoren Bad, Noxa und Puma um das 2-5 fache ermittelt. Ebenfalls wurde durch DCA alleine in Konzentrationen bis 1 mmol/l neoplasie-spezifisch die LDH-Aktivität erniedrigt und die oxidative Phosphorylierung rekonstituiert. Dennoch wurde in den Gliom-Stammzellen keine erhöhte ROS-Produktion und konsekutive Apoptose festgestellt. Der Effekt auf die Zellviabilität und Proliferation war nur gering ausgeprägt. Letzteres traf ebenso auf eine alleinige Inkubation

²⁷ Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman $r_s = 0,714$, $p = 0,0374$, vgl. Kap. 4.1.1.3

mit Etoposid (50 $\mu\text{mol/l}$) oder alleinige Bestrahlung (5 Gray) zu. Eine Vorinkubation (48 Stunden) mit 1 mmol/l DCA vor Etoposid-Applikation oder Bestrahlung jedoch führte in den beiden neoplastischen (hingegen nicht in der nicht-neoplastischen) Zelllinien zu einer Steigerung der Zelltodrate von jeweils ca. 15 % auf ca. 75 % und einer mindestens dreifachen Erhöhung der Caspase-Aktivität (i. e. DEVDase) [220].

Um die Effekte in vivo an Xenografts zu evaluieren, wurde in derselben Arbeit Mäusen eine der bereits für die In-vitro-Versuche verwendeten Gliom-Stammzelllinie injiziert. Die vier verschiedenen Versuchsgruppen erhielten A: Keine Intervention (Kontrolle), B: Mit DCA (0,075 g/ml) versetztes Trinkwasser, C: Intraperitoneale Etoposid-Injektionen (200 μg) für 5 von 7 Tagen über 40 Tage, D: Etoposid-Injektionen und mit-DCA-versetztes Trinkwasser. Erwarteter Weise waren die Effekte von DCA alleine in vivo, im Vergleich zu in vitro, wesentlich stärker. Die Kombination von DCA mit Etoposid potenzierten auch hier die Effekte der Substanzen alleine. So maßen die Tumoren in der Kontrollgruppe $681 \text{ mm}^3 \pm 71$, in der Etoposid-Gruppe $653 \text{ mm}^3 \pm 79$, in der DCA-Gruppe $322 \text{ mm}^3 \pm 54.8$ (47 % im Vergleich zur Kontrolle) und in der Kombinationsgruppe $67 \text{ mm}^3 \pm 11.2$. Die zusätzliche Gabe von DCA führte also zu einer zusätzlichen Abnahme des Tumolvolumens um fast 90 % zu derjenigen von Etoposid alleine. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei intrakraniellen Xenografts ermittelt [220].

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die ermittelten synergistischen Effekte der Kombination von DCA und Etoposid in vitro nicht nur im therapeutischen Konzentrationsbereich von Etoposid (Mittelwert des Peak-Levels von 30 adulten Probanden: 30 $\mu\text{g/ml}$ = 51 $\mu\text{mol/l}$ [221]), sondern auch nahe desjenigen von DCA beobachtet wurden (0,5 mmol/l , vgl. Kap. 2.4.2).

5.1.2.3.2 Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Datenlage

Obwohl die oben genannten Ergebnisse der anderen Forschergruppen zur Kombination von DCA und Etoposid ebenfalls sehr vielversprechend sind, fielen die Ergebnisse dieser Arbeit, verglichen mit denen der Kombinationsversuche von DCA mit Cisplatin und Doxorubicin, trotz der insgesamt 12 additiven/ supraadditiven Effekte, bescheidener aus:

Neben den hauptsächlichen NANAK-Effekten, zeigten sich in den vier Zelllinien der Entitäten Medulloblastom und Osteosarkom ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ insgesamt 19 „Antagonismen gegenüber der Zytostatika-Wirkung“. Hieraus ergibt bei 80 Konzentrationskonstellationen bezüglich dieser Substanzkombinationstestung ein Anteil von ≈ 24 %. Dies ist insofern potentiell auch klinisch bedeutsam, als dass das Ausmaß dieser Effekte (sowohl numerisch als auch qualitativ) vor allem bei Etoposid-Konzentrationen von 10 und 100 $\mu\text{mol/l}$ auftrat²⁸, also im für diese Substanz therapeutisch relevanten Konzentrationsbereich (≈ 50

²⁸ = bei Etoposid-DCA-Konzentrationsverhältnissen von 1:1000 bzw. 2500 und 1:100 bzw. 250

µmol/l, s. o.). Erklärungen für diese zelllinienspezifischen Unterschiede in Bezug auf die Effekte der Kombination von DCA mit Etoposid finden sich in der aktuellen Literatur nicht.

Auch in den Versuchsreihen zu dieser Substanzkombination geht das Auftreten von „Antagonismen gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ häufig mit dem gleichzeitigen Auftreten von additiven/ supraadditiven Effekten bei anderen Konzentrationen des konventionellen Zytostatikums in derselben Zelllinie einher. Mit 19 % und 16 % Wirkungsverstärkung (über einen rein additiven Effekt hinaus) bei Etoposidkonzentrationen von 0,01 bzw. 0,1 µmol/l zeigten sich in der Zelllinie DAOY bei 10 mmol/l DCA²⁹ sogar die stärksten supraadditiven Effekte aller Versuchsergebnisse der Kombination DCA-Etoposid, während sich bei den höheren Etoposidkonzentrationen ausschließlich „Antagonismen gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ abzeichneten. Dies zeugt von einer sehr komplexen und stark konzentrationsabhängigen Interaktion der verwendeten Substanzen. Auch die beobachteten antagonistischen Kombinationseffekte sind vor dem Hintergrund der bereits dargelegten Modellkritik zu werten. Insbesondere im Hinblick auf die In-vivo-Beobachtungen von Morfouace et al. (2012) [220] ergibt sich die Motivation zu weiterer Evaluation dieser Substanzkombination. Anregungen zu Versuchsoptimierungen finden sich in Kapitel 5.1.2.1.2.

5.1.2.4 Kombination von DCA und SN38

5.1.2.4.1 Überblick über den publizierten Wissensstand

Über die Effekte einer Kombination von DCA und SN38/ Irinotecan ist gegenwärtig noch keine Literatur vorhanden. Dies trifft ebenfalls auf andere Topoisomerase-I-Inhibitoren wie Camptothecin, etc. zu. Lediglich in Bezug auf Topotecan liegen zu dieser Thematik Erkenntnisse vor: Die hier mehrfach zitierte Studie von Stockwin et al. (2010) [13] ermittelte in In-vitro-Zytotoxizitätstests für die Kombination von DCA (0,3-30 mmol/l) und Topotecan (0,3-300 nmol/l) in der Zelllinie A549 (etabliert aus einem humanen Lungen-Adeno-Karzinom) einen Combination Index von 0.15 (< 1 = Synergismus, vgl. Kap. 5.1.2.1.1, [13]).

Die maximale Plasmakonzentration von therapeutischen Dosierungen von SN38 beträgt ≈ 0,1 µmol/l:

- Bei einem 21 jährigen Patienten nach einer Dosis von 20 mg/m² Irinotecan wurde eine „repräsentative“ SN38-Spitzenkonzentration von 30 ng/ml (≈ 0,08 µmol/l) ermittelt [222].
- Bei einer 60 Jahre alten Frau betrug die SN-38-Spitzenkonzentration nach Applikation von 420 mg Irinotecan 0,1 µmol/l [223].

²⁹ = Konzentrationsverhältnis 1:1.000.000 bzw. 1:100.000

- Bei 8 Probanden im Alter von 56 – 67 Jahren wurde nach einer Irinotecan-Dosis von 100 mg/m² eine SN-38-Spitzenkonzentration von im Mittel 0,08 µmol/l gemessen [224].

5.1.2.4.2 Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Datenlage

Wie bei der Kombination von DCA mit Etoposid waren in den In-vitro-Zytotoxizitätstests bei der Kombination mit SN38 vermehrt „Antagonismen gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ zu beobachten. Diese traten ebenso in allen vier Zelllinien der beiden Entitäten Medulloblastom und Osteosarkom auf, zeigten sich hier jedoch in weniger Konzentrationskonstellationen (12/ 80 [= 15 %] anstelle von 19, vgl. Kap. 4.1.2.5) und waren hier schwächer ausgeprägt (nur 5 antagonistische Effekte \geq 5 % vs. 8 entspr. Effekte). Gleichmaßen traten die antagonistischen Effekte, außer bei OST (antagonistischer Effekt erst bei 1 µmol/l) hier in den betroffenen Zelllinien u. a. im therapeutischen Bereich von SN38 auf (0,1 µmol/l, s. o.).

In der Zelllinie DAOY ergaben sich bei einer DCA-Konzentration von 10 mmol/l vier „Antagonismen gegenüber der Zytostatika-Wirkung“, während ein solcher bei 25 mmol/l nur einmal auftrat. Auch wenn in vielen anderen Substanzkombinationsversuchen in anderen Zelllinien und mit anderen konventionellen Zytostatika das Verhältnis aus erwünschten und unerwünschten Interaktionen zwischen 10 und 25 mmol/l DCA relativ konstant ist, zeigt dies, dass die Ergebnisse bei 10 mmol/l DCA nicht generell auf die Verhältnisse bei 25 mmol/l DCA (und vice versa) übertragbar sind. Dies bedeutet, dass das verwendete Versuchsmodell, abgesehen von der bereits in den letzten Unterkapiteln abgehandelten Versuchsmodell-Kritik, auch keine validen Rückschlüsse auf die Interaktionen bei der eigentlich klinisch relevanten DCA-Konzentration von 0,5 mmol/l zulässt. Zumal letztere um den Faktor 20 viel stärker von 10 mmol/l abweicht als 25 mmol/l (Faktor 2,5).

Auch hier kann zum jetzigen Zeitpunkt die Ursache für diese zelllinien- und konzentrationspezifischen Unterschiede in Bezug auf die Effekte der Kombination von DCA mit SN38 nicht genannt werden. Die Vergleichbarkeit der Effekte der Kombinationen von DCA mit Etoposid und SN38, im Gegensatz zu den direkt mit der DNA und zusätzlich mit den Mitochondrien interagierenden Zytostatika Cisplatin und Doxorubicin, könnte in der Ähnlichkeit der Wirkmechanismen dieser Substanzen begründet sein: Beide führen zu DNA-Strangbrüchen durch Inhibition einer DNA-Topoisomerase (SN38: Topoisomerase I, Etoposid: Topoisomerase II, vgl. Kap. 3.2.15.1.2). Weitere Erkenntnisse, wie DCA im Detail zur Steigerung der Zytotoxizität von Zytostatika führt bzw. Veri- und Falsifikationen der teilweise widersprüchlichen Erkenntnisse, könnten in Zukunft wiederum auch Aufschluss über die Realitätsnähe dieser These geben.

Kontraproduktive Effekte durch die Kombination von DCA mit SN38 wurden in leukämischen Zelllinien im Rahmen der Versuchsansätze dieser Arbeit nicht festgestellt. Bei den vier getesteten

Zelllinien der Entitäten Medulloblastom und Osteosarkom standen die 12 antagonistischen Effekte numerisch hinter den 28 erwünschten (NANAK bis additiven/ supraadditiven) Effekten. Daher ergeben sich, vor allem unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Stockwin et al. (2010) [13], durch die Kombination von SN38 und DCA vielversprechende Wirkungen, die ebenso wie mit den anderen konventionellen Zytostatika zu einem Fortsetzen der präklinischen Evaluation mit entsprechenden genannten Versuchsmodell-Optimierungen auffordern.

5.1.2.5 Kombination von DCA und Temozolomid

5.1.2.5.1 Überblick über den publizierten Wissensstand

Michelakis et al. untersuchten die Wirkung von DCA auf Glioblastom-Stammzelllinien. Hierbei wurde eine Apoptoseinduktion, HIF1 α -Hemmung, p53-Aktivierung und Weiteres bereits durch DCA alleine (0,5 mmol/l) in vitro beobachtet. Eine Koinkubation mit 100 μ mol/l Temozolomid verstärkte die Aktivierung bzw. Expression einiger Apoptosemarker zusätzlich. Fünf Glioblastompatienten erhielten additional zu ihrer Standardtherapie (OP, Radiotherapie und Temozolomid) 6,25 mg/kg KG DCA täglich (\emptyset Plasmakonzentration: 0,44 mmol/l \pm 0,16) zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf. Diese Intervention verstärkte auch hier die in vitro erhobenen Parameter, verglichen zur Standardtherapie alleine. Die beste Prognose hatte der Patient, bei welchem DCA nach Diagnosestellung von Anfang an Bestandteil des Therapieschemas war. [9].

Die hier häufig zitierte Arbeit von Heshe et al. 2011 [12] publizierte die Effekte einer Kombination von Temozolomid (100 μ mol/l) und DCA (10 mmol/l), also einem Konzentrationsverhältnis von 1:100, an den pädiatrischen Leukämie-Zelllinien MOLT4 und CCRF-CEM. Hierbei wurde weder eine relevante Abschwächung noch Verstärkung der Zytotoxizität von Temozolomid durch DCA beobachtet [12]

In einer Studie von Wicks et al. 2014 [225] wurde an intrakraniellen hochgradigen Gliom-Allografts in Ratten untersucht, ob die dosis-limitierte Zytotoxizität oraler DCA-Therapie durch Implantation von mit-DCA-versetzten Wafern gesteigert werden kann. Hierbei wurde ein signifikant erhöhtes Überleben in der Gruppe mit implantierten Wafern gegenüber der Gruppe unter oraler DCA-Einnahme ($p = 0,05$) sowie der Kontrolle ($p = 0,02$) beobachtet. Eine zusätzliche Implantation von DCA-Wafern zu einer Kombinationstherapie aus Bestrahlung und oraler Temozolomid-Gabe führte hingegen nicht zu einer signifikanten Verlängerung des mittleren Überlebens, verglichen mit der Radio-Temozolomid-Therapie alleine (40 vs. 34 Tage, jedoch 2 vs. 0 Langzeit-Überlebende) [225].

Zu der Kombination von DCA mit anderen Alkylantien, wie z. B. Melphalan, Procarbazin, Busulfan, Cyclophosphamid, Trofosfamid, Ifosfamid, etc. liegen zum jetzigen Zeitpunkt noch

keine Erkenntnisse vor, sodass hier keine potentiell auf Temozolomid übertragbaren Ergebnisse genannt werden können.

Die Temozolomid-Spitzenkonzentration wurde in einer Untersuchung zur Pharmakokinetik dieser Substanz in 39 Kindern im Alter von 0,7-21,9 Jahren nach einer Dosis von 150-200 mg/m² mit im Mittel 9,1 mg/l = 47 µmol/l beziffert [226].

5.1.2.5.2 Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Datenlage

Was das Verhältnis aus erwünschten und unerwünschten Interaktionen angeht, nimmt die Kombination DCA-Temozolomid hinter der Kombination DCA-Cisplatin³⁰ mit 23 additiven/ supraadditiven zu 5 „Antagonismen gegenüber der Zytostatika-Wirkung“ von insgesamt 80 Konzentrationskonstellationen den zweiten Platz ein.

Den Ergebnissen der anderen vier Substanzkombinationen aus Kapitel 4.1.2 entsprechend zeigten sich in diesem In-vitro-Versuchsmodell die antagonistischen Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum lediglich in den Entitäten Medulloblastom und Osteosarkom (bei hohen Konzentrationen des konventionellen Zytostatikums) und ebenfalls ergaben sich die Mehrzahl der additiven/ supraadditiven Effekte in ebendiesen Entitäten (bei niedrigen Zytostatika-Konzentrationen).

Während die Ergebnisse dieser Arbeit denjenigen von Heshe et al. (2011) [12] hinsichtlich der beobachteten Effekte in den leukämischen Zelllinien bei der Kombination DCA-Cisplatin sowie DCA-Doxorubicin entgegen stehen, sind sich die beobachteten Effekte der beiden Arbeiten für die Kombination DCA-Temozolomid einander ähnlicher: Es zeigten sich weder produktive noch kontraproduktive Interaktionen bei Heshe et al. (2011) [12] (s. Kap. 5.1.2.5.1), während in dieser Arbeit ausschließlich NANAK- bis additive/ supraadditive Effekte auftraten³¹.

Die Bedeutung des guten Verhältnisses aus erwünschten und nicht erwünschten Interaktionen für diese Substanzkombination wird relativiert durch die Tatsache, dass die hier ermittelten antagonistischen Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum vor allem nahe der therapeutischen Konzentration von ≈ 50 µmol/l (vgl. Kap. 5.1.2.5.2) ermittelt wurden³². Trotzdem ergeben die im letzten Unterkapitel und hier genannten Resultate genug Erkenntnisse, um der Kombination DCA-Temozolomid eine potentiell vielversprechende Wirkung zuzusprechen,

³⁰ DCA-Cisplatin: 27 additive/ supraadditive Effekte, 1 Antagonismus gegenüber der Zytostatika-Wirkung, vgl. 4.1.2.2

³¹ bei den beiden identischen „Versuchswiederholungen“ in den gleichen Zelllinien (CCRF-CEM und MOLT4) sowie identischen DCA und Temozolomid-Konzentration ergaben sich in dieser Arbeit jeweils NANAK-Effekte

³² 4 der 5 antagonistischen Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum traten bei einer Temozolomid-Konzentration von 100 µmol/l auf

welche eine weitere Evaluation unter den in Kapitel 5.1.2.1.2 vorgeschlagenen Aspekten sinnvoll erscheinen lässt.

5.2 Diskussion der mRNA-Expressions-Analysen

5.2.1 Kv1.5

5.2.1.1 Überblick über den publizierten Wissensstand

Spannungsabhängige Kaliumkanäle sind neben der in Kapitel 2.1.2.1.2 genannten Funktion für die Apoptoseinduktion in vielen verschiedenen physiologischen Prozessen, von der Proliferation über Immunmodulation, Migration, Adhäsion, Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, Muskeltonus, Kontrolle von Aktionspotentialen, etc., involviert. Der an den meisten dieser Vorgänge beteiligte Subtyp Kv1.5, ist somit auch in fast allen nicht-neoplastischen Zellen exprimiert, wobei die Expressionsrate hier stark vom Zelltyp, Entwicklungsstadium (in der Regel stark erhöhte Expression in fetalen Zelllinien) und Zellzyklus (starke Expression vor allem in der G1-Phase) abhängig ist [74]. Der Kanal ist sowohl an der Plasmamembran (pmKv1.5) als auch an der Mitochondrienmembran (mtKv1.5) lokalisiert und übernimmt dort unterschiedliche Funktionen, welche u. a. eine gleichgerichtete Wirkung haben (beispielsweise eine Beteiligung an proapoptotischen Prozessen). In Zelllinien glatter Muskulatur wurde eine erhöhte Apoptoserate bei erhöhter Expression und eine verminderte Apoptoserate durch Herabregulation von Kv1.5 ermittelt [202].

Überraschenderweise war die Expressionsrate in der Mehrzahl der zahlreich untersuchten neoplastischen Zelllinien erhöht, jedoch wurden auch viele Zelllinien mit verminderten Expressionsraten beschrieben [74], [227]. Außerdem bestand eine positive Korrelation zwischen der Expression von Kv1.5 und dem Malignitätsgrad von Rhabdomyosarkomen [228] und Nierentumoren [74], ebenso wie der klinischen Aggressivität von Neoplasien glatter Muskelzellen [229]. Im Gegensatz dazu sind jedoch auch negative Korrelationen zwischen der Kv1.5-Expression und der klinischen Aggressivität von non-Hodgkin-Lymphomen [74], dem Grading von Gliomen [73] und höhere Überlebensraten von Glioblastompatienten mit einer höheren Expressionsrate von Kv1.5 beschrieben [230].

Die Funktion von Kv1.5 scheint abhängig von der Zelllinie zu sein, da eine Inhibition dieses Kanals beispielsweise die Proliferation von Astrozyten [231], nicht jedoch von Oligodendrozyten [232], [233] hemmt. Dies könnte die gegensinnigen Expressionsraten und das gleichzeitige Auftreten von positiven und negativen Korrelationen mit dem Malignitätsgrad in verschiedenen neoplastischen Zelllinien erklären.

5.2.1.2 Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Datenlage

Die Ergebnisse dieser Arbeit, mit sowohl erhöhten als auch erniedrigten Expressionsraten von Kv1.5³³, stehen im Einklang mit der genannten Literatur. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die oben genannte Beobachtung einer stark vom Zellzyklus abhängigen Expression von Kv1.5. Dies würde zudem die große Anzahl an „Ausreißern“ innerhalb einer Zelllinie (aus drei verschiedenen Passagen) bei der Messung der mRNA-Expression begründen.

Ein weiterer Erklärungsansatz wäre die genannte zelllinienspezifische Funktion: Während der Kaliumkanal in der einen Zelllinie eine antiapoptotische Funktion innehat und dadurch eine Mutation, welche zu einer erhöhten Expression von Kv1.5 führt, in dieser Zelllinie einen Selektionsvorteil darstellt, bedeutet eben eine solche Mutation einen Nachteil für eine andere Zelllinie, in welcher Kv1.5 eine proapoptotische Funktion ausführt. Dies würde sich dementsprechend ebenfalls in gegensinnigen Expressionsraten abbilden.

Die Tatsache, dass divergierende Funktionen bereits in zwei „verwandten“ Zelltypen, den Astrozyten und Oligodendrozyten (beides Subtypen von Neuroglia), beobachtet wurde, könnte auch die in dieser Arbeit ermittelten konträren Expressionsraten von Kv1.5 innerhalb der Entität Ewing-Sarkom begründen: Die Zelllinie CADO-ES1 exprimierte Kv1.5 zehnfach höher als die anderen drei Zelllinien dieser Entität, welche zudem im Gegensatz zu CADO-ES1 auch eine niedrigere Expressionsrate als die Referenz-Zelllinie aufwiesen (vgl. Kap. 4.3.1). Eine andere potentielle Erklärung hierfür könnte die in dieser Zelllinie bestehende t(21,22)-Translokation mit daraus resultierendem EWS/ERG-Fusionstranskript darstellen (die anderen Zelllinien weisen eine t(11,22)-Translokation mit einem EWS/FLI1-Fusionstranskript auf, s. Kap. 3.1.1.1). Da das Gen für Kv1.5 auf Chromosom 12 lokalisiert ist [234] müssten für einen Zusammenhang zwischen dieser Translokation und einer erhöhten Kv1.5-Expressionsrate jedoch die Folgen der Translokation auf den Metabolismus und nicht lediglich die Translokation alleine ursächlich sein. In der aktuellen Literatur finden sich hierzu keine analogen Ergebnisse bzw. theoriestützende Informationen. Eine Evaluation dieses potentiellen Zusammenhanges bedarf folglich weiterer Forschungsarbeit.

5.2.1.3 Korrelationen der Kv1.5-mRNA-Expressionsrate mit der Sensibilität gegenüber verschiedenen Substanzen

Leanza et al. (2014) [202] untersuchten die Korrelation der Kv1.5-mRNA-Expressionsrate mit der Sensibilität u. a. gegenüber Cisplatin und Etoposid in 59 verschiedenen Zelllinien. Ebenso

³³ Jeweils zehn neoplastische Zelllinien weisen eine höhere und niedrigere Expressionsrate als die nicht-neoplastische Referenz auf, vgl. Kap. 4.2.1

wie in dieser Arbeit wurden keine signifikanten Korrelationsindices für diese Substanzen beobachtet [202]. Die signifikanten Korrelationen aus dieser Arbeit werden in den folgenden Kapiteln diskutiert:

5.2.1.3.1 DCA

Es haben sich bereits einige Forschergruppen mit der Rolle von Kv1.5 in Bezug auf eine DCA-vermittelte Apoptoseinduktion beschäftigt. So wurde u. a. eine erhöhte Expression von Kv1.5 infolge einer DCA-Inkubation in verschiedenen Zelllinien ermittelt (Bonnet et al (2007) [2] und Xie et al. (2011) [211], was jedoch von Stockwin et al. (2010) [13], nicht bestätigt werden konnte). Dies ist jedoch die erste Studie, welche eine Korrelation zwischen der Kv1.5-Expression und der Sensibilität gegenüber DCA untersucht hat, wodurch keine Vergleichsmöglichkeiten gegeben sind.

Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass Korrelations-Analysen, welche Ergebnisse aus einem In-vitro Modell beinhalten, ebenfalls im Kontext der in Kapitel 5.1.2.1.2 genannten Modell-Kritik zu werten sind. Dies trifft für die Korrelation mit der Expressionsrate von Kv1.5 ebenso wie für die beobachtete signifikante Korrelation mit der PKM2 (s. Kap. 5.2.2.3.1) sowie VDAC1 (vgl. Kap. 5.2.4.3.1) zu, sodass in den folgenden genannten Kapiteln nicht mehr auf diese Problematik hingewiesen wird. Ebenso sind Korrelationsanalysen hinsichtlich der Toxizität einer Substanz und der Expression eines Targets, welches durch diese Substanz in seiner Expression beeinflusst wird, schwer zu beurteilen.

Die durch Bonnet et al. (2007) [2] sowie Xie et al. (2011) [211] gemachte Beobachtung einer durch DCA-Inkubation stimulierten Expression von Kv1.5 könnte so jedoch die in dieser Arbeit ermittelte signifikante positive Korrelation³⁴ zwischen der Kv1.5-Expression und dem relativen Zell-Überleben nach DCA-Inkubation erklären: Setzt man die in Kapitel 2.1.2.1.2 genannte proapoptotische Funktion von Kv1.5³⁵ voraus, hat eine (DCA-vermittelte) Erhöhung der Expression von Kv1.5 in Zelllinien mit einer vormals niedrigen Expressionsrate auf diese einen stärkeren Effekt hinsichtlich der Verschiebung des Gleichgewichts pro- und antiapoptotischer Prozesse als auf Zelllinien, welche bereits eine hohe Expressionsrate von Kv1.5 aufweisen. Dies geht folglich mit einer höheren Sensibilität gegenüber DCA von Zelllinien mit einer niedrigen Expressionsrate von Kv1.5 einher (= positive Korrelation zwischen Expressionsrate und den relativen Zell-Überleben).

Interessanterweise war eine signifikant positive Korrelation auch bei dem Zytostatikum Doxorubicin zu beobachten, welches ebenso wie DCA den mitochondrialen Stoffwechsel stark

³⁴ nach Spearman (r_s) = 0,905, $p = 2 \times 10^{-7}$, vgl. Kap. 4.2.1.1

³⁵ ein Kanal, welcher den Efflux von K^+ -Ionen begünstigt und somit die K^+ -vermittelte Hemmung der Caspasen aufhebt

beeinflusst [235]. Hingegen wurde eine signifikant negative Korrelation bei Temozolomid ermittelt, für welches keine direkte Interaktion mit den Mitochondrien beschrieben ist. Die positiven Korrelationen könnten demnach alternativ zur bereits genannten These auch Folge DCA- und Doxorubicin-induzierter mtKv1.5-vermittelter antiapoptotischer Effekte sein, welche die ebenfalls durch diese Substanzen ausgelösten proapoptotischen Effekte der Kv1.5 an der Plasmamembran (pmKv1.5) dominieren. Dies wäre zumindest auch eine potentielle Erklärung für das im letzten Unterkapitel beschriebene häufigere Auftreten erhöhter Expressionsraten von Kv1.5 in neoplastischen Zelllinien.

Die in der Literatur sich teils nicht entsprechenden Erkenntnisse in verschiedenen Zelllinien und das in dieser Arbeit ermittelte Ergebnis zeugen von einem noch nicht zufriedenstellenden Verständnis über die Funktion dieses Kanals.

5.2.1.3.2 Doxorubicin

Han et al. (2007) [236] beobachteten ein Einhergehen der Doxorubicin-induzierten Apoptose mit einer signifikanten Zunahme der K^+ -Ionenstromdichte in der getesteten Magen-Adenokarzinom-Zelllinie SGC7901. Eine Blockierung dieses Ionenstromes führte zu einer Minderung der Apoptoserate. Gleichsam ging eine erhöhte Expressionsrate von Kv1.5 mit einer größeren K^+ -Ionenstromdichte und Sensitivität gegenüber Doxorubicin einher, was mit einer Herabregulation von Kv1.5 antagonisiert werden konnte [236]. Diese Ergebnisse entsprechen der in der Literatur vorwiegend als proapoptotisch beschriebenen Funktion von Kv1.5. Ein Vergleich von Korrelationen zwischen einer Kv1.5-Expression und der Sensibilität gegenüber anderen Anthracyclinen (Epirubicin, Idarubicin, Daunorubicin) können aus Mangel an entsprechender Literatur nicht gebracht werden. Die in dieser Arbeit ermittelte positive Korrelation (nach Pearson = 0,771; $p = 0,025$, vgl. Kap. 4.2.1.1) zwischen der Kv1.5-mRNA-Expressionsrate und den GI_{50} bei Doxorubicin steht diesen Erkenntnissen entgegen.

Eine mögliche Erklärung für die hier ermittelte Beziehung wären die in Kapitel 5.2.1.1 genannten Beobachtungen zelllinienspezifischer Eigenschaften von Kv1.5, welche sich u.a. durch einen gegensinnigen Einfluss auf die Apoptose darstellen könnten.

5.2.1.3.3 Temozolomid

Es existiert bislang keine veröffentlichte Studie, welche die Rolle von Kv1.5 für die Apoptoseinduktion durch alkylierende Substanzen untersucht hat. Folglich stehen auch keine Korrelationsdaten zum Vergleich zur Verfügung. Im Gegensatz zu der signifikanten positiven Korrelation zwischen der Kv1.5-mRNA-Expressionsrate und den GI_{50} bei Doxorubicin-Inkubation unterstützt der negative Korrelationskoeffizient in Bezug auf eine Temozolomid-

Inkubation (nach Pearson: $r = -0,857$; $p = 0,00178$) die herrschende Meinung über die proapoptotische Funktion von Kv1.5.

Ein entgegengesetzter Korrelationskoeffizient in Bezug auf das Verhältnis zwischen der Expressionsrate von Kv1.5 und den GI_{50} bei Temozolomid zu den entsprechenden Korrelationskoeffizienten nach Inkubation mit den anderen verwendeten Substanzen ist nicht vollkommen überraschend: Wie in Kapitel 4.1.1.6 beschrieben wurde, weist das Alkylanz Temozolomid von den anderen in dieser Arbeit verwendeten Substanzen grundsätzlich abweichende Parameter auf. So sind die Leukämie-Zelllinien gegenüber Temozolomid, im Gegensatz zu allen anderen getesteten Substanzen, resistenter als die Zelllinien der anderen beiden getesteten Entitäten. Insbesondere hinsichtlich der Korrelationskoeffizienten bei den Expressionsanalysen von DCA und Temozolomid waren durch die ebenfalls dort genannte signifikante negative Korrelation zwischen der Sensibilität der Zelllinien gegenüber Temozolomid und DCA (10 mmol/l) gegensätzliche Vorzeichen zu erwarten.

Der bedeutendste Unterschied zwischen der alkylierenden Substanz Temozolomid und dem interkalierenden Pharmakon Doxorubicin in Bezug auf eine Interaktion mit Kv1.5 ist die bereits oben genannte, zusätzlich zur Wechselwirkung mit der DNA im Nukleus stattfindende Reaktion von Doxorubicin mit der mitochondrialen Membran [235], [237] und mtDNA [218]. Ein divergierender Einfluss von pmKv1.5 und mtKv1.5 auf eine Zytostatika-vermittelte Apoptoseinduktion als weitere potentielle Ursache für die entgegengesetzte Korrelation dieser Substanzen soll daher auch an dieser Stelle genannt werden.

5.2.2 PKM2

5.2.2.1 Überblick über den publizierten Wissensstand

In Kapitel 2.2.3 wurde bereits beschrieben, dass die PKM2 sowohl in nicht-neoplastischen als auch in neoplastischen Zelllinien exprimiert wird, wobei in letzteren und in Zellen embryonalen Ursprungs zumeist eine erhöhte Expressionsrate beobachtet wurde. Zudem liegt in neoplastischen Zelllinien eine Verschiebung des Dimer-Tetramer-Verhältnisses zugunsten der weniger aktiven Dimer-Form („Tumor-PKM2“) vor. An der Stelle wurden ebenfalls Beobachtungen von Selektionsvorteilen genannt, welche mit dieser Veränderung einhergehen. Diese werden untermauert durch Versuche, in welchen ein siRNA-Silencing in vielen neoplastischen Zelllinien eine Apoptose induzierte und zu einer bedeutenden Tumor-Regression in Xenografts führte [238], [239]. Auch konnte die Progression von humanen NSCLC-(H1299-)Xenografts in Mäusen durch eine Verschiebung des Dimer-Tetramer-Gleichgewichts zugunsten der aktiveren Tetramer-Form mithilfe des PKM2-Aktivators TEPP-46 vermindert werden [240].

Jedoch auch für dieses Zielgen gibt es zahlreiche Beobachtungen, welche der herrschenden Meinung über die Rolle der PKM2 für die Onkogenese widersprechen: So berichten Li et al. (2014) [98], dass viele neoplastische Zelllinien eine niedrige oder sogar ausbleibende Expression der PKM2 aufweisen. Bluemlein et al. (2011) [241] demonstrierten hingegen, dass die Expression der PKM2 sowohl in neoplastischen als auch nicht-neoplastischen Nieren-, Lungen-, Schilddrüsen-, Blasen- und Kolon-Zelllinien gegenüber derjenigen der PKM1 dominiert. Auch widersprechen sie der anerkannten Beobachtung, dass die PKM2 vermehrt in proliferierenden Zellen exprimiert wird, während die PKM1 hauptsächlich in nicht-proliferierenden Zellen dominiert [241]. Des Weiteren konnten Cortés-Cros et al. (2013) [242] keine Effekte durch ein PKM2-Knockdown ermitteln und Israelsen et al. (2013) [243] beobachteten dadurch sogar eine Beschleunigung der Kanzerogenese in einem Maus-Model eines Mamma-Karzinoms. Darüber hinaus zeigten Spoden et al. (2009) [244], dass eine Hemmung der PKM2 Zellen vor einer glukosemangel-induzierten Apoptose schützt. Letztgenannte Arbeit zeigt zudem eine kontext-abhängige Rolle der PKM2 auf: Unter physiologischen Glukose-Konzentrationen führt eine Inhibition der PKM2-Aktivität zu einer signifikanten Minderung der Zell-Verdopplungsrate und -Proliferation, während dies unter niedrigen Glukosekonzentrationen eine Zunahme der genannten Parameter bewirkt [244].

5.2.2.2 Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Datenlage

Die Tatsache, dass die relative Expression der PKM2 in den hier getesteten 18 pädiatrischen und zwei adulten neoplastischen Zelllinien so gering ist (lediglich vier Zelllinien weisen eine stärkere Expression als die Referenz auf, vgl. Kap. 4.2.2), kann eventuell damit erklärt werden, dass die Referenz-Zelllinie HEK-293 aufgrund ihres embryonalen Ursprungs bereits eine erhöhte Expression aufweist [98]. Ein Vergleich der PKM2-Expressionsrate in pädiatrischen neoplastischen Zelllinien mit derjenigen in nicht-neoplastischen Zellen mit „normaler“ Expression ist durch diese Versuchsreihe somit nicht gegeben. Dennoch machen die vergleichbaren Ergebnisse der PKM2-Expressionsraten in den pädiatrischen und adulten neoplastischen Zelllinien in dieser Arbeit (mit Ausnahme der drei Zelllinien HL-60, MOLT4, und REH aus der Entität Leukämie) eine grundsätzlich divergierende Funktion der PKM2 in pädiatrischen neoplastischen Zelllinien unwahrscheinlich.

5.2.2.3 Korrelationen der PKM2-mRNA-Expressionsrate mit der Sensibilität gegenüber verschiedenen Substanzen

Für eine Ermittlung der Morphologie der PKM2 (als Tetramer oder Dimer) sind immunhistologische Untersuchungen erforderlich. Da jedoch das Vorliegen einer Dimer- oder Tetramer-Form der PKM2 die Ausprägung des Warburg-Effektes entscheidend beeinflusst (vgl.

Kap. 2.2.3.2), sind ausschließliche mRNA-Expressionsanalysen nur von beschränkter Aussagekraft.

5.2.2.3.1 DCA

Aufgrund der Tatsache, dass die Mehrzahl der veröffentlichten Studien der PKM2 eine antiapoptotische Funktion zuschreiben, war für die Beziehung der PKM2-Expressionsrate mit den relativen Zell-Überleben der getesteten Zelllinien nach Inkubation mit verschiedenen apoptose-induzierenden Substanzen ein positiver Korrelationskoeffizient zu erwarten (je höher die Expression umso resistenter die Zelllinie). Da Anastasiaou et al. (2011) [245] eine Abnahme der Pyruvatkinase-Aktivität der PKM2 durch eine ROS-vermittelte Oxidation dieses Enzyms beobachteten [245], welche die in Kapitel 2.2.3 genannten Selektionsvorteile noch weiter verstärkt, traf diese Erwartung insbesondere auf das ROS-Stimulanz DCA (vgl. Kap. 2.4.1) zu. Somit sind die Ergebnisse dieser Arbeit für die Beziehung der Expressionsrate der PKM2 und den relativen Zell-Überleben nach DCA-Inkubation unerwartet (nach Pearson: $r = -0,759$; $p = 0,0291$, vgl. Kap. 4.2.2.1), ebenso wie für die Korrelation zwischen der Kv1.5-Expression und den relativen Zell-Überleben nach Doxorubicin-Inkubation.

Eine Erklärung für den in dieser Arbeit ermittelten negativen Korrelationskoeffizienten stellen jedoch die Erkenntnisse von Luo et al. (2011) [246] und Prigione et al (2014) [247] dar: Demzufolge ist der HIF-1 α , zusätzlich zu den in Kapitel 2.2.1 genannten Eigenschaften, ein Transkriptionsfaktor für die PKM. Interessanterweise existiert zudem eine positive Rückkopplung, indem die PKM2 wiederum den HIF-1 α stimuliert [246], [247]. Wie bereits in Kapitel 2.4.1 geschildert, führt DCA zu einem vermehrten Abbau und einer verminderten Expression dieses Transkriptionsfaktors, was gemäß den hier genannten Erkenntnissen wiederum in einer verminderten Expression der PKM resultiert. Dies beeinflusst vor allem Zelllinien, deren Metabolismus besonders stark von der PKM2-Expression abhängt bzw. dieses Enzym besonders stark exprimieren, womit eine negative Korrelation gegeben wäre.

5.2.2.3.2 SN38

Die signifikante negative Korrelation (nach Spearman $r_s = -0,786$, $p = 0,0149$) zwischen der Expressionsrate der PKM2 und den GI₅₀ bei SN38 ist ebenso wie für DCA unerwartet. Erklärungen hierfür könnten die von Spoden et al. (2009) [244] beobachtete kontext-abhängige Funktion oder die von anderen in Kapitel 5.2.2.1 genannten Autoren postulierte fehlende neoplasie-spezifische Bedeutung bzw. sogar antiproliferative Funktion der PKM2 für den Stoffwechsel sein.

5.2.2.3.3 Temozolomid

Der in dieser Arbeit ermittelte positive Korrelationskoeffizient (nach Pearson = 0,81, $p = 0,0096$) zwischen der PKM2-Expressionsrate und den GI_{50} der Zelllinien bei Temozolomid entspricht der Erwartung gemäß der aktuellen Erkenntnisse einer mehrheitlich antiapoptotischen und proliferativen Funktion der PKM2 (vgl. Kap. 2.2.3.2). Die Tatsache, dass der hier genannte Korrelationskoeffizient in Bezug auf Temozolomid gegenüber denen der anderen Substanzen entgegengesetzt ist, ist aufgrund der bereits in Kapitel 5.2.1.3.3 genannten Erkenntnisse nicht überraschend.

5.2.3 Survivin

5.2.3.1 Überblick über den publizierten Wissensstand

In Kapitel 2.2.1 wurde bereits beschrieben, dass Survivin in adulten nicht-neoplastischen Zelllinien nicht oder kaum exprimiert wird, jedoch embryonale und viele neoplastische Zelllinien eine erhöhte Expressionsrate aufweisen. Hierin sowie über die herrschende Meinung einer antiapoptotischen Funktion dieses Genproduktes stimmen die vorhandenen Publikationen weitestgehend überein. Entsprechende Erkenntnisse gibt es bereits ebenfalls umfangreich für pädiatrische Neoplasien: In ihrem Review über die Rolle von Survivin in pädiatrischen Neoplasien berichten Fangusaro et al. (2006) [60] über eine Expression dieses Genproduktes in über 50 % der zahlreichen untersuchten pädiatrischen neoplastischen Zelllinien, während es in den entsprechenden nicht-neoplastischen Zelllinien abwesend war. Auch hier wurden häufig positive Korrelationen mit dem histologischen Grad oder negative Beziehungen mit der Prognose beobachtet [60].

5.2.3.2 Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Datenlage

Der Nachweis einer Survivin-Expression in den in dieser Arbeit getesteten pädiatrischen und adulten neoplastischen Zelllinien und der embryonalen nicht-neoplastischen Zelllinie entspricht den Erwartungen angesichts der aktuellen Datenlage.

Die relative Expression der pädiatrischen Zelllinien weicht zwar nicht stark von der Referenz ab und ist in sieben Zelllinien sogar <1 . Da die Referenz-Zelllinie HEK-293 jedoch als embryonale Zelllinie, analog zu der PKM2, eine erhöhte Survivin-Expressionsrate aufweist (s. Kap. 2.2.1), kann, im Vergleich zu nicht-embryonalen und nicht-neoplastischen pädiatrischen Zelllinien, von einer erhöhten Expression ausgegangen werden. Der Nachweis einer Abwesenheit von Survivin in nicht-neoplastischen pädiatrischen Zelllinien ist bereits ausreichend erfolgt (s. o.).

Auffallend ist die über zehn Mal höhere Expressionsrate von Survivin in den beiden adulten Zelllinien (A549, HTB-56) im Vergleich zu den 18 pädiatrischen neoplastischen Zelllinien (\emptyset

FC_{adult}: 14,86 vs. Ø FC_{pädiatrisch}: 1,34; vgl. Kap. 4.2.3), welche die Vermutung einer gewichtigeren Rolle von Survivin in adulten Neoplasien nahelegt. Eine differenziertere Auseinandersetzung mit dieser Thematik wäre sinnvoll, würde jedoch den Rahmen dieser Arbeit sprengen und sollte daher an anderer Stelle behandelt werden.

5.2.3.3 Korrelationen der Survivin-mRNA-Expressionsrate mit der Sensibilität gegenüber verschiedenen Substanzen

Die acht getesteten Zelllinien weisen mit einem Intervall der relativen Survivin-Expressionsraten von 0,71 (MNNG-HOS) bis 1,57 (CCRF-CEM) kaum unterschiedliche Ergebnisse auf: Die Zelllinie mit der höchsten Expressionsrate weist nicht einmal doppelt so viel mRNA für Survivin auf wie die Zelllinie mit der niedrigsten Expressionsrate (Differenz der FCs: 0,86). Somit stellt diese Zelllinienkonstellation eine schlechte Voraussetzung dar, um Korrelationsanalysen durchzuführen, was auch das Ausbleiben der erwarteten signifikanten Korrelationen in diesem Fall erklären könnte. Eine insgesamt weniger bedeutungsvolle Funktion von Survivin in pädiatrischen Zelllinien käme als Erklärung ebenfalls in Betracht (s. letztes Unterkapitel).

5.2.4 VDAC1

5.2.4.1 Überblick über den publizierten Wissensstand

Wie bereits in Kapitel 2.1.2.1.2 beschrieben, hat der Anionenkanal VDAC1 eine grundlegende Bedeutung für die apoptotische Signalkaskade. Diese Erkenntnisse werden unterstützt durch Beobachtungen, in welchen eine Überexpression von VDAC1 (und dessen damit einhergehende Oligomerisierung mit der Folge eines Cytochrom-c-Effluxes) nicht nur die apoptotische Schwelle reduziert, sondern bereits für sich eine Apoptose induziert. Dementsprechend wurde eine positive Korrelation zwischen der VDAC-Expressionsrate und der Sensibilität verschiedener Zelllinien gegenüber diversen Substanzen beschrieben [49]. Weiterhin konnte durch VDAC1-Silencing, u. a. in NSCLC-Zelllinien, eine Cisplatin-induzierte Apoptose inhibiert und eine Endostatin-induzierte Apoptose vermindert werden, während letztere durch eine VDAC1-Überexpression verstärkt wurde. Insgesamt wird der VDAC1 als ein potentiell bedeutsames „Angriffsziel“ für eine neue Generation von antineoplastischen Pharmaka angesehen [49].

Paradoxerweise exprimieren einige neoplastische Zelllinien erhöhte Level an VDAC1 [49]. Bei Patienten mit NSCLC wurde von Grills et al. (2011) [72] sogar eine negative Korrelation der VDAC1-Expressionsrate mit der Prognose beobachtet.

5.2.4.2 Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Datenlage

Das in dieser Arbeit ermittelte inhomogene Ausmaß der VDAC1-Expression in den verschiedenen untersuchten pädiatrischen Zelllinien mit sowohl erhöhten als auch verminderten

Expressionsraten (vgl. Kap. 4.2.4) ist vergleichbar mit Beobachtungen an adulten neoplastischen Zelllinien (s. o.). Eine grundlegend divergierende Eigenschaft dieses Kanals in pädiatrischen und adulten Neoplasien ist somit unwahrscheinlich.

5.2.4.3 Korrelationen der VDAC1-mRNA-Expressionsrate mit der Sensibilität gegenüber verschiedenen Substanzen

Wie in der Zielsetzung dieser Arbeit formuliert (Kap. 2.5.2), soll hier die von Heshe et al. (2011) [12] aufgestellte These geprüft werden, dass dieser an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierte Kanal für die von ihm beobachteten antagonistischen Effekte der Kombinationen von DCA mit den konventionellen Zytostatika Cisplatin und Doxorubicin, welche mit dieser Membran interagieren, verantwortlich sei. In den Kombinations-Zytotoxizitätstests unserer Arbeit wurden für die Kombination von DCA sowohl mit Cisplatin als auch mit Doxorubicin hingegen die niedrigste Anzahl an Antagonismen gegenüber der Zytostatika-Wirkung im Vergleich mit den anderen – nicht mit der äußeren Mitochondrienmembran interagierenden Substanzen – beobachtet³⁶. Die These von Heshe et al. (2011) [12] wird hierdurch folglich nicht bestätigt. Somit ist die Auswahl dieses Zielgens für die Expressionsanalysen dieser Arbeit retrospektiv nicht relevant. Nichtsdestotrotz zeigen die Korrelationsanalysen neben den Analysen des letzten Kapitels interessante Ergebnisse, wodurch die gewonnenen Erkenntnisse dennoch einen Zugewinn für die Wissenschaft darstellen:

5.2.4.3.1 DCA

Die in dieser Arbeit ermittelte signifikante negative Korrelation zwischen der Expressionsrate von VDAC1 und den relativen Zell-Überleben der Zelllinien nach Inkubation mit DCA (nach Pearson $r = -0,857$; $p = 0,00178$; vgl. Kap. 4.2.5) entspricht den Erwartungen gemäß der genannten Erkenntnislage einer mehrheitlich als proapoptotisch beschriebenen Funktion des VDAC1.

Insbesondere in Bezug auf das mROS-Stimulanz DCA wurde diese Korrelation auch aufgrund folgender spezifischer Funktionen von VDAC(1) postuliert:

- mROS stimulieren die Assemblierung von VDAC-Oligomeren in der äußeren Mitochondrienmembran und ermöglichen so den Efflux von Cytochrom c [52],
- VDAC1 sind permeabel für mROS und führen somit durch eine oxidative Schädigung von Proteinen, Lipiden und DNA im Zytosol bzw. Nukleus zu einer Apoptoseinduktion [49],
- ROS stimulieren die VDAC1-Expression [248], wodurch sich deren proapoptotischen Effekte im Sinne einer positiven Rückkopplung verstärken,

³⁶ Cisplatin: 1, Doxorubicin: 4, Etoposid 19, SN38: 12, Temozolomid: 5, vgl. Kap. 4.1.2

- Die (DCA-vermittelte) Depolarisation der Mitochondrienmembran mit der damit einhergehenden Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit der MPTP (vgl. Kap. 2.4.1) wird durch VDAC vermittelt [2]

Die genannten Erkenntnisse anderer Forschergruppen über die Eigenschaften von VDAC1 in adulten neoplastischen Zelllinien und die gleichsinnigen Ergebnisse dieser Arbeit an pädiatrischen Korrelaten weisen VDAC1 eine potentiell bedeutsame Rolle bei der präklinischen Evaluation und eventuell zukünftig klinischen Indikationsstellung von DCA (auch für das Fachgebiet der Pädiatrie) zu.

5.2.4.3.2 Temozolomid

Die in dieser Arbeit ermittelte positive Korrelation zwischen der Expressionsrate von VDAC1 und den GI_{50} bei den getesteten Zelllinien (nach Pearson $r = 0,905$, $p = 2 \times 10^{-7}$; vgl. Kap. 4.2.4.1) steht den genannten Erwartungen, im Gegensatz zu DCA, entgegen. Dieses Ergebnis reiht sich somit an die Beobachtungen einer negativen Korrelation mit der Prognose in NSCLC von Grills et al (2011) [72] an. Zusammen mit der noch nicht verstandenen Tatsache einer erhöhten Expressionsrate in einigen neoplastischen Zelllinien wird somit die in Kapitel 2.1.2.1.2 genannte Aussage einer komplexen und noch nicht vollends ergründeten Funktion von VDAC1 unterstrichen.

Für eine Erklärung der entgegengesetzten Korrelationskoeffizienten in Bezug auf die Expressionsrate des VDAC1 und den GI_{50} bei Temozolomid gegenüber der entsprechenden Expressionsrate und den relativen Zell-Überleben nach Inkubation mit DCA siehe ebenfalls das Unterkapitel „Temozolomid“ unter der Abhandlung über das Zielgen $Kv1.5$ (Kap. 5.2.1.3.3).

Analog dazu wird auch hier aufgrund der zahlreichen gegensinnigen Beobachtungen verschiedener Forschergruppen, welche ebenfalls hinsichtlich dieser Thematik von einem noch nicht zufriedenstellenden Verständnis über die Funktion dieses Proteins zeugen, zu weiterer Forschung angeregt.

5.2.5 Korrelationen der mRNA-Expression der getesteten Targets untereinander

5.2.5.1 $Kv1.5$ und PKM2

Die negative Korrelation von $Kv1.5$ und PKM2, welche in dieser Arbeit ermittelt wurde³⁷ lässt sich durch die Funktion der Anaplastischen Lymphomkinase (ALK) erklären. Die ALK ist ein Protein aus der Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen, welche unter physiologischen Bedingungen

³⁷ Pearson'sche Korrelation (r) = -0,725, $p = 0,0418$, vgl. Kap.4.2.5

wichtige Funktionen bei der Entwicklung des Nervensystems übernimmt. Sie wird jedoch in vielen Neoplasien als onkogenes Fusionsprotein exprimiert [249]. Für die NPM-ALK, einem Fusionstranskript in anaplastisch-großzelligen Lymphomen, wurde eine direkte Phosphorylierung der PKM2 nachgewiesen, wodurch diese gehemmt wird. Gleichzeitig hemmt die NPM-ALK die Glykogensynthasekinase-3 β (GSK3 β , [250]). In ihrer aktiven Form führt die GSK3 β u. a. zu einer Translokation von Nuclear Factor of Activated T-Cells (NFAT) in den Nukleus. Der NFAT ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von Kv1.5 herunterreguliert. Eine vermindert aktive GSK3 β ergibt somit eine verminderte Translokation von NFAT, wodurch vermehrt Kv1.5 exprimiert werden [251].

Eine vermehrt exprimierte (NPM-)ALK geht folglich mit einer niedrigeren Expression von PKM2 und einer höheren Expression von Kv1.5 einher, während bei Zelllinien, welche eine niedrige Expression der (NPM-)ALK aufweisen, gegensätzliche Expressionsmuster dieser beiden untersuchten Ziel-mRNA zu erwarten sind.

5.2.5.2 Kv1.5 und VDAC1

Der grundlegende Mechanismus für die in dieser Arbeit ermittelte negative Beziehung der mRNA-Expression von Kv1.5 und VDAC1 (s. Kap. 4.2.5) könnte das Onkogen „Akt“ darstellen, welches in vielen neoplastischen Zellen überexprimiert vorliegt [252]. Die Proteinkinasen, welche durch das Gen exprimiert werden, sind an zahlreichen proliferativen und antiapoptotischen Prozessen beteiligt: So führt eine erhöhte Expression von Akt zu einer Hemmung der GSK3 β [253]. Wie im letzten Abschnitt beschrieben, führt eine Hemmung der GSK3 β zu einer verminderten Translokation des NFAT in den Nukleus, wodurch vermehrt Kv1.5 exprimiert werden.

Zusätzlich zum Einfluss auf die Expression von Kv1.5 übt die GSK3 β auch eine Wirkung auf die Aktivität von VDAC aus: In ihrer aktiven Form phosphoryliert diese VDACS an der Mitochondrienmembran, wodurch letztere weniger affin für die Hexokinase II sind. Eine Bindung der Hexokinase II an VDAC führt zu dessen Inaktivierung. Durch eine Akt-abhängige Hemmung der GSK3 β werden folglich weniger VDAC phosphoryliert, welche somit vermehrt durch die Hexokinase II inaktiviert werden [253]. Es muss hier erwähnt werden, dass der letztgenannte Mechanismus lediglich einen Einfluss von Akt auf die Aktivität auf VDAC auf Proteinebene und nicht auf Genregulationsebene darstellt. Durch zahlreiche andere Beispiele aus der Molekularbiologie, bei welchen Enzyme sowohl kurzfristig auf Proteinebene als auch langfristig auf Genebene reguliert werden, ist letzteres aber wahrscheinlich.

5.2.5.3 PKM2 und VDAC1

Die in dieser Arbeit ermittelte positive Korrelation von $r = 0,871$ nach Pearson zwischen der Expression der PKM2 und derjenigen von VDAC1 wird von der "PIPs" (Human Protein-Protein Interaction Prediction), einer Datenbank der University of Dundee, Schottland, bestätigt. Diese gibt mit einem r von $0,85$ ein vom oben genannten Wert nur minimal abweichendes Ergebnis an [254]. Durch die hohe Signifikanz des Ergebnisses dieser Arbeit ($p = 0,00485$) und aufgrund des fast identischen Ergebnisses von mindestens einer anderen unabhängigen Forschergruppe, kann hier von einem äußerst reliablen Ergebnis ausgegangen werden. Auch wenn beide Gene eine bedeutende Rolle für die Apoptose spielen (s. Kap. 2.2), sind in der Literatur keine Beziehungen genannt, welche den hier ermittelten Zusammenhang der beiden Gene erklären.

5.3 Diskussion der Western-Blots

Folgender Abschnitt bezieht sich nur auf die Zielgene, für welche ein Proteinnachweis erfolgreich war (Survivin und VDAC1).

Der Tatsache, dass die Ergebnisse der qRT-PCR dieser Arbeit nicht signifikant mit den jeweilig entsprechenden Ergebnissen der Western-Blots korrelieren, können zwei Ursachen zugrunde liegen: Zum einen kann die posttranslationale Modifikation der mRNA so umfangreich sein, dass sich die Expressionen auf mRNA- und Proteinebene für signifikante Ergebnisse nicht ausreichend decken. Zahlreiche post-translationale Modifikationen sind sowohl für Survivin [255] als auch für VDACs [256] beschrieben.

Zum anderen könnte eine geringe Reliabilität der angewendeten Protein-Expressionsbestimmung bei hoher Varianz der Messergebnisse zu einem zu starken Abweichen von den Ergebnissen der mRNA-Expression geführt haben. Da ein erfolgreicher Nachweis der entsprechenden Proteine jeweils lediglich einmal erfolgte, sind hierzu jedoch keine Aussagen möglich.

Messfehler- oder streuungsbedingt abweichende Proteinexpressionsparameter würden auch das Ausbleiben signifikanter Korrelationen dieser Parameter mit dem Überleben der Zelllinien nach Inkubation mit den verwendeten Substanzen erklären. Eine Bestätigung der Ergebnisse der mRNA-Expression und der darauf beruhenden aufgestellten Thesen dieser Dissertation durch ihnen entsprechende Ergebnisse der Expression auf Proteinebene steht folglich noch aus.

6 Literaturverzeichnis

- [1] W. Hiddermann, H. Huber, and C. Bartram, *Die Onkologie*, 1st ed. Springer, 2004.
- [2] S. S. Bonnet, S. L. Archer, J. Allalunis-Turner, A. Haromy, C. Beaulieu, R. Thompson, C. T. Lee, G. D. Lopaschuk, L. Puttagunta, S. S. S. S. Bonnet, G. Harry, K. Hashimoto, C. J. Porter, M. A. Andrade, B. Thebaud, and E. D. Michelakis, “A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth.,” *Cancer Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 37–51, Jan. 2007.
- [3] Y. Chen, R. Cairns, I. Papandreou, A. Koong, and N. C. Denko, “Oxygen consumption can regulate the growth of tumors, a new perspective on the Warburg effect.,” *PLoS One*, vol. 4, no. 9, p. e7033, Jan. 2009.
- [4] R. C. Sun, M. Fadia, J. E. Dahlstrom, C. R. Parish, P. G. Board, and A. C. Blackburn, “Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo.,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 120, no. 1, pp. 253–60, Feb. 2010.
- [5] M. Sánchez-Aragó, M. Chamorro, and J. M. Cuezva, “Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression.,” *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 4, pp. 567–76, Apr. 2010.
- [6] W. Cao, S. Yacoub, K. T. Shiverick, K. Namiki, Y. Sakai, S. Porvasnik, C. Urbanek, and C. J. Rosser, “Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation.,” *Prostate*, vol. 68, no. 11, pp. 1223–31, Aug. 2008.
- [7] J. Y. Y. Wong, G. S. Huggins, M. Debidia, N. C. Munshi, and I. De Vivo, “Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells.,” *Gynecol. Oncol.*, vol. 109, no. 3, pp. 394–402, Jun. 2008.
- [8] G. M. Saed, N. M. Fletcher, Z. L. Jiang, H. M. Abu-Soud, and M. P. Diamond, “Dichloroacetate induces apoptosis of epithelial ovarian cancer cells through a mechanism involving modulation of oxidative stress.,” *Reprod. Sci.*, vol. 18, no. 12, pp. 1253–61, Dec. 2011.
- [9] E. D. Michelakis, G. Sutendra, P. Dromparis, L. Webster, A. Haromy, E. Niven, C. Maguire, T.-L. Gammer, J. R. Mackey, D. Fulton, B. Abdulkarim, M. S. McMurtry, and K. C. Petruk, “Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate.,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 2, no. 31, p. 31ra34, May 2010.
- [10] E. M. Dunbar, B. S. Coats, a L. Shroads, T. Langae, a Lew, J. R. Forder, J. J. Shuster, D. a Wagner, and P. W. Stacpoole, “Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors.,” *Invest. New Drugs*, Dec. 2013.
- [11] S. B. Strum, O. Adalsteinsson, R. R. Black, D. Segal, N. L. Peress, and J. Waldenfels, “Case report: Sodium dichloroacetate (DCA) inhibition of the ‘Warburg Effect’ in a human cancer patient: complete response in non-Hodgkin’s lymphoma after disease progression with rituximab-CHOP.,” *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 45, no. 3, pp. 307–15, Jun. 2013.
- [12] D. Heshe, S. Hoogestraat, C. Brauckmann, U. Karst, J. Boos, and C. Lanvers-Kaminsky, “Dichloroacetate metabolically targeted therapy defeats cytotoxicity of standard anticancer drugs.,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 67, no. 3, pp. 647–55, Mar. 2011.
- [13] L. H. Stockwin, S. X. Yu, S. Borgel, C. Hancock, T. L. Wolfe, L. R. Phillips, M. G. Hollingshead, and D. L. Newton, “Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC.,” *Int. J. Cancer*, vol. 127, no. 11, pp. 2510–9, Dec. 2010.
- [14] H. Pearson, “Cancer patients opt for unapproved drug.,” *Nature*, vol. 446, no. 7135, pp. 474–5, Mar. 2007.
- [15] J. Rasso, R. Deutzmann, R. Netzker, and K. Hauser, *Biochemie*, 2nd ed. Thieme, 2008.
- [16] R. J. Gillies and R. A. Gatenby, “Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis?,” *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 39, no. 3, pp. 251–7, Jun.

- 2007.
- [17] M. M. Bowker-Kinley, W. I. Davis, P. Wu, R. A. Harris, and K. M. Popov, "Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex.," *Biochem. J.*, vol. 329 (Pt 1, pp. 191–6, Jan. 1998.
 - [18] P. P. Hsu and D. M. Sabatini, "Cancer cell metabolism: Warburg and beyond.," *Cell*, vol. 134, no. 5, pp. 703–7, Sep. 2008.
 - [19] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation.," *Science*, vol. 324, no. 5930, pp. 1029–33, May 2009.
 - [20] A. Gewies, "Introduction to Apoptosis," *ApoReview*. pp. 1–26, 2003.
 - [21] R. S. Y. Wong, "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment.," *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 30, no. 1, p. 87, Jan. 2011.
 - [22] J. H. Naismith and S. R. Sprang, "Modularity in the TNF-receptor family.," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 23, no. 2, pp. 74–9, Feb. 1998.
 - [23] J.-B. Denault and G. S. Salvesen, "Caspases: keys in the ignition of cell death.," *Chem. Rev.*, vol. 102, no. 12, pp. 4489–500, Dec. 2002.
 - [24] A. D. Chacko, F. Liberante, I. Paul, D. B. Longley, and D. A. Fennell, "Voltage dependent anion channel-1 regulates death receptor mediated apoptosis by enabling cleavage of caspase-8.," *BMC Cancer*, vol. 10, p. 380, Jan. 2010.
 - [25] X. Luo, I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang, "Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors," *Cell*, vol. 94, no. 4, pp. 481–490, Aug. 1998.
 - [26] D. Acehan, X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang, and C. W. Akey, "Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation.," *Mol. Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 423–32, Feb. 2002.
 - [27] E. A. Slee, M. T. Harte, R. M. Kluck, B. B. Wolf, C. A. Casiano, D. D. Newmeyer, H. G. Wang, J. C. Reed, D. W. Nicholson, E. S. Alnemri, D. R. Green, and S. J. Martin, "Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner.," *J. Cell Biol.*, vol. 144, no. 2, pp. 281–92, Jan. 1999.
 - [28] X. Wang, "The expanding role of mitochondria in apoptosis.," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 22, pp. 2922–33, Nov. 2001.
 - [29] L. Jiang, J. H. Hickman, S.-J. Wang, and W. Gu, "Dynamic roles of p53-mediated metabolic activities in ROS-induced stress responses," *Cell Cycle*, pp. 00–00, Jul. 2015.
 - [30] S. W. Ryter and R. M. Tyrrell, "Singlet Molecular Oxygen (1O2): A Possible Effector of Eukaryotic Gene Expression," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 24, no. 9, pp. 1520–1534, Jun. 1998.
 - [31] T. Yamamori, H. Yasui, M. Yamazumi, Y. Wada, Y. Nakamura, H. Nakamura, and O. Inanami, "Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 53, no. 2, pp. 260–70, Jul. 2012.
 - [32] S. Elmore, "Apoptosis: a review of programmed cell death.," *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, Jun. 2007.
 - [33] M. Loeffler and G. Kroemer, "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita.," *Exp. Cell Res.*, vol. 256, no. 1, pp. 19–26, Apr. 2000.
 - [34] P. Bernardi, L. Scorrano, R. Colonna, V. Petronilli, and F. Di Lisa, "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 264, no. 3, pp. 687–701, Sep. 1999.
 - [35] S. A. Susin, H. K. Lorenzo, N. Zamzami, I. Marzo, B. E. Snow, G. M. Brothers, J. Mangion, E. Jacotot, P. Costantini, M. Loeffler, N. Larochette, D. R. Goodlett, R. Aebersold, D. P. Siderovski, J. M. Penninger, and G. Kroemer, "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.," *Nature*, vol. 397, no. 6718,

- pp. 441–6, Feb. 1999.
- [36] L. Y. Li, X. Luo, and X. Wang, “Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria,” *Nature*, vol. 412, no. 6842, pp. 95–9, Jul. 2001.
- [37] A. M. Verhagen, P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson, and D. L. Vaux, “Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins,” *Cell*, vol. 102, no. 1, pp. 43–53, Jul. 2000.
- [38] A. Verhagen, R. J. Simpson, A. Tikoo, R. L. Moritz, C. L. Day, L. M. Connolly, H. Kaufmann, M. Pakusch, P. G. Ekert, J. H. Silke, D. Vaux, C. Wrobel, R. Burke, and S. of M. Sciences., “HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins,” Jan. 2002.
- [39] G. Kroemer, N. Zamzami, and S. A. Susin, “Mitochondrial control of apoptosis,” *Immunol. Today*, vol. 18, no. 1, pp. 44–51, Jan. 1997.
- [40] G. Kroemer and J. C. Reed, “Mitochondrial control of cell death,” *Nat. Med.*, vol. 6, no. 5, pp. 513–9, May 2000.
- [41] P. Marchetti, D. Decaudin, A. Macho, N. Zamzami, T. Hirsch, S. A. Susin, and G. Kroemer, “Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 27, no. 1, pp. 289–96, Jan. 1997.
- [42] D. Caouette, C. Dongmo, J. Bérubé, D. Fournier, and P. Daleau, “Hydrogen peroxide modulates the Kv1.5 channel expressed in a mammalian cell line,” *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, vol. 368, no. 6, pp. 479–86, Dec. 2003.
- [43] S. P. Yu, C. H. Yeh, S. L. Sensi, B. J. Gwag, L. M. Canzoniero, Z. S. Farhangrazi, H. S. Ying, M. Tian, L. L. Dugan, and D. W. Choi, “Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current,” *Science*, vol. 278, no. 5335, pp. 114–7, Oct. 1997.
- [44] H. Wang, Y. Zhang, L. Cao, H. Han, J. Wang, B. Yang, S. Nattel, and Z. Wang, “HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation,” *Cancer Res.*, vol. 62, no. 17, pp. 4843–8, Sep. 2002.
- [45] B. Andersson, V. Janson, P. Behnam-Motlagh, R. Henriksson, and K. Grankvist, “Induction of apoptosis by intracellular potassium ion depletion: using the fluorescent dye PBFI in a 96-well plate method in cultured lung cancer cells,” *Toxicol. In Vitro*, vol. 20, no. 6, pp. 986–94, Sep. 2006.
- [46] C. V Remillard and J. X.-J. Yuan, “Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death,” *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 286, no. 1, pp. L49–67, Jan. 2004.
- [47] K. S. McCommis and C. P. Baines, “The role of VDAC in cell death: friend or foe?,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1818, no. 6, pp. 1444–50, Jun. 2012.
- [48] V. Shoshan-Barmatz and M. Golan, “Mitochondrial VDAC1: function in cell life and death and a target for cancer therapy,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 19, no. 5, pp. 714–35, Jan. 2012.
- [49] V. Shoshan-Barmatz and D. Mizrahi, “VDAC1: from structure to cancer therapy,” *Front. Oncol.*, vol. 2, no. November, p. 164, Jan. 2012.
- [50] S. Shimizu, T. Ide, T. Yanagida, and Y. Tsujimoto, “Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 16, pp. 12321–5, Apr. 2000.
- [51] N. Keinan, D. Tyomkin, and V. Shoshan-Barmatz, “Oligomerization of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel is coupled to the induction of apoptosis,” *Mol Cell Biol*, vol. 30, no. 24, pp. 5698–5709, Dec. 2010.
- [52] M. Madesh and G. Hajnóczky, “VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release,” *J. Cell Biol.*, vol. 155, no. 6, pp. 1003–15, Dec. 2001.
- [53] N. Arbel, D. Ben-Hail, and V. Shoshan-Barmatz, “Mediation of the antiapoptotic activity of Bcl-xL protein upon interaction with VDAC1 protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 27, pp. 23152–61, Jun. 2012.

- [54] W. Tan, "VDAC blockage by phosphorothioate oligonucleotides and its implication in apoptosis.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1818, no. 6, pp. 1555–61, Jun. 2012.
- [55] V. Haridas, X. Li, T. Mizumachi, M. Higuchi, V. V Lemeshko, M. Colombini, and J. U. Gutterman, "Avicins, a novel plant-derived metabolite lowers energy metabolism in tumor cells by targeting the outer mitochondrial membrane.," *Mitochondrion*, vol. 7, no. 3, pp. 234–40, May 2007.
- [56] L.-P. Erwig and P. M. Henson, "Clearance of apoptotic cells by phagocytes.," *Cell Death Differ.*, vol. 15, no. 2, pp. 243–50, Feb. 2008.
- [57] J. C. Ameisen, "On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years.," *Cell Death Differ.*, vol. 9, no. 4, pp. 367–93, Apr. 2002.
- [58] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, "Cell Death and Its Regulation." W. H. Freeman, 2000.
- [59] C. H. A. Cheung, C.-C. Huang, F.-Y. Tsai, J. Y.-C. Lee, S. M. Cheng, Y.-C. Chang, Y.-C. Huang, S.-H. Chen, and J.-Y. Chang, "Survivin - biology and potential as a therapeutic target in oncology.," *Oncol. Targets. Ther.*, vol. 6, pp. 1453–1462, Jan. 2013.
- [60] J. R. Fangusaro, H. Caldas, Y. Jiang, and R. A. Altura, "Survivin: an inhibitor of apoptosis in pediatric cancer.," *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 47, no. 1, pp. 4–13, Jul. 2006.
- [61] H. Marusawa, S.-I. Matsuzawa, K. Welsh, H. Zou, R. Armstrong, I. Tamm, and J. C. Reed, "HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression.," *EMBO J*, vol. 22, no. 11, pp. 2729–2740, Jun. 2003.
- [62] N. Takai, T. Miyazaki, M. Nishida, K. Nasu, and I. Miyakawa, "Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma.," *Cancer Lett*, vol. 184, no. 1, pp. 105–116, 2002.
- [63] H. Kawasaki, M. Toyoda, H. Shinohara, J. Okuda, I. Watanabe, T. Yamamoto, K. Tanaka, T. Tenjo, and N. Tanigawa, "Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis.," *Cancer*, vol. 91, no. 11, pp. 2026–2032, Jun. 2001.
- [64] W. Wang, Y.-F. He, Q.-K. Sun, Y. Wang, X.-H. Han, D.-F. Peng, Y.-W. Yao, C.-S. Ji, and B. Hu, "Hypoxia-inducible factor 1 α in breast cancer prognosis.," *Clin. Chim. Acta.*, Oct. 2013.
- [65] S.-S. Zheng, X.-H. Chen, X. Yin, and B.-H. Zhang, "Prognostic significance of HIF-1 α expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis.," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e65753, Jan. 2013.
- [66] J. A. Forsythe, B. H. Jiang, N. V Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos, and G. L. Semenza, "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 16, no. 9, pp. 4604–13, Sep. 1996.
- [67] E. Karshovska, A. Zerneck, G. Sevilimis, A. Millet, M. Hristov, C. D. Cohen, H. Schmid, F. Krotz, H.-Y. Sohn, V. Klauss, C. Weber, and A. Schober, "Expression of HIF-1 α in injured arteries controls SDF-1 α mediated neointima formation in apolipoprotein E deficient mice.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no. 12, pp. 2540–7, Dec. 2007.
- [68] N. C. Denko, "Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, no. 9, pp. 705–13, Sep. 2008.
- [69] S. Biswas, N. Tapryal, R. Mukherjee, R. Kumar, and C. K. Mukhopadhyay, "Insulin promotes iron uptake in human hepatic cell by regulating transferrin receptor-1 transcription mediated by hypoxia inducible factor-1.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1832, no. 2, pp. 293–301, Feb. 2013.
- [70] G. L. Semenza, "Regulation of erythropoietin production. New insights into molecular mechanisms of oxygen homeostasis.," *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, vol. 8, no. 5, pp. 863–84, Oct. 1994.
- [71] J. Kim, I. Tchernyshyov, G. L. Semenza, and C. V Dang, "HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia.," *Cell Metab.*, vol. 3, no. 3, pp. 177–85, Mar. 2006.
- [72] C. Grills, P. V Jithesh, J. Blayney, S.-D. Zhang, and D. A. Fennell, "Gene expression meta-

- analysis identifies VDAC1 as a predictor of poor outcome in early stage non-small cell lung cancer.,” *PLoS One*, vol. 6, no. 1, p. e14635, Jan. 2011.
- [73] K. Preussat, C. Beetz, M. Schrey, R. Kraft, S. Wölfl, R. Kalff, and S. Patt, “Expression of voltage-gated potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human gliomas.,” *Neurosci. Lett.*, vol. 346, no. 1–2, pp. 33–6, Jul. 2003.
- [74] N. Comes, J. Bielanska, A. Vallejo-Gracia, A. Serrano-albarrás, L. Marruecos, D. Gómez, C. Soler, E. Condom, S. Ramón Y Cajal, J. Hernández-Losa, J. C. Ferreres, A. Felipe, and S. Ramón, “The voltage-dependent K(+) channels Kv1.3 and Kv1.5 in human cancer.,” *Front. Physiol.*, vol. 4, no. October, p. 283, Jan. 2013.
- [75] S. S. Gambhir, J. Czernin, J. Schwimmer, D. H. Silverman, R. E. Coleman, and M. E. Phelps, “A tabulated summary of the FDG PET literature.,” *J. Nucl. Med.*, vol. 42, no. 5 Suppl, p. 1S–93S, May 2001.
- [76] G. J. Kelloff, J. M. Hoffman, B. Johnson, H. I. Scher, B. A. Siegel, E. Y. Cheng, B. D. Cheson, J. O’shaughnessy, K. Z. Guyton, D. A. Mankoff, L. Shankar, S. M. Larson, C. C. Sigman, R. L. Schilsky, and D. C. Sullivan, “Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development.,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 8, pp. 2785–808, Apr. 2005.
- [77] D. M. Brizel, T. Schroeder, R. L. Scher, S. Walenta, R. W. Clough, M. W. Dewhirst, and W. Mueller-Klieser, “Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer.,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 51, no. 2, pp. 349–53, Oct. 2001.
- [78] S. Walenta, M. Wetterling, M. Lehrke, G. Schwickert, K. Sundfjør, E. K. Rofstad, and W. Mueller-Klieser, “High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers.,” *Cancer Res.*, vol. 60, no. 4, pp. 916–21, Mar. 2000.
- [79] L. B. Chen, “Mitochondrial membrane potential in living cells.,” *Annu. Rev. Cell Biol.*, vol. 4, pp. 155–81, Jan. 1988.
- [80] P. Bernardi, “The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death.,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1275, no. 1–2, pp. 5–9, Jul. 1996.
- [81] N. Zamzami and G. Kroemer, “The mitochondrion in apoptosis: how Pandora’s box opens.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 2, no. 1, pp. 67–71, Jan. 2001.
- [82] D. Hernández-García, C. D. Wood, S. Castro-Obregón, and L. Covarrubias, “Reactive oxygen species: A radical role in development?,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 49, no. 2, pp. 130–43, Jul. 2010.
- [83] J. G. Pastorino and J. B. Hoek, “Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis.,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 10, no. 16, pp. 1535–51, Aug. 2003.
- [84] J.-W. Kim and C. V Dang, “Multifaceted roles of glycolytic enzymes.,” *Trends Biochem Sci*, vol. 30, no. 3, pp. 142–150, Mar. 2005.
- [85] R. a Gatenby and R. J. Gillies, “Why do cancers have high aerobic glycolysis?,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 11, pp. 891–9, Nov. 2004.
- [86] R. Martínez-Zaguilan, R. M. Lynch, G. M. Martínez, and R. J. Gillies, “Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells.,” *Am. J. Physiol.*, vol. 265, no. 4 Pt 1, pp. C1015-29, Oct. 1993.
- [87] L. A. McLean, J. Roscoe, N. K. Jorgensen, F. A. Gorin, and P. M. Cala, “Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes.,” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 278, no. 4, pp. C676-88, Apr. 2000.
- [88] S. S. Ober and A. B. Pardee, “Intracellular pH is increased after transformation of Chinese hamster embryo fibroblasts.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 9, pp. 2766–70, May 1987.
- [89] R. J. Deberardinis, N. Sayed, D. Ditsworth, and C. B. Thompson, “Brick by brick: metabolism and tumor cell growth.,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 18, no. 1, pp. 54–61, Feb. 2008.

- [90] S. Langbein, M. Zerilli, A. Zur Hausen, W. Staiger, K. Rensch-Boschert, N. Lukan, J. Popa, M. P. Ternullo, A. Steidler, C. Weiss, R. Grobholz, F. Willeke, P. Alken, G. Stassi, P. Schubert, and J. F. Coy, "Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted.," *Br. J. Cancer*, vol. 94, no. 4, pp. 578–85, Feb. 2006.
- [91] N. Serkova and L. G. Boros, "Detection of resistance to imatinib by metabolic profiling: clinical and drug development implications.," *Am. J. Pharmacogenomics*, vol. 5, no. 5, pp. 293–302, Jan. 2005.
- [92] E. Corcoran, J. J. Phelan, and P. F. Fottrell, "Purification and properties of pyruvate kinase from human lung.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 446, no. 1, pp. 96–104, Sep. 1976.
- [93] S. W. Tolle, R. D. Dyson, R. W. Newburgh, and J. M. Cardenas, "Pyruvate kinase isozymes in neurons, glia, neuroblastoma, and glioblastoma.," *J. Neurochem.*, vol. 27, no. 6, pp. 1355–60, Dec. 1976.
- [94] M. Reinacher and E. Eigenbrodt, "Immunohistological demonstration of the same type of pyruvate kinase isoenzyme (M2-Pk) in tumors of chicken and rat.," *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, vol. 37, no. 1, pp. 79–88, Jan. 1981.
- [95] B. Schering, E. Eigenbrodt, D. Linder, and W. Schoner, "Purification and properties of pyruvate kinase type M2 from rat lung.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 717, no. 2, pp. 337–47, Aug. 1982.
- [96] M. J. MacDonald and C. M. Chang, "Pancreatic islets contain the M2 isoenzyme of pyruvate kinase. Its phosphorylation has no effect on enzyme activity.," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 68, no. 2, pp. 115–20, Oct. 1985.
- [97] U. Brinck, E. Eigenbrodt, M. Oehmke, S. Mazurek, and G. Fischer, "L- and M2-pyruvate kinase expression in renal cell carcinomas and their metastases.," *Virchows Arch.*, vol. 424, no. 2, pp. 177–85, Jan. 1994.
- [98] Z. Li, P. Yang, and Z. Li, "The multifaceted regulation and functions of PKM2 in tumor progression.," *Biochim. Biophys. Acta*, Jul. 2014.
- [99] S. Mazurek, C. B. Boschek, F. Hugo, and E. Eigenbrodt, "Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading.," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 15, no. 4, pp. 300–8, Aug. 2005.
- [100] O. Warburg, "On the origin of cancer cells.," *Science*, vol. 123, no. 3191, pp. 309–14, Mar. 1956.
- [101] E. Eigenbrodt, M. Reinacher, U. Scheefers-Borchel, H. Scheefers, and R. Friis, "Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells.," *Crit. Rev. Oncog.*, vol. 3, no. 1–2, pp. 91–115, Jan. 1992.
- [102] S. Mazurek, C. B. Boschek, and E. Eigenbrodt, "The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy.," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 29, no. 4, pp. 315–30, Aug. 1997.
- [103] C.-F. Zhou, X.-B. Li, H. Sun, B. Zhang, Y.-S. Han, Y. Jiang, Q.-L. Zhuang, J. Fang, and G.-H. Wu, "Pyruvate kinase type M2 is upregulated in colorectal cancer and promotes proliferation and migration of colon cancer cells.," *IUBMB Life*, vol. 64, no. 9, pp. 775–82, Sep. 2012.
- [104] L.-Y. Wang, Y.-P. Liu, L.-G. Chen, Y.-L. Chen, L. Tan, J.-J. Liu, A. Jazag, J.-L. Ren, and B. Guleng, "Pyruvate kinase M2 plays a dual role on regulation of the EGF/EGFR signaling via E-cadherin-dependent manner in gastric cancer cells.," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e67542, Jan. 2013.
- [105] D. K. Dhar, S. W. M. Olde Damink, J. H. Brindley, A. Godfrey, M. H. Chapman, N. S. Sandanayake, F. Andreola, S. Mazurek, T. Hasan, M. Malago, and S. P. Pereira, "Pyruvate kinase M2 is a novel diagnostic marker and predicts tumor progression in human biliary tract cancer.," *Cancer*, vol. 119, no. 3, pp. 575–85, Feb. 2013.
- [106] O.-H. Kwon, T.-W. Kang, J.-H. Kim, M. Kim, S.-M. Noh, K.-S. Song, H.-S. Yoo, W.-H. Kim, Z. Xie, D. Pocalyko, S.-Y. Kim, and Y. S. Kim, "Pyruvate kinase M2 promotes the growth of gastric cancer cells via regulation of Bcl-xL expression at transcriptional level.,"

- Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 423, no. 1, pp. 38–44, Jun. 2012.
- [107] P. Steinberg, A. Klingelhöffer, A. Schäfer, G. Wüst, G. Weisse, F. Oesch, and E. Eigenbrodt, “Expression of pyruvate kinase M2 in preneoplastic hepatic foci of N-nitrosomorpholine-treated rats.,” *Virchows Arch.*, vol. 434, no. 3, pp. 213–20, Mar. 1999.
- [108] J. Schneider, K. Neu, H. Grimm, H.-G. Velcovsky, G. Weisse, and E. Eigenbrodt, “Tumor M2-pyruvate kinase in lung cancer patients: immunohistochemical detection and disease monitoring.,” *Anticancer Res.*, vol. 22, no. 1A, pp. 311–8, 2002.
- [109] P. Kaatsch and C. Spix, “German Childhood Cancer Registry - Report 1997,” Mainz, 1997.
- [110] P. Kaatsch and C. Spix, “German Childhood Cancer Registry - Report 2012,” Mainz, 2013.
- [111] Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., “Krebs in Deutschland 2007/2008,” Berlin, 2012.
- [112] E. Groninger, J. H. Proost, and S. S. N. de Graaf, “Pharmacokinetic studies in children with cancer.,” *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 52, no. 3, pp. 173–97, Dec. 2004.
- [113] F. X. Coude, J. M. Saudubray, F. DeMaugre, C. Marsac, J. P. Leroux, and C. Charpentier, “Dichloroacetate as treatment for congenital lactic acidosis.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 299, no. 24, pp. 1365–6, Dec. 1978.
- [114] P. W. Stacpoole, E. M. Harman, S. H. Curry, T. G. Baumgartner, and R. I. Misbin, “Treatment of lactic acidosis.,” *N. Engl. J. Med.*, pp. 320–321, 1984.
- [115] P. W. Stacpoole, E. C. Wright, T. G. Baumgartner, R. M. Bersin, S. Buchalter, S. H. Curry, C. A. Duncan, E. M. Harman, G. N. Henderson, and S. Jenkinson, “A controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of lactic acidosis in adults. The Dichloroacetate-Lactic Acidosis Study Group.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 327, no. 22, pp. 1564–9, Nov. 1992.
- [116] T. Agbenyega, T. Planche, G. Bedu-Addo, D. Ansong, A. Owusu-Ofori, V. A. Bhattaram, N. V. Nagaraja, A. L. Shroads, G. N. Henderson, A. D. Hutson, H. Derendorf, S. Krishna, and P. W. Stacpoole, “Population kinetics, efficacy, and safety of dichloroacetate for lactic acidosis due to severe malaria in children.,” *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 43, no. 4, pp. 386–96, Apr. 2003.
- [117] P. W. Stacpoole, C. L. Barnes, M. D. Hurbanis, S. L. Cannon, and D. S. Kerr, “Treatment of congenital lactic acidosis with dichloroacetate.,” *Arch. Dis. Child.*, vol. 77, no. 6, pp. 535–41, Dec. 1997.
- [118] P. W. Stacpoole, D. S. Kerr, C. Barnes, S. T. Bunch, P. R. Carney, E. M. Fennell, N. M. Felitsyn, R. L. Gilmore, M. Greer, G. N. Henderson, A. D. Hutson, R. E. Neiberger, R. G. O’Brien, L. A. Perkins, R. G. Quisling, A. L. Shroads, J. J. Shuster, J. H. Silverstein, D. W. Theriaque, and E. Valenstein, “Controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children.,” *Pediatrics*, vol. 117, no. 5, pp. 1519–31, May 2006.
- [119] P. Kaufmann, K. Engelstad, Y. Wei, S. Jhung, M. C. Sano, D. C. Shungu, W. S. Millar, X. Hong, C. L. Gooch, X. Mao, J. M. Pascual, M. Hirano, P. W. Stacpoole, S. DiMauro, and D. C. De Vivo, “Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial.,” *Neurology*, vol. 66, no. 3, pp. 324–30, Feb. 2006.
- [120] G. E. Duncan, L. A. Perkins, D. W. Theriaque, R. E. Neiberger, and P. W. Stacpoole, “Dichloroacetate therapy attenuates the blood lactate response to submaximal exercise in patients with defects in mitochondrial energy metabolism.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 89, no. 4, pp. 1733–8, Apr. 2004.
- [121] B. A. Barshop, R. K. Naviaux, K. A. McGowan, F. Levine, W. L. Nyhan, A. Loupis-Geller, and R. H. Haas, “Chronic treatment of mitochondrial disease patients with dichloroacetate.,” *Mol. Genet. Metab.*, vol. 83, no. 1–2, pp. 138–49, 2004.
- [122] K. Berendzen, D. W. Theriaque, J. Shuster, and P. W. Stacpoole, “Therapeutic potential of dichloroacetate for pyruvate dehydrogenase complex deficiency.,” *Mitochondrion*, vol. 6, no. 3, pp. 126–35, Jun. 2006.
- [123] P. W. Stacpoole, L. R. Gilbert, R. E. Neiberger, P. R. Carney, E. Valenstein, D. W. Theriaque, and J. J. Shuster, “Evaluation of long-term treatment of children with congenital lactic acidosis with dichloroacetate.,” *Pediatrics*, vol. 121, no. 5, pp. e1223–8,

- May 2008.
- [124] P. W. Stacpoole, "The pharmacology of dichloroacetate.," *Metabolism.*, vol. 38, no. 11, pp. 1124–44, Nov. 1989.
- [125] Y. Kushnareva, A. N. Murphy, and A. Andreyev, "Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state.," *Biochem. J.*, vol. 368, no. Pt 2, pp. 545–53, Dec. 2002.
- [126] G. Sutendra, P. Dromparis, a Kinnaird, T. H. Stenson, a Haromy, J. M. R. Parker, M. S. McMurtry, and E. D. Michelakis, "Mitochondrial activation by inhibition of PDKII suppresses HIF1a signaling and angiogenesis in cancer.," *Oncogene*, vol. 32, no. 13, pp. 1638–50, Mar. 2013.
- [127] A. Kumar, S. Kant, and S. M. Singh, "Novel molecular mechanisms of antitumor action of dichloroacetate against T cell lymphoma: Implication of altered glucose metabolism, pH homeostasis and cell survival regulation.," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 199, no. 1, pp. 29–37, Jul. 2012.
- [128] T. Contractor and C. R. Harris, "p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2.," *Cancer Res.*, vol. 72, no. 2, pp. 560–7, Jan. 2012.
- [129] E. D. MacKenzie, M. A. Selak, D. A. Tennant, L. J. Payne, S. Crosby, C. M. Frederiksen, D. G. Watson, and E. Gottlieb, "Cell-Permeating α -Ketoglutarate Derivatives Alleviate Pseudohypoxia in Succinate Dehydrogenase-Deficient Cells," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 9, pp. 3282–3289, Feb. 2007.
- [130] M. Kaluzová, S. Kaluz, M. I. Lerman, and E. J. Stanbridge, "DNA damage is a prerequisite for p53-mediated proteasomal degradation of HIF-1 α in hypoxic cells and downregulation of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 13, pp. 5757–66, Jul. 2004.
- [131] T. Schmid, J. Zhou, R. Köhl, and B. Brüne, "p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1).," *Biochem. J.*, vol. 380, no. Pt 1, pp. 289–95, May 2004.
- [132] E. D. Michelakis, L. Webster, and J. R. Mackey, "Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer.," *Br. J. Cancer*, vol. 99, no. 7, pp. 989–94, Oct. 2008.
- [133] P. W. Stacpoole, T. L. Kurtz, Z. Han, and T. Langae, "Role of dichloroacetate in the treatment of genetic mitochondrial diseases.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 13–14, pp. 1478–87, 2008.
- [134] A. L. Shroads, X. Guo, V. Dixit, H.-P. Liu, M. O. James, and P. W. Stacpoole, "Age-dependent kinetics and metabolism of dichloroacetate: possible relevance to toxicity.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 324, no. 3, pp. 1163–71, Mar. 2008.
- [135] G. Sutendra and E. D. Michelakis, "Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology," vol. 3, no. March, pp. 1–11, 2013.
- [136] K. Kodama, O. Doi, M. Higashiyama, Y. Mori, T. Horai, R. Tateishi, Y. Aoki, and S. Misawa, "Establishment and characterization of a new Ewing's sarcoma cell line.," *Cancer Genet Cytogenet*, vol. 57, no. 1, pp. 19–30, 1991.
- [137] K. Kodama, O. Doi, M. Higashiyama, H. Yokouchi, R. Tateishi, and Y. Mori, "Differentiation of a Ewing's sarcoma cell line towards neural and mesenchymal cell lineages.," *Jpn J Cancer Res*, vol. 85, no. 4, pp. 335–338, Apr. 1994.
- [138] L. Ottaviano, K.-L. Schaefer, M. Gajewski, W. Huckenbeck, S. Baldus, U. Rogel, C. Mackintosh, E. de Alava, O. Myklebost, S. H. Kresse, L. A. Meza-Zepeda, M. Serra, A.-M. Cleton-Jansen, P. C. W. Hogendoorn, H. Buerger, T. Aigner, H. E. Gabbert, and C. Poremba, "Molecular characterization of commonly used cell lines for bone tumor research: a trans-European EuroBoNet effort.," *Genes Chromosom. Cancer*, vol. 49, no. 1, pp. 40–51, Jan. 2010.
- [139] I. M. Ambros, P. F. Ambros, S. Strehl, H. Kovar, H. Gardner, and M. Salzer-Kuntschik, "MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive

- neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration.,” *Cancer*, vol. 67, no. 7, pp. 1886–1893, Apr. 1991.
- [140] F. van Valen, W. Winkelmann, and H. Jürgens, “Type I and type II insulin-like growth factor receptors and their function in human Ewing’s sarcoma cells.,” *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 118, no. 4, pp. 269–275, 1992.
- [141] R. E. McCarthy, V. Junius, S. Farber, H. Lazarus, and G. E. Foley, “Cytogenetic analysis of human lymphoblasts in continuous culture.,” *Exp Cell Res*, vol. 40, no. 1, pp. 197–200, 1965.
- [142] C. Cinti, P. P. Claudio, A. D. Luca, M. Cuccurese, C. M. Howard, M. D’Esposito, M. G. Paggi, D. L. Sala, L. Azzoni, T. D. Halazonetis, A. Giordano, and N. M. Maraldi, “A serine 37 mutation associated with two missense mutations at highly conserved regions of p53 affect pro-apoptotic genes expression in a T-lymphoblastoid drug resistant cell line.,” *Oncogene*, vol. 19, no. 44, pp. 5098–5105, 2000.
- [143] G. E. Foley, H. Lazarus, S. Farber, B. G. Uzman, B. A. Boone, and R. E. McCarthy, “Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of a Child with Acute Leukemia,” *Cancer*, vol. 18, pp. 522–529, Apr. 1965.
- [144] D. R. Aldridge and I. R. Radford, “Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines.,” *Cancer Res*, vol. 58, no. 13, pp. 2817–2824, Jul. 1998.
- [145] R. Gallagher, S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, G. Aulakh, R. Ting, F. Ruscetti, and R. Gallo, “Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia.,” *Blood*, vol. 54, no. 3, pp. 713–733, Oct. 1979.
- [146] S. J. Collins, R. C. Gallo, and R. E. Gallagher, “Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture.,” *Nature*, vol. 270, no. 5635, pp. 347–349, 1977.
- [147] S. J. Collins, “The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression.,” *Blood*, vol. 70, no. 5, pp. 1233–1244, 1987.
- [148] D. Wolf and V. Rotter, “Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells.,” *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 82, no. 3, pp. 790–794, Feb. 1985.
- [149] J. Minowada, T. Onuma, and G. E. Moore, “Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes.,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 49, no. 3, pp. 891–895, Oct. 1972.
- [150] V. T. Chow, H. H. Quek, and E. P. Tock, “Alternative splicing of the p53 tumor suppressor gene in the Molt-4 T-lymphoblastic leukemia cell line.,” *Cancer Lett*, vol. 73, no. 2–3, pp. 141–148, Oct. 1993.
- [151] C. Rosenfeld, A. Goutner, C. Choquet, A. M. Venuat, B. Kayibanda, J. L. Pico, and M. F. Greaves, “Phenotypic characterisation of a unique non-T, non-B acute lymphoblastic leukaemia cell line.,” *Nature*, vol. 267, no. 5614, pp. 841–843, Jun. 1977.
- [152] X. M. He, L. E. Ostrowski, M. A. von Wronski, H. S. Friedman, C. J. Wikstrand, S. H. Bigner, A. Rasheed, S. K. Batra, S. Mitra, and T. P. Brent, “Expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in six human medulloblastoma cell lines.,” *Cancer Res*, vol. 52, no. 5, pp. 1144–1148, Mar. 1992.
- [153] C. Portwine, S. Chilton-MacNeill, C. Brown, E. Sexsmith, J. McLaughlin, and D. Malkin, “Absence of germline and somatic p53 alterations in children with sporadic brain tumors.,” *J Neurooncol*, vol. 52, no. 3, pp. 227–235, May 2001.
- [154] C. Raffel, G. A. Thomas, D. M. Tishler, S. Lassofoff, and J. C. Allen, “Absence of p53 mutations in childhood central nervous system primitive neuroectodermal tumors.,” *Neurosurgery*, vol. 33, no. 2, p. 301, Aug. 1993.
- [155] G. E. Keles, M. S. Berger, J. Srinivasan, D. D. Kolstoe, M. S. Bobola, and J. R. Silber, “Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines.,” *Oncol Res*, vol. 7, no. 10–11, pp. 493–503, 1995.

- [156] K. S. Kovacina and R. A. Roth, "Characterization of the endogenous insulin receptor-related receptor in neuroblastomas.," *J Biol Chem*, vol. 270, no. 4, pp. 1881–1887, Jan. 1995.
- [157] A. Pastuszko, D. K. Yee, D. Nelson, and D. F. Wilson, "Calcium dependent regulation of catecholamine and serotonin metabolism in human neuroblastoma cells.," *Cancer Biochem Biophys*, vol. 10, no. 1, pp. 67–76, Jul. 1988.
- [158] M. Fischer and F. Berthold, "Characterization of the gene expression profile of neuroblastoma cell line IMR-5 using serial analysis of gene expression.," *Cancer Lett*, vol. 190, no. 1, pp. 79–87, Feb. 2003.
- [159] J. Torres, P. L. Regan, R. Edo, P. Leonhardt, E. I. Jeng, E. F. Rappaport, N. Ikegaki, and X. X. Tang, "Biological effects of induced MYCN hyper-expression in MYCN-amplified neuroblastomas.," *Int J Oncol*, vol. 37, no. 4, pp. 983–991, 2010.
- [160] N. Keshelava, J. J. Zuo, P. Chen, S. N. Waidyaratne, M. C. Luna, C. J. Gomer, T. J. Triche, and C. P. Reynolds, "Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines.," *Cancer Res*, vol. 61, no. 16, pp. 6185–6193, Aug. 2001.
- [161] C. P. Reynolds, J. L. Biedler, B. A. Spengler, D. A. Reynolds, R. A. Ross, E. P. Frenkel, and R. G. Smith, "Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy.," *J Natl Cancer Inst*, vol. 76, no. 3, pp. 375–387, Mar. 1986.
- [162] J. Carr, E. Bell, A. D. J. Pearson, U. R. Kees, H. Beris, J. Lunec, and D. A. Tweddle, "Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14(ARF) pathway in neuroblastoma cell lines established at relapse.," *Cancer Res*, vol. 66, no. 4, pp. 2138–2145, Feb. 2006.
- [163] R. A. Ross, B. A. Spengler, and J. L. Biedler, "Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells.," *J Natl Cancer Inst*, vol. 71, no. 4, pp. 741–747, 1983.
- [164] W. Sadée, V. C. Yu, M. L. Richards, P. N. Preis, M. R. Schwab, F. M. Brodsky, and J. L. Biedler, "Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line.," *Cancer Res*, vol. 47, no. 19, pp. 5207–5212, 1987.
- [165] B. A. Spengler, J. L. Biedler, and R. A. Ross, "A corrected karyotype for the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line.," *Cancer Genet Cytogenet*, vol. 138, no. 2, pp. 177–178, 2002.
- [166] D. A. Tweddle, A. J. Malcolm, M. Cole, A. D. Pearson, and J. Lunec, "p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G(1) arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells.," *Am J Pathol*, vol. 158, no. 6, pp. 2067–2077, Jun. 2001.
- [167] D. Goldstein and J. Leavitt, "Expression of neoplasia-related proteins of chemically transformed HuT fibroblasts in human osteosarcoma HOS fibroblasts and modulation of actin expression upon elevation of tumorigenic potential.," *Cancer Res*, vol. 45, no. 7, pp. 3256–3261, Jul. 1985.
- [168] M. Park, J. R. Testa, D. G. Blair, N. Z. Parsa, and G. F. Vande Woude, "Two rearranged MET alleles in MNNG-HOS cells reveal the orientation of MET on chromosome 7 to other markers tightly linked to the cystic fibrosis locus.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 85, no. 8, pp. 2667–2671, Apr. 1988.
- [169] M. Roepke, A. Diestel, K. Bajbouj, D. Walluscheck, P. Schonfeld, A. Roessner, R. Schneider-Stock, and H. Gali-Muhtasib, "Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells.," *Cancer Biol Ther*, vol. 6, no. 2, pp. 160–169, Feb. 2007.
- [170] N. Asada, H. Tsuchiya, and K. Tomita, "De novo deletions of p53 gene and wild-type p53 correlate with acquired cisplatin-resistance in human osteosarcoma OST cell line.," *Anticancer Res*, vol. 19, no. 6B, pp. 5131–5137, 1999.
- [171] K. Tomita, T. Kontani, H. Tsuchiya, and S. Nomura, "Drug resistance and cross-sensitivity in cultured human osteosarcoma cells.," *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, vol. 63, no. 4, pp. 274–281, Apr. 1989.

- [172] K. Tomita and H. Tsuchiya, "Enhancement of cytotoxic and antitumor effect of cisplatin by caffeine in human osteosarcoma.," *Clin Ther*, vol. 11, no. 1, pp. 43–52, 1989.
- [173] T. R. Chen, C. Dorotinsky, M. Macy, and R. Hay, "Cell identity resolved.," *Nature*, vol. 340, no. 6229, p. 106, Jul. 1989.
- [174] C. A. Felix, C. C. Kappel, T. Mitsudomi, M. M. Nau, M. Tsokos, G. D. Crouch, P. D. Nisen, N. J. Winick, and L. J. Helman, "Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma.," *Cancer Res*, vol. 52, no. 8, pp. 2243–2247, Apr. 1992.
- [175] M. E. Gershwin, R. M. Ikeda, T. G. Kawakami, and R. B. Owens, "Immunobiology of heterotransplanted human tumors in nude mice.," *J Natl Cancer Inst*, vol. 58, no. 5, pp. 1455–1461, May 1977.
- [176] R. M. McAllister, J. Melnyk, J. Z. Finkelstein, E. C. Adams, and M. B. Gardner, "Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma.," *Cancer*, vol. 24, no. 3, pp. 520–526, Oct. 1969.
- [177] A. C. Taylor, L. Shu, M. K. Danks, C. A. Poquette, S. Shetty, M. J. Thayer, P. J. Houghton, and L. C. Harris, "P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines.," *Med Pediatr Oncol*, vol. 35, no. 2, pp. 96–103, Aug. 2000.
- [178] A. A. Gibson, F. G. Harwood, D. M. Tillman, and J. A. Houghton, "Selective sensitization to DNA-damaging agents in a human rhabdomyosarcoma cell line with inducible wild-type p53 overexpression.," *Clin Cancer Res*, vol. 4, no. 1, pp. 145–152, Jan. 1998.
- [179] E. C. Douglass, M. Valentine, E. Etcubanas, D. Parham, B. L. Webber, P. J. Houghton, J. A. Houghton, and A. A. Green, "A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma.," *Cytogenet Cell Genet*, vol. 45, no. 3–4, pp. 148–155, 1987.
- [180] J. Fogh, J. M. Fogh, and T. Orfeo, "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 59, no. 1, pp. 221–6, Jul. 1977.
- [181] J. Fogh, W. C. Wright, and J. D. Loveless, "Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 58, no. 2, pp. 209–14, Feb. 1977.
- [182] J. Fogh, "Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors.," *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, no. 49, pp. 5–9, Dec. 1978.
- [183] D. J. Giard, S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik, and W. P. Parks, "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 51, no. 5, pp. 1417–23, Nov. 1973.
- [184] M. Lieber, B. Smith, A. Szakal, W. Nelson-Rees, and G. Todaro, "A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.," *Int. J. Cancer*, vol. 17, no. 1, pp. 62–70, Jan. 1976.
- [185] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn, "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.," *J. Gen. Virol.*, vol. 36, no. 1, pp. 59–74, Jul. 1977.
- [186] N. Louis, C. Eveleigh, and F. L. Graham, "Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line.," *Virology*, vol. 233, no. 2, pp. 423–9, Jul. 1997.
- [187] C. Agnoletto, E. Melloni, F. Casciano, G. M. Rigolin, E. Rimondi, C. Celeghini, L. Brunelli, A. Cuneo, P. Secchiero, and G. Zauli, "Sodium dichloroacetate exhibits anti-leukemic activity in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and synergizes with the p53 activator Nutlin-3.," *Oncotarget*, vol. 5, no. 12, pp. 4347–60, Jun. 2014.
- [188] J. Tong, G. Xie, J. He, J. Li, F. Pan, and H. Liang, "Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-fluorouracil in colorectal cancer.," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, p. 740564, Jan. 2011.
- [189] M.-F. Zheng, S. Shen, and W. Huang, "DCA increases the antitumor effects of capecitabine in a mouse B16 melanoma allograft and a human non-small cell lung cancer A549

- xenograft.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 72, no. 5, pp. 1031–41, Nov. 2013.
- [190] C. A. Rabik and M. E. Dolan, "Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents.," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 33, no. 1, pp. 9–23, Feb. 2007.
- [191] V. Cepeda, M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo, and J. M. Pérez, "Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity.," *Anticancer. Agents Med. Chem.*, vol. 7, no. 1, pp. 3–18, Jan. 2007.
- [192] O. Tacar, P. Sriamornsak, and C. R. Dass, "Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems.," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 65, no. 2, pp. 157–70, Feb. 2013.
- [193] A. Dołęga, "[Cytotoxic mechanism and antineoplastic action of etoposide].," *Postepy Hig. Med. Dosw.*, vol. 52, no. 1, pp. 67–87, Jan. 1998.
- [194] G. G. Chabot, "Clinical pharmacokinetics of irinotecan.," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 33, no. 4, pp. 245–59, Oct. 1997.
- [195] J. L. Villano, T. E. Seery, and L. R. Bressler, "Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 64, no. 4, pp. 647–55, Sep. 2009.
- [196] U. Olszewski, T. T. Poulsen, E. Ulsperger, H. S. Poulsen, K. Geissler, and G. Hamilton, "In vitro cytotoxicity of combinations of dichloroacetate with anticancer platinum compounds.," *Clin. Pharmacol.*, vol. 2, pp. 177–83, Jan. 2010.
- [197] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand, "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 16, pp. 7276–80, Aug. 1991.
- [198] L. G. Lee, C. R. Connell, and W. Bloch, "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 21, no. 16, pp. 3761–6, Aug. 1993.
- [199] H. G. Drexler, *Guide to Leukemia-Lymphoma Cell Lines*, 2. Braunschweig, 2010.
- [200] J. J. Liu, J. Lu, and M. J. McKeage, "Membrane transporters as determinants of the pharmacology of platinum anticancer drugs.," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 12, no. 8, pp. 962–86, Oct. 2012.
- [201] S. Lal, A. Mahajan, W. N. Chen, and B. Chowbay, "Pharmacogenetics of target genes across doxorubicin disposition pathway: a review.," *Curr. Drug Metab.*, vol. 11, no. 1, pp. 115–28, Jan. 2010.
- [202] L. Leanza, P. O'Reilly, A. Doyle, E. Venturini, M. Zoratti, E. Szegezdi, and I. Szabo, "Correlation between potassium channel expression and sensitivity to drug-induced cell death in tumor cell lines.," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 20, no. 2, pp. 189–200, Jan. 2014.
- [203] J. Möllenkamp, "In vitro effects of Eg5 inhibitor K858 and Pim-1 kinase inhibitor TCS PIM-1 1 on a panel of 18 pediatric cell lines," Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2014.
- [204] I. Papandreou, T. Goliassova, and N. C. Denko, "Anticancer drugs that target metabolism: Is dichloroacetate the new paradigm?," *Int. J. Cancer*, vol. 128, no. 5, pp. 1001–8, Mar. 2011.
- [205] K. Kumar, S. Wigfield, H. E. Gee, C. M. Devlin, D. Singleton, J.-L. Li, F. Buffa, M. Huffman, A. L. Sinn, J. Silver, H. Turley, R. Leek, A. L. Harris, and M. Ivan, "Dichloroacetate reverses the hypoxic adaptation to bevacizumab and enhances its antitumor effects in mouse xenografts.," *J. Mol. Med. (Berl.)*, vol. 91, no. 6, pp. 749–58, Jun. 2013.
- [206] R. C. Sun, P. G. Board, and A. C. Blackburn, "Targeting metabolism with arsenic trioxide and dichloroacetate in breast cancer cells.," *Mol. Cancer*, vol. 10, p. 142, Jan. 2011.
- [207] Y.-C. Shen, D.-L. Ou, C. Hsu, K.-L. Lin, C.-Y. Chang, C.-Y. Lin, S.-H. Liu, and A.-L. Cheng, "Activating oxidative phosphorylation by a pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma.," *Br. J. Cancer*, vol. 108, no. 1, pp. 72–81, Jan. 2013.
- [208] W. Y. Sanchez, S. L. McGee, T. Connor, B. Mottram, A. Wilkinson, J. P. Whitehead, S.

- Vuckovic, and L. Catley, "Dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis in multiple myeloma cells and increases sensitivity to bortezomib," *Br. J. Cancer*, vol. 108, no. 8, pp. 1624–1633, Mar. 2013.
- [209] K. Ayyanathan, S. Kesaraju, K. Dawson-Scully, and H. Weissbach, "Combination of Sulindac and Dichloroacetate Kills Cancer Cells via Oxidative Damage," *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e39949, Jul. 2012.
- [210] T. Ishiguro, R. Ishiguro, M. Ishiguro, and S. Iwai, "Co-treatment of dichloroacetate, omeprazole and tamoxifen exhibited synergistically antiproliferative effect on malignant tumors: in vivo experiments and a case report.," *Hepatogastroenterology*, vol. 59, no. 116, pp. 994–6, Jun. 2012.
- [211] J. Xie, B.-S. Wang, D.-H. Yu, Q. Lu, J. Ma, H. Qi, C. Fang, and H.-Z. Chen, "Dichloroacetate shifts the metabolism from glycolysis to glucose oxidation and exhibits synergistic growth inhibition with cisplatin in HeLa cells.," *Int. J. Oncol.*, vol. 38, no. 2, pp. 409–17, Feb. 2011.
- [212] W. Fiebiger, U. Olszewski, E. Ulsperger, K. Geissler, and G. Hamilton, "In vitro cytotoxicity of novel platinum-based drugs and dichloroacetate against lung carcinoid cell lines.," *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 13, no. 1, pp. 43–9, Jan. 2011.
- [213] E. B. Garon, H. R. Christofk, W. Hosmer, C. D. Britten, A. Bahng, M. J. Crabtree, C. S. Hong, N. Kamranpour, S. Pitts, F. Kabbavar, C. Patel, E. von Euw, A. Black, E. D. Michelakis, S. M. Dubinett, and D. J. Slamon, "Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer.," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, Jan. 2014.
- [214] X. Xue, S. You, Q. Zhang, Y. Wu, G.-Z. Zou, P. C. Wang, Y.-L. Zhao, Y. Xu, L. Jia, X. Zhang, and X.-J. Liang, "Mitaplatin increases sensitivity of tumor cells to cisplatin by inducing mitochondrial dysfunction.," *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 3, pp. 634–44, Mar. 2012.
- [215] S. Salas, C. Mercier, J. Ciccolini, B. Pourroy, R. Fanciullino, B. Tranchand, S. Monjanel-Mouterde, M. Baciuchka-Palmaro, C. Dupuis, C. Yang, M. Balti, B. Lacarelle, F. Duffaud, A. Durand, and R. Favre, "Therapeutic drug monitoring for dose individualization of Cisplatin in testicular cancer patients based upon total platinum measurement in plasma.," *Ther. Drug Monit.*, vol. 28, no. 4, pp. 532–9, Aug. 2006.
- [216] Y. Dai, X. Xiong, G. Huang, J. Liu, S. Sheng, H. Wang, and W. Qin, "Dichloroacetate enhances adriamycin-induced hepatoma cell toxicity in vitro and in vivo by increasing reactive oxygen species levels.," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e92962, Jan. 2014.
- [217] G. Hempel, S. Flege, G. Würthwein, and J. Boos, "Peak plasma concentrations of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia or non-Hodgkin lymphoma," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 49, no. 2, pp. 133–141, Feb. 2002.
- [218] K. C. Nitiss and J. L. Nitiss, "Twisting and ironing: Doxorubicin cardiotoxicity by mitochondrial DNA damage.," *Clin. Cancer Res.*, Jun. 2014.
- [219] G. Singh, S. M. Sharkey, and R. Moorehead, "Mitochondrial DNA damage by anticancer agents.," *Pharmacol. Ther.*, vol. 54, no. 2, pp. 217–30, Jan. 1992.
- [220] M. Morfouace, L. Lalier, M. Bahut, V. Bonnamain, P. Naveilhan, C. Guette, L. Oliver, N. Gueguen, P. Reynier, and F. M. Vallette, "Comparison of spheroids formed by rat glioma stem cells and neural stem cells reveals differences in glucose metabolism and promising therapeutic applications.," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 40, pp. 33664–74, Sep. 2012.
- [221] S. O. Konert, "Korrelation der Pharmakokinetik von Etoposid aus Etoposidphosphat mit klinischen Parametern," Universität Marburg, 2006.
- [222] M. K. Ma, W. C. Zamboni, K. M. Radomski, W. L. Furman, V. M. Santana, P. J. Houghton, S. K. Hanna, A. K. Smith, and C. F. Stewart, "Pharmacokinetics of Irinotecan and Its Metabolites SN-38 and APC in Children with Recurrent Solid Tumors after Protracted Low-Dose Irinotecan," *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 813–819, Mar. 2000.
- [223] L. P. Rivory and J. Robert, "Identification and kinetics of a ?-glucuronide metabolite of SN-38 in human plasma after administration of the camptothecin derivative irinotecan," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 36, no. 2, pp. 176–179, 1995.

- [224] K. Fujita, Y. Sunakawa, K. Miwa, Y. Akiyama, M. Sugiyama, K. Kawara, H. Ishida, K. Yamashita, K. Mizuno, S. Saji, W. Ichikawa, W. Yamamoto, F. Nagashima, T. Miya, M. Narabayashi, Y. Ando, T. Hirose, and Y. Sasaki, “Delayed Elimination of SN-38 in Cancer Patients with Severe Renal Failure,” 2011.
- [225] R. T. Wicks, J. Azadi, A. Mangraviti, I. Zhang, L. Hwang, A. Joshi, H. Bow, M. Hutt-Cabezas, K. L. Martin, M. A. Rudek, M. Zhao, H. Brem, and B. M. Tyler, “Local delivery of cancer-cell glycolytic inhibitors in high-grade glioma.,” *Neuro. Oncol.*, Jul. 2014.
- [226] J. C. Panetta, M. N. Kirstein, A. Gajjar, G. Nair, M. Fouladi, R. L. Heideman, M. Wilkinson, and C. F. Stewart, “Population pharmacokinetics of temozolomide and metabolites in infants and children with primary central nervous system tumors.,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 52, no. 6, pp. 435–41, Dec. 2003.
- [227] J. Bielanska, J. Hernández-Losa, M. Pérez-Verdaguer, T. Moline, R. Somoza, S. Ramón Y Cajal, E. Condom, J. C. Ferreres, and A. Felipe, “Voltage-dependent potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human cancer.,” *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 9, no. 8, pp. 904–14, Dec. 2009.
- [228] J. Bielanska, J. Hernández-Losa, T. Moline, R. Somoza, S. Ramón y Cajal, E. Condom, J. C. Ferreres, and A. Felipe, “Differential expression of Kv1.3 and Kv1.5 voltage-dependent K⁺ channels in human skeletal muscle sarcomas.,” *Cancer Invest.*, vol. 30, no. 3, pp. 203–8, Mar. 2012.
- [229] J. Bielanska, J. Hernández-Losa, T. Moline, R. Somoza, S. R. Y. Cajal, E. Condom, J. C. Ferreres, and A. Felipe, “Increased voltage-dependent K(+) channel Kv1.3 and Kv1.5 expression correlates with leiomyosarcoma aggressiveness.,” *Oncol. Lett.*, vol. 4, no. 2, pp. 227–230, Aug. 2012.
- [230] S. Arvind, A. Arivazhagan, V. Santosh, and B. A. Chandramouli, “Differential expression of a novel voltage gated potassium channel--Kv 1.5 in astrocytomas and its impact on prognosis in glioblastoma.,” *Br. J. Neurosurg.*, vol. 26, no. 1, pp. 16–20, Feb. 2012.
- [231] S. N. MacFarlane and H. Sontheimer, “Modulation of Kv1.5 currents by Src tyrosine phosphorylation: potential role in the differentiation of astrocytes.,” *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 14, pp. 5245–53, Jul. 2000.
- [232] B. Attali, N. Wang, A. Kolot, A. Sobko, V. Cherepanov, and B. Soliven, “Characterization of delayed rectifier Kv channels in oligodendrocytes and progenitor cells.,” *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 21, pp. 8234–45, Nov. 1997.
- [233] R. Chittajallu, Y. Chen, H. Wang, X. Yuan, C. A. Ghiani, T. Heckman, C. J. McBain, and V. Gallo, “Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 4, pp. 2350–5, Feb. 2002.
- [234] W. J. Kent, C. W. Sugnet, T. S. Furey, R. K. M, T. H. Pringle, A. M. Zahler, and D. Haussler, “UCSC Genome Bioinformatics,” 2015. [Online]. Available: <http://genome.ucsc.edu/>. [Accessed: 14-Sep-2015].
- [235] M. Tokarska-Schlattner, T. Wallimann, and U. Schlattner, “Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin.,” *C. R. Biol.*, vol. 329, no. 9, pp. 657–68, Sep. 2006.
- [236] Y. Han, Y. Shi, Z. Han, L. Sun, and D. Fan, “Detection of potassium currents and regulation of multidrug resistance by potassium channels in human gastric cancer cells.,” *Cell Biol. Int.*, vol. 31, no. 7, pp. 741–7, Jul. 2007.
- [237] K. Jung and R. Reszka, “Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines.,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 49, no. 1–2, pp. 87–105, Jul. 2001.
- [238] M. S. Goldberg and P. A. Sharp, “Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression.,” *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 2, pp. 217–24, Feb. 2012.
- [239] W. Guo, Y. Zhang, T. Chen, Y. Wang, J. Xue, Y. Zhang, W. Xiao, X. Mo, and Y. Lu, “Efficacy of RNAi targeting of pyruvate kinase M2 combined with cisplatin in a lung cancer model.,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 137, no. 1, pp. 65–72, Jan. 2011.
- [240] D. Anastasiou, Y. Yu, W. J. Israelsen, J.-K. Jiang, M. B. Boxer, B. S. Hong, W. Tempel, S.

- Dimov, M. Shen, A. Jha, H. Yang, K. R. Mattaini, C. M. Metallo, B. P. Fiske, K. D. Courtney, S. Malstrom, T. M. Khan, C. Kung, A. P. Skoumbourdis, H. Veith, N. Southall, M. J. Walsh, K. R. Brimacombe, W. Leister, S. Y. Lunt, Z. R. Johnson, K. E. Yen, K. Kunii, S. M. Davidson, H. R. Christofk, C. P. Austin, J. Inglese, M. H. Harris, J. M. Asara, G. Stephanopoulos, F. G. Salituro, S. Jin, L. Dang, D. S. Auld, H.-W. Park, L. C. Cantley, C. J. Thomas, and M. G. Vander Heiden, "Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis.," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. 839–47, Oct. 2012.
- [241] K. Bluemlein, N.-M. Grüning, R. G. Feichtinger, H. Lehrach, B. Kofler, and M. Ralser, "No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis.," *Oncotarget*, vol. 2, no. 5, pp. 393–400, May 2011.
- [242] M. Cortés-Cros, C. Hemmerlin, S. Ferretti, J. Zhang, J. S. Gounarides, H. Yin, A. Muller, A. Haberkorn, P. Chene, W. R. Sellers, and F. Hofmann, "M2 isoform of pyruvate kinase is dispensable for tumor maintenance and growth.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 2, pp. 489–94, Jan. 2013.
- [243] W. J. Israelsen, T. L. Dayton, S. M. Davidson, B. P. Fiske, A. M. Hosios, G. Bellinger, J. Li, Y. Yu, M. Sasaki, J. W. Horner, L. N. Burga, J. Xie, M. J. Jurczak, R. A. DePinho, C. B. Clish, T. Jacks, R. G. Kibbey, G. M. Wulf, D. Di Vizio, G. B. Mills, L. C. Cantley, and M. G. Vander Heiden, "PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells.," *Cell*, vol. 155, no. 2, pp. 397–409, Oct. 2013.
- [244] G. A. Spoden, U. Rostek, S. Lechner, M. Mitterberger, S. Mazurek, and W. Zwerschke, "Pyruvate kinase isoenzyme M2 is a glycolytic sensor differentially regulating cell proliferation, cell size and apoptotic cell death dependent on glucose supply.," *Exp. Cell Res.*, vol. 315, no. 16, pp. 2765–74, Oct. 2009.
- [245] D. Anastasiou, G. Pouligiannis, J. M. Asara, M. B. Boxer, J. Jiang, M. Shen, G. Bellinger, A. T. Sasaki, J. W. Locasale, D. S. Auld, C. J. Thomas, M. G. Vander Heiden, and L. C. Cantley, "Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses.," *Science*, vol. 334, no. 6060, pp. 1278–83, Dec. 2011.
- [246] W. Luo, H. Hu, R. Chang, J. Zhong, M. Knabel, R. O’Meally, R. N. Cole, A. Pandey, and G. L. Semenza, "Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1.," *Cell*, vol. 145, no. 5, pp. 732–44, May 2011.
- [247] A. Prigione, N. Rohwer, S. Hoffmann, B. Mlody, K. Drews, R. Bukowiecki, K. Blümlein, E. E. Wanker, M. Ralser, T. Cramer, and J. Adjaye, "HIF1 α modulates cell fate reprogramming through early glycolytic shift and upregulation of PDK1-3 and PKM2.," *Stem Cells*, vol. 32, no. 2, pp. 364–76, Feb. 2014.
- [248] J. Y. Jung, C. R. Han, Y. J. Jeong, H. J. Kim, H. S. Lim, K. H. Lee, H. O. Park, W. M. Oh, S. H. Kim, and W. J. Kim, "Epigallocatechin gallate inhibits nitric oxide-induced apoptosis in rat PC12 cells.," *Neurosci. Lett.*, vol. 411, no. 3, pp. 222–7, Jan. 2007.
- [249] C. Murga-Zamalloa and M. S. Lim, "ALK-driven tumors and targeted therapy: focus on crizotinib.," *Pharmgenomics. Pers. Med.*, vol. 7, pp. 87–94, Jan. 2014.
- [250] S. R. P. McDonnell, "The Role of NPM-ALK Signaling in Tumor Cell Metabolism.," 2013.
- [251] S. Bonnet, R. Paulin, G. Sutendra, P. Dromparis, M. Roy, K. O. Watson, J. Nagendran, A. Haromy, J. R. B. Dyck, and E. D. Michelakis, "Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodeling through the inhibition of the Akt/GSK3- β /NFAT axis.," *Circulation*, vol. 120, no. 13, pp. 1231–40, Sep. 2009.
- [252] R. L. Elstrom, D. E. Bauer, M. Buzzai, R. Karnauskas, M. H. Harris, D. R. Plas, H. Zhuang, R. M. Cinalli, A. Alavi, C. M. Rudin, and C. B. Thompson, "Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells.," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 11, pp. 3892–9, Jun. 2004.
- [253] J. G. Pastorino, J. B. Hoek, and N. Shulga, "Activation of glycogen synthase kinase 3 β disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 22, pp. 10545–10554, 2005.

- [254] M. D. McDowall, M. S. Scott, and G. J. Barton, "PIPs: human protein-protein interaction prediction database.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. Database issue, pp. D651-6, Jan. 2009.
- [255] R. Nogueira-Ferreira, R. Vitorino, M. J. Ferreira-Pinto, R. Ferreira, and T. Henriques-Coelho, "Exploring the role of post-translational modifications on protein-protein interactions with survivin," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 538, no. 2, pp. 64–70, 2013.
- [256] J. Kerner, K. Lee, B. Tandler, and C. L. Hoppel, "VDAC proteomics: Post-translation modifications," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1818, no. 6, pp. 1520–1525, Jun. 2012.

7 Lebenslauf

Zum Schutz personenbezogener Daten ist der Lebenslauf in der digitalen Ausgabe nicht enthalten.

8 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Joachim Boos sowie Frau Dr. rer. nat. Claudia Lanvers-Kaminsky für die freundliche Überlassung dieses Themas und Betreuung. Ich danke den Mitarbeiterinnen Frau Sandra Schulz und Frau Petra Schulze-Westhoff für die kompetente Einarbeitung in die Methoden, die Bereitstellung und Aufarbeitung der Materialien und die angenehme Gesellschaft im Labor. Bei meinen Eltern bedanke ich mich für alles, was sie für mich geleistet haben. Nicht zuletzt haben sie mir durch ihre jahrelange und geduldige Unterstützung mein Studium und damit auch diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht.

9 Anhang

9.1 Ergebnisse der Analyse der Kombinations-Effekte der In-vitro-Zytotoxizitäts-Tests

Hier aufgeführt sind die Ergebnisse der in Kap. 4.1.2 dargelegten Algorithmen hinsichtlich der Auswertung der additiven/ supraadditiven sowie antagonistischen Effekte gegenüber dem konventionellen Zytostatikum. Die Ergebnisse, welche additive/ supraadditive sowie antagonistische Effekte aufzeigen, sind grau hinterlegt. Diese indizierten Werte geben das Ausmaß des supraadditiven bzw. antagonistischen Effektes (über den Grenzwert zur Erfüllung der jeweiligen Definition) in Prozent wieder.

9.1.1 Cisplatin

CCRF-CEM		Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Cisplatin-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA	
0,01	-2,4	-0,7	21,1	30,9	
0,1	-6,2	-4,2	17,3	27,4	
1	0,2	0,5	23,7	32,1	
10	-7,3	-8,2	16,2	23,4	
100	-22,0	-26,7	1,5	4,9	

HL-60		Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Cisplatin-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA	
0,01	-0,3	-0,6	16,2	23,5	
0,1	-2,1	1,9	14,4	26,0	
1	-1,6	1,7	14,8	25,8	
10	-0,9	-0,1	15,5	24,0	
100	-11,3	-16,9	5,2	7,2	

MOLT4		Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Cisplatin-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA	
0,01	-5,4	-3,6	33,7	53,8	
0,1	-7,4	-6,3	31,8	51,1	
1	-5,0	-7,0	34,2	50,4	
10	-8,6	-11,8	30,5	45,6	
100	-36,5	-52,6	2,6	4,8	

REH	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Cisplatin-Konzentration [µmol/l]	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA
0,01	-4,2	-4,9	18,5	37,7
0,1	-2,7	-2,7	20,0	39,9
1	2,4	3,6	25,1	46,3
10	-5,7	-6,0	17,0	36,7
100	-19,5	-38,6	3,2	4,0

DAOY	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Cisplatin-Konzentration [µmol/l]	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA
0,01	1,4	0,8	7,7	69,5
0,1	9,4	-6,2	15,7	62,4
1	7,2	-17,6	13,5	51,1
10	0,8	-23,7	7,1	44,9
100	-3,6	-56,6	2,7	12,0

UW228.2	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Cisplatin-Konzentration [µmol/l]	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA
0,01	0,5	3,3	14,4	37,8
0,1	-8,9	3,6	5,0	38,0
1	-3,5	-6,8	10,4	27,7
10	2,0	0,7	15,9	35,1
100	1,8	-9,8	15,7	24,6

MNNG-HOS	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Cisplatin-Konzentration [µmol/l]	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA
0,01	3,8	2,5	15,9	28,0
0,1	1,5	0,9	13,5	26,4
1	4,3	11,3	16,4	36,8
10	13,1	16,2	25,1	41,7
100	-8,0	-17,8	4,0	7,7

OST	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Cisplatin-Konzentration [µmol/l]	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA	Cisplatin + 10 mmol/l DCA	Cisplatin + 25 mmol/l DCA
0,01	-4,3	0,5	5,4	37,4
0,1	-4,6	-3,2	5,1	33,7
1	-4,2	0,2	5,5	37,1
10	-12,6	-6,4	-2,9	30,5
100	-7,5	-23,2	2,2	13,6

9.1.2 Doxorubicin

CCRF-CEM	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA
Doxorubicin-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]				
0,001	-6,7	-5,8	15,9	23,5
0,01	-11,3	-12,7	11,3	16,6
0,1	-19,4	-26,2	3,2	3,1
1	-21,5	-26,4	1,2	3,0
10	-19,8	-26,2	2,8	3,2

HL-60	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA
Doxorubicin - Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]				
0,001	-0,6	4,9	11,8	20,3
0,01	-2,4	-1,2	9,9	14,2
0,1	-2,3	-3,4	10,0	12,0
1	-10,6	-10,5	1,8	4,9
10	-8,5	-9,9	3,9	5,5

MOLT4	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA
Doxorubicin-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]				
0,001	-3,4	-8,9	31,3	42,6
0,01	-20,6	-32,2	14,1	19,2
0,1	-29,6	-40,7	5,1	10,7
1	-31,4	-43,6	3,3	7,8
10	-31,4	-42,8	3,3	8,6

REH	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA
Doxorubicin-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]				
0,001	-8,3	-25,1	11,3	18,8
0,01	-11,5	-29,5	8,1	14,5
0,1	-15,4	-39,5	4,2	4,4
1	-16,9	-40,1	2,7	3,8
10	-17,1	-39,9	2,5	4,0

DAOY	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA
Doxorubicin-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]				
0,001	-5,1	-4,6	10,7	75,6
0,01	6,9	0,4	22,7	80,6
0,1	-17,0	-44,3	-1,1	35,9
1	-16,2	-73,3	-0,4	6,9
10	-15,5	-78,2	0,3	2,0

UW228.2		Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Doxorubicin-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA
0,001	-2,4	-2,5	16,7	37,5	
0,01	-6,8	-13,7	12,3	26,4	
0,1	-10,7	-28,7	8,4	11,3	
1	-14,6	-34,2	4,5	5,8	
10	-15,3	-35,4	3,9	4,6	

MNNG-HOS		Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Doxorubicin-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA
0,001	-1,4	-2,7	7,2	22,5	
0,01	-1,1	0,8	7,5	26,0	
0,1	-6,9	-10,2	1,7	15,0	
1	-8,3	-20,5	0,3	4,7	
10	-8,1	-23,2	0,5	2,0	

OST		Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Doxorubicin-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA	Doxorubicin + 10 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA	Doxorubicin + 25 mmol/l DCA
0,001	-4,6	-2,1	8,6	40,0	
0,01	3,4	-2,9	16,6	39,2	
0,1	-5,5	-12,3	7,7	29,7	
1	-6,8	-30,8	6,4	11,3	
10	-14,1	-42,2	-0,9	-0,1	

9.1.3 Etoposid

CCRF-CEM		Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Etoposid-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA
0,01	1,4	1,1	17,1	28,4	
0,1	1,4	-2,1	17,1	25,1	
1	-9,0	-19,4	6,7	7,8	
10	-13,2	-23,1	2,5	4,1	
100	-13,6	-23,2	2,2	4,1	

HL-60		Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Etoposid-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA
0,01	-1,1	0,8	11,9	20,0	
0,1	-6,6	-4,3	6,3	14,9	
1	2,4	2,2	15,4	21,4	
10	-2,5	-1,6	10,4	17,6	
100	-10,2	-4,7	2,8	14,5	

MOLT4	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Etoposid-Konzentration [µmol/l]	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA
0,01	-7,3	-7,1	32,0	44,5
0,1	-20,4	-26,6	19,0	24,9
1	-35,0	-44,7	4,4	6,9
10	-34,1	-43,3	5,3	8,3
100	-34,8	-43,6	4,6	7,9

REH	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Etoposid-Konzentration [µmol/l]	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA
0,01	-4,3	-6,5	17,9	39,8
0,1	-14,3	-32,2	7,9	14,1
1	-18,6	-40,7	3,7	5,6
10	-19,0	-39,8	3,3	6,5
100	-20,5	-41,6	1,8	4,7

DAOY	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Etoposid-Konzentration [µmol/l]	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA
0,01	<u>19,0</u>	<u>3,4</u>	22,9	88,0
0,1	<u>16,0</u>	-7,3	19,8	77,3
1	-13,4	-67,5	<u>-9,5</u>	17,1
10	-5,9	-87,4	<u>-2,0</u>	<u>-2,8</u>
100	-5,3	-83,8	<u>-1,4</u>	0,8

UW228.2	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Etoposid-Konzentration [µmol/l]	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA
0,01	<u>4,1</u>	-0,4	14,0	25,5
0,1	<u>5,5</u>	<u>3,1</u>	15,4	28,9
1	-2,7	-14,3	7,2	11,6
10	-15,9	-36,6	<u>-6,0</u>	<u>-10,8</u>
100	-14,1	-38,3	<u>-4,2</u>	<u>-12,5</u>

MNNG-HOS	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Etoposid-Konzentration [µmol/l]	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA
0,01	-7,0	-6,6	10,6	27,7
0,1	-9,2	-12,0	8,4	22,3
1	-22,0	-36,1	<u>-4,4</u>	<u>-1,9</u>
10	-29,5	-40,4	<u>-11,9</u>	<u>-6,2</u>
100	-18,8	-38,5	<u>-1,2</u>	<u>-4,3</u>

OST	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Etoposid-Konzentration [µmol/l]	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA	Etoposid + 10 mmol/l DCA	Etoposid + 25 mmol/l DCA
0,01	-4,4	-7,8	2,7	31,5
0,1	-6,0	-11,0	1,0	28,2
1	-7,5	-29,6	<u>-0,4</u>	9,7
10	-19,8	-56,2	<u>-12,7</u>	<u>-16,9</u>
100	-8,0	-43,8	<u>-0,9</u>	<u>-4,5</u>

9.1.4 SN38

CCRF-CEM	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA
SN38-Konzentration [μmol/l]				
0,0001	-8,4	-6,9	16,2	26,7
0,001	-6,8	-7,0	17,8	26,5
0,01	-18,3	-27,4	6,4	6,1
0,1	-20,4	-30,0	4,3	3,5
1	-17,3	-28,3	7,4	5,3

HL-60	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA
SN38-Konzentration [μmol/l]				
0,0001	-2,4	-2,1	14,7	21,5
0,001	-1,9	4,0	15,2	27,5
0,01	-4,2	-4,1	12,9	19,4
0,1	-5,4	-6,5	11,7	17,0
1	-8,9	-10,5	8,2	13,1

MOLT4	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA
SN38-Konzentration [μmol/l]				
0,0001	-4,8	-9,6	28,6	43,0
0,001	-15,7	-29,2	17,7	23,4
0,01	-29,4	-43,4	4,0	9,2
0,1	-29,0	-43,0	4,3	9,6
1	-27,5	-43,8	5,8	8,8

REH	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA
SN38-Konzentration [μmol/l]				
0,0001	4,8	-5,9	27,7	37,5
0,001	-16,5	-33,9	6,4	9,5
0,01	-19,9	-39,4	3,0	4,0
0,1	-19,4	-38,2	3,5	5,2
1	-20,0	-39,7	2,9	3,7

DAOY	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA
SN38-Konzentration [μmol/l]				
0,0001	-3,7	-0,5	-2,5	65,9
0,001	-0,1	-27,7	1,1	38,7
0,01	-9,0	-61,1	-7,8	5,3
0,1	-7,8	-65,2	-6,6	1,3
1	-1,5	-67,2	-0,3	-0,8

UW228.2	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA
SN38-Konzentration [µmol/l]				
0,0001	2,1	-1,0	16,5	38,0
0,001	-0,6	-6,8	13,8	32,2
0,01	-5,3	-31,5	9,1	7,5
0,1	-12,4	-40,8	2,0	-1,8
1	-7,4	-37,5	7,0	1,5

MNNG-HOS	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA
SN38-Konzentration [µmol/l]				
0,0001	0,5	-3,0	7,4	22,9
0,001	-1,7	-2,8	5,1	23,2
0,01	-4,9	-20,9	1,9	5,1
0,1	-12,5	-26,4	-5,7	-0,4
1	-14,1	-35,0	-7,2	-9,1

OST	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA	SN38 + 10 mmol/l DCA	SN38 + 25 mmol/l DCA
SN38-Konzentration [µmol/l]				
0,0001	-2,2	-7,6	14,5	34,9
0,001	-3,6	-15,6	13,1	27,0
0,01	-15,7	-33,2	1,0	9,3
0,1	-13,1	-38,4	3,6	4,1
1	-19,3	-43,3	-2,6	-0,8

9.1.5 Temozolomid

CCRF-CEM	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA
Temozolomid-Konzentration [µmol/l]				
0,1	-3,3	-5,5	18,0	27,2
1	-3,2	-3,2	18,2	29,5
10	-10,3	-10,1	11,0	22,6
100	-4,0	3,8	17,3	36,5
1000	-18,4	-26,3	2,9	6,4

HL-60	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA
Temozolomid-Konzentration [µmol/l]				
0,1	-3,6	-8,4	11,0	14,5
1	-4,7	-1,3	9,9	21,6
10	-6,5	0,8	8,1	23,7
100	-1,2	0,5	13,3	23,4
1000	-11,4	-18,5	3,1	4,4

MOLT4	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Temozolomid - Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA
0,1	-5,8	-6,3	33,4	54,1
1	-3,6	-4,8	35,6	55,6
10	0,3	0,3	39,6	60,7
100	-8,0	-22,8	31,3	37,6
1000	-35,3	-50,4	3,9	10,0

REH	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Temozolomid- Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA
0,1	-1,2	-4,4	22,9	42,8
1	-0,1	-2,2	23,9	44,9
10	-2,8	-4,7	21,3	42,5
100	-5,7	-16,3	18,4	30,9
1000	-21,2	-42,2	2,8	4,9

DAOY	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Temozolomid- Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA
0,1	-1,5	-8,7	3,0	52,5
1	16,6	9,9	21,1	71,1
10	6,0	4,9	10,5	66,1
100	-4,9	-55,5	-0,4	5,7
1000	-5,4	-59,9	-0,9	1,3

UW228.2	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Temozolomid- Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA
0,1	3,2	1,0	16,1	37,2
1	-0,1	4,7	12,8	40,9
10	2,0	-4,2	14,9	32,0
100	6,4	-21,1	19,3	15,1
1000	-11,5	-34,4	1,4	1,8

MNNG-HOS	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Temozolomid- Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA
0,1	-2,1	-0,7	8,6	29,0
1	-3,5	3,4	7,2	33,1
10	0,9	5,2	11,6	34,9
100	-9,0	-32,8	1,8	-3,1
1000	-10,3	-29,2	0,4	0,5

OST	Additive/ supraadditive Effekte		Antag. Effekte gegenüber dem KC	
Temozolomid- Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA	Temozolomid + 10 mmol/l DCA	Temozolomid + 25 mmol/l DCA
0,1	3,3	5,6	4,3	39,9
1	9,9	1,8	10,9	36,0
10	5,8	3,1	6,8	37,3
100	-1,1	-42,4	-0,1	-8,2
1000	-0,4	-31,7	0,6	2,5