

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger**

**Der Einfluss von Ascorbat, 2-Deoxy-D-Glukose und
Dichlorazetat auf das Wachstum und den
Glukosestoffwechsel von Neuroblastomzellen
mit und ohne N-myc-Amplifikation**

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

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

vorgelegt von

Beate Johanna Eleonore Deubzer

aus

München

2010

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Bruchelt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Fierlbeck

Für Annette, Bernward und Hedwig

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung.....	1
1.1. Ascorbat in der Krebstherapie – ein seit langem umstrittenes Thema	1
1.1.1. Ascorbat – chemische Eigenschaften.....	1
1.1.2. Ascorbat in der Krebsprävention und Krebstherapie – mögliche Wirkmechanismen	5
1.1.3. Ascorbat als Krebsmedikament – der Stand der Forschung	7
1.2. Ascorbat als Prodrug für die Bildung von zytotoxischem Wasserstoffperoxid.....	11
1.2.1. Die zytotoxische Wirkung von hochdosiertem Ascorbat gegenüber Krebszellen <i>in vitro</i>	11
1.2.2. Die Rolle des Ascorbat-Plasmaspiegels <i>in vivo</i>	12
1.2.3. Die Bildung von zytotoxischem Wasserstoffperoxid	13
1.2.4. Die zytotoxische Wirkung von Wasserstoffperoxid	14
1.2.5. Hochdosiertes Ascorbat im Mausmodell	15
1.2.6. Hochdosiertes Ascorbat im klinischen Einsatz	16
1.3. Ascorbat und der Warburg-Effekt	17
1.3.1. Otto Heinrich Warburg	17
1.3.2. Energiegewinnung in der Zelle	17
1.3.3. Der Warburg-Effekt.....	19
1.3.4. Molekulare Grundlagen des Warburg-Effekts.....	20
1.3.5. Der Warburg-Effekt und seine möglichen Vorteile für die Krebszelle.....	26
1.4. Ziel der eigenen Untersuchungen.....	29
1.4.1. 2-Deoxy-D-Glukose als Hemmstoff der Glykolyse.....	30
1.4.2. Indirekte Glykolysehemmung durch niedrig dosiertes Ascorbat	32
1.4.3. Förderung des oxidativen Stoffwechsels durch Dichloressigsäure ..	33

2.	Materialien und Methoden	36
2.1.	Materialien.....	36
2.1.1.	Chemikalien und Enzyme.....	36
2.1.2.	Lösungsmittel und Puffer	36
2.1.3.	Testkits	37
2.1.4.	Neuroblastomzelllinien und Kulturmedien	37
2.1.4.1.	Humane Neuroblastomzelllinien.....	37
2.1.4.2.	Kulturmedien	37
2.1.5.	Verbrauchsmaterial	37
2.1.5.1.	Steriles Verbrauchsmaterial	37
2.1.5.2.	Unsteriles Verbrauchsmaterial	38
2.1.6.	Geräte	38
2.2.	Methoden	39
2.2.1.	Kultivierung von Neuroblastomzellen	39
2.2.2.	Zellzahlbestimmung.....	41
2.2.3.	Kultivierung von Neuroblastomzellen in Anwesenheit von Ascorbat	41
2.2.4.	Behandlung von Neuroblastomzellen mit Ascorbat, Dehydro- Ascorbat, 2-Deoxy-D-Glukose, Wasserstoffperoxid und Dichloressigsäure	43
2.2.4.1.	Behandlung mit Ascorbat oder Dehydroascorbat	43
2.2.4.2.	Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose	45
2.2.4.3.	Behandlung mit Wasserstoffperoxid.....	46
2.2.4.4.	Behandlung mit Dichloressigsäure	47
2.2.4.5.	Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und Wasserstoffperoxid.....	47
2.2.5.	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test	48
2.2.6.	Photometrische Messung von Wasserstoffperoxid nach Thurman...	49
2.2.6.1.	Versuchsansätze	50
2.2.6.2.	Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration.....	51
2.2.7.	Versuche zum Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose auf den zellulären Energiestoffwechsel	52
2.2.8.	Bestimmung von Glukose und Laktat.....	55
2.2.8.1.	Photometrische Glukosebestimmung.....	55

2.2.8.2.	Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose auf die photometrische Glukose-bestimmung.....	57
2.2.8.3.	Photometrische Laktatbestimmung	58
2.2.9.	Bestimmung von Ascorbat.....	60
2.2.9.1.	Bestimmung von Ascorbat in <i>Fetal Calf Serum</i>	60
2.2.9.2.	Stabilität von Ascorbat in der Zellkultur	60
2.2.9.3.	Photometrische Bestimmung von Ascorbat.....	60
3.	Ergebnisse	63
3.1.	Ascorbat als zytotoxisches Agens	63
3.1.1.	MTT-Färbung von Neuroblastomzellen	63
3.1.2.	Kurzzeitbehandlung von Neuroblastomzelllinien mit Ascorbat	65
3.1.2.1.	Kurzzeitbehandlung mit Ascorbat: Orientierungsversuch zur Substanzwirkung	65
3.1.2.2.	Kurzzeitbehandlung mit Ascorbat: Zusammenhang zwischen Substanzwirkung und Zellzahl sowie Substanzwirkung und Vorinkubation mit physiologischen Ascorbatkonzentrationen.....	67
3.1.3.	Kurzzeitbehandlung mit Ascorbat im Vergleich zu Dehydro- ascorbat.....	72
3.1.4.	Behandlung von Suspensionskulturen mit Wasserstoffperoxid	73
3.1.4.1.	Photometrische Bestimmung von Wasserstoffperoxid	73
3.1.4.2.	Produktion von Wasserstoffperoxid durch Glukose-Oxidase.....	74
3.1.4.3.	Entgiftung von Wasserstoffperoxid durch Kelly- und SK-N-SH- Zellen nach Zugabe im Bolus	77
3.1.4.4.	Entgiftung von kontinuierlich gebildetem Wasserstoffperoxid	80
3.1.5.	Kurzzeitbehandlung von Neuroblastomzelllinien mit Wasserstoffperoxid	82
3.1.5.1.	Kurzzeitbehandlung mit Wasserstoffperoxid: Orientierungsversuch zur Substanzwirkung	82

3.1.5.2.	Kurzzeitbehandlung mit Wasserstoffperoxid: Zusammenhang zwischen Substanzwirkung und Zellzahl	84
3.1.5.3.	Kurzzeitbehandlung mit Wasserstoffperoxid: Zusammenhang zwischen Substanzwirkung und Inkubationszeit.....	87
3.2.	Ascorbat als Modulator des zellulären Energiestoffwechsels	89
3.2.1.	Glukose und Laktat in RPMI 1640	90
3.2.2.	Langzeitbehandlung von Neuroblastomzelllinien mit Ascorbat.....	90
3.2.2.1.	Ascorbat im Zellkulturmedium	90
3.2.2.2.	Stabilität von Ascorbat in der Zellkultur	91
3.2.2.3.	Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen in Anwesenheit von Ascorbat im Zellkulturmedium.....	91
3.2.3.	Kurzzeitbehandlung von Neuroblastomzelllinien mit 2-Deoxy-D-Glukose	94
3.2.3.1.	Kurzzeitbehandlug mit 2-Deoxy-D-Glukose: Orientierungsversuch zur Substanzwirkung	94
3.2.3.2.	Kurzzeitbehandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose: Vergleich von Zellen aus ascorbatfreiem und ascorbathaltigem Zellkulturmedium.....	96
3.3.3.	Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose auf den Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen.....	98
3.3.3.1.	Bestimmung von Glukose in Anwesenheit von 2-Deoxy-D-Glukose	98
3.3.3.2.	Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen in Anwesenheit von 2-Deoxy-D-Glukose	99
3.3.3.2.1.	Glukose- und Laktatstoffwechsel sowie Sauerstoffverbrauchsraten bei Inkubation der Neuroblastomzellen in PBS ⁺⁺ mit Glukose.....	99
3.3.3.2.2.	Glukose- und Laktatstoffwechsel sowie Sauerstoffverbrauchsraten bei Inkubation der Neuroblastomzellen in RPMI 1640.....	108
3.3.4.	Kurzzeitbehandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und Wasserstoffperoxid	112
3.3.4.1.	Kurzzeitbehandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und Wasserstoffperoxid im micromolaren Konzentrationsbereich.....	112

3.3.4.2.	Kurzzeitbehandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und Wasserstoffperoxid im millimolaren Konzentrationsbereich	114
3.3.5.	Behandlung von Kurzzeitkulturen mit Dichloressigsäure.....	115
3.3.5.1.	Energiestoffwechsel in Anwesenheit von Dichloressigsäure	115
3.3.5.2.	Kurzzeitbehandlung mit Dichloressigsäure.....	117
4.	Diskussion	118
4.1.	Ascorbat als „ <i>prodrug</i> “ für die Bildung von zytotoxischem Wasserstoffperoxid.....	119
4.2.	Der Warburg-Effekt und die Beeinflussung der Glykolyse Substanzen	124
5.	Zusammenfassung	132
6.	Abkürzungen	135
7.	Abbildungen	139
8.	Tabellen.....	143
9.	Literatur	144
10.	Anhang	151
11.	Danksagung	171
12.	Curriculum Vitae.....	172

1. Einleitung

1.1. Ascorbat in der Krebstherapie – ein seit langem umstrittenes Thema

Die Rolle von Ascorbat in der Krebstherapie wird seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Kaum ein anderes Thema in der medizinischen Forschung ist ähnlich umstritten. Ob das Molekül „nur“ für eine optimale Funktion körpereigener Abwehrmechanismen gegen Krebs von Bedeutung ist oder als Krebsmedikament im engeren Sinn eingesetzt werden kann – die Meinungen in Forschung und Öffentlichkeit gehen weit auseinander.

1.1.1. Ascorbat – chemische Eigenschaften

Nomenklatur

In der Biochemie werden die Begriffe L-(+)-Ascorbinsäure und Ascorbat synonym verwendet, wobei Ascorbat im engeren Wortsinn das Salz bzw. die dissoziierte Form der L-(+)-Ascorbinsäure beschreibt. Im Folgenden wird vorwiegend die Bezeichnung Ascorbat sowie deren Abkürzung AA (*ascorbic acid*) gebraucht.

Vitamin C hingegen ist eine Sammelbezeichnung für Ascorbat, Ascorbylradikal und Dehydroascorbinsäure.

Chemische Struktur

Ascorbat besitzt die chemische Summenformel $C_6H_8O_6$ (**Abb. 1.**).

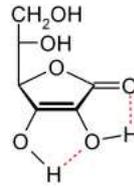


Abb. 1.: Ascorbat ($C_6H_8O_6$)

Das chemische Verhalten des Moleküls wird durch verschiedene Strukturelemente bestimmt. Hier ist vor allem die Endiol-Struktur von Bedeutung. Sie bedingt aufgrund ihrer leichten Oxidierbarkeit zum Diketon die reduzierenden Eigenschaften von Ascorbat (**Abb. 2.**). Zudem bildet sie die Grundlage für dessen beträchtliche Acidität ($pK_s = 4,2$).

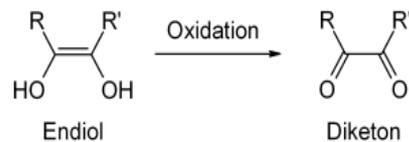


Abb. 2.: Oxidation vom Endiol zum Diketon

Antioxidative und prooxidative Eigenschaften

Ascorbat kann im menschlichen Organismus als Reduktionsmittel fungieren und besitzt entsprechend meist eine antioxidative Wirkung.

Bei Reaktion zur L-Dehydroascorbinsäure werden formal zwei Wasserstoffradikale abgespalten (**Abb. 3.**).

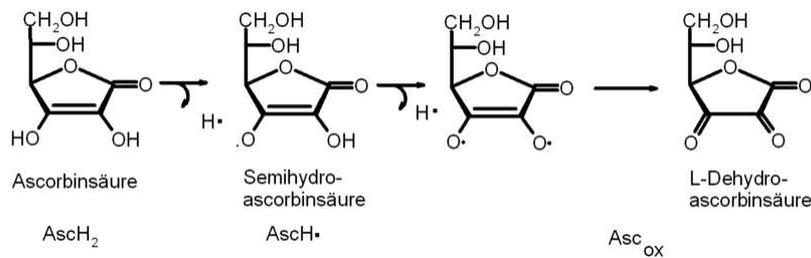
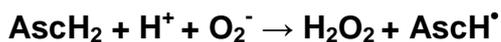


Abb. 3.: Reaktion von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure unter Freisetzung von zwei Wasserstoffradikalen

Diese sind ihrerseits in der Lage, Fremdradikale abzufangen. So kann beispielsweise im Verlauf des Stoffwechsels entstehendes, zellschädigendes Superoxid O₂⁻ durch Reaktion mit Ascorbat in Wasserstoffperoxid überführt und anschließend mit Hilfe des Enzyms Katalase entgiftet werden (**siehe 1.2.3.**):



Darüber hinaus ist Ascorbat in der Lage, ein stabiles Enolat anion zu bilden. Dieses kann formal ein Hydrid anion auf andere Spezies übertragen (**Abb. 4.**). Aufgrund dieser Fähigkeit dient Ascorbat im menschlichen Stoffwechsel als Co-Faktor für verschiedene enzymatische (Redox-)Reaktionen. Am bekanntesten ist wohl seine Rolle als Co-Faktor von Prolyl-Hydroxylasen, welche die Umwandlung von Prolin zu Hydroxyprolin für die Kollagenbiosynthese katalysieren und darüber hinaus am Abbau von HIF-1α beteiligt sind (**siehe 1.4.2.**).

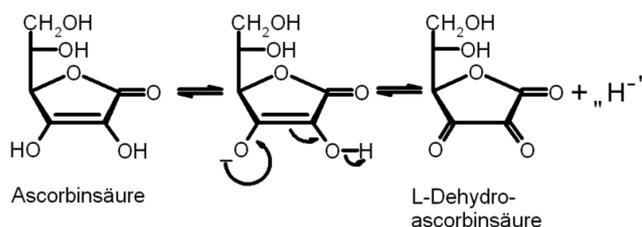


Abb. 4.: Umsetzung von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure unter formaler Freisetzung eines Hydrid anions

Auf der anderen Seite besitzt Ascorbat eine prooxidative Wirkung.

So beruht die Zytotoxizität von Wasserstoffperoxid hauptsächlich auf der Fenton-Reaktion, bei der Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Fe^{2+} zu hochreaktiven Hydroxylradikalen umgesetzt wird:



Freies Eisen ist meist nur in Spuren vorhanden und oxidiert leicht zu Fe^{3+} . AA kann durch stetige Reduktion – auch von sehr geringen Mengen – Fe^{3+} zu Fe^{2+} dazu führen, dass eine kontinuierliche Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Hydroxylradikalen erfolgt:



Die ständige Anflutung von Hydroxylradikalen führt zu einem gesteigerten oxidativen Stress in der Zelle.

Aufnahme in die Zelle

Zur Aufnahme von Ascorbat in eukariotische Zellen stehen zwei unterschiedliche Transportsysteme zur Verfügung.

Der größte Teil des AA gelangt als Dehydroascorbat mit Hilfe von passiver Diffusion durch die Glukosetransporter GLUT 1 und GLUT 3 (Rumsey et al. 1997) sowie GLUT 4 (Rumsey et al. 2000) in den Intrazellularraum. Dort erfolgt die Rückreduktion zu Ascorbat (Rumsey et al. 1997).

Einige Zelltypen verfügen außerdem über spezifische, Na^+ -abhängige Ascorbat-Transportsysteme, die als SVCT1 und SVCT2 bezeichnet werden (Daruwala et al. 1999).

Ascorbat in einem biologischen System

Ascorbat kann zeitgleich in unterschiedlicher Funktion und an unterschiedlichen Stellen in den Stoffwechsel von Zellen eingreifen (Bruchelt und Kuçi

2007). Wie beschrieben dient die Substanz als Co-Faktor für verschiedene enzymatische Reaktionen, kann mit vielen anderen Redoxsystemen im Stoffwechsel interagieren und je nach Umgebungsbedingungen sowohl als Antioxidans als auch als Prooxidans fungieren. Seine in einem biologischen System schwer zu überblickende Rolle ist sicherlich ein Grund für die intensive Debatte um einen möglichen Einsatz in der Krebstherapie

1.1.2. Ascorbat in der Krebsprävention und Krebstherapie – mögliche Wirkmechanismen

Ascorbat und seine Bedeutung für die körpereigene Krebsabwehr

Ein ausreichendes Vorhandensein von Ascorbat ist für die optimale Funktion verschiedener körpereigener Abwehrmechanismen essentiell.

Ein wichtiger Teil der körpereigenen Krebsabwehr ist das Immunsystem, das potentiell Krebs verursachende Viren sowie entartete Zellen beseitigen kann (Cameron 1982):

Sowohl für das zelluläre als auch das humorale Immunsystem scheint Ascorbat von Bedeutung zu sein. Ascorbat ist für die Immunkompetenz von Lymphozyten sowie das Komplementsystem wichtig. Die Produktion von verschiedenen Abwehr- und Botenstoffen wie Immunglobulinen, Prostaglandinen und Interferon (**siehe unten**) steht ebenfalls in Zusammenhang mit Ascorbat.

Als Co-Faktor der Kollagenbiosynthese ist Ascorbat für die Ausbildung einer maximalen mechanischen Stabilität von Geweben entscheidend. Diese ermöglicht die Bildung von effizienten Barrieren gegen die Invasion durch maligne Zellen sowie die Abkapselung bereits bestehender Tumoren.

Die Bildung des glykolytischen Enzyms Phosphohexoisomerase (PHI), das die Umwandlung von Glukose-6-Phosphat in Fructose-6-Phosphat katalysiert, ist ebenfalls an Ascorbat gebunden. PHI tritt bei malignen Erkrankungen in erhöhten Konzentrationen im Plasma auf und wirkt als *feed-back*-Inhibitor gegen vom Tumor abgesonderte Enzyme, die die „Ernährung“ und Metastasierung des Tumors erleichtern.

Krebspatienten weisen meist im Vergleich zu gesunden Personen erniedrigte Ascorbat-Spiegel in Serum und Leukozyten auf. Eine ausreichende Ascorbat-Aufnahme zur Unterstützung körpereigener Abwehrmechanismen könnte für sie von umso größerer Bedeutung sein.

Ascorbat als Stimulans der Interferon-Bildung

Zu Beginn der 1980er Jahre wurde β -Interferon, ein körpereigener Abwehrstoff, in der Öffentlichkeit als neue „Wunderwaffe“ gegen Krebs gehandelt. Positive Ergebnisse aus *in-vitro*-Versuchen an menschlichen Krebszellen sowie Tierversuche gaben Anlass zur Hoffnung. In klinischen Studien – getestet wurden Patienten mit multiplem Myelom und Brustkrebs – war Interferon den herkömmlichen Therapien jedoch nicht überlegen.

Für besonderes Aufsehen auch in der nichtwissenschaftlichen Presse sorgte ein Fallbericht aus der Tübinger Universitäts-Kinderklinik. So titelte die Zeitschrift „Der Spiegel“ in der Ausgabe vom 9. Juni 1980: „Interferon gegen Krebs – Was ist dran?“. In Tübingen war ein Junge mit nasopharyngealem Karzinom in fortgeschrittenem Stadium mit β -Interferon behandelt worden (Treuner et al. 1980). Der Erfolg war erstaunlich: noch ein Jahr später war der Patient frei von Symptomen und Beschwerden.

β -Interferon kann heute problemlos gentechnisch hergestellt werden, war zur damaligen Zeit aber ungemein schwer zu gewinnen. Umso mehr Bedeutung wurde Berichten beigemessen, denen zufolge Ascorbat die endogene β -Interferon-Produktion fördern kann.

Ascorbat als Antioxidans

Ein Mechanismus der Krebsentstehung ist vermutlich die Schädigung von Zellbestandteilen vor – allem der DNA – durch freie Radikale und andere oxidierende Substanzen (Henson et al. 1991). Ascorbat als Antioxidans und Fänger von freien Radikalen ist möglicherweise in der Lage, diese für den Körper schädlichen Substanzen zu entgiften und so präventiv gegen Krebs zu wirken.

Ascorbat als Adjuvans zu bestehenden Therapieschemata

Auch die begleitende Gabe von Ascorbat zu bewährten Therapieschemata könnte von Vorteil sein (Henson et al. 1991).

So soll Ascorbat – vor einer Strahlentherapie verabreicht – einen protektiven Effekt auf Haut und Knochenmark haben ohne die erwünschte Wirkung auf den Tumor zu verringern.

Als Adjuvans gegeben konnte Ascorbat bei Mäusen mit transplantierten B16-Melanomen die Wirkung einer Therapie mit Levodopa-Methylester verbessern sowie, wie im Fall von Doxorubicin, die Toxizität von Chemotherapeutika gegenüber gesunden Geweben verringern.

1.1.3. Ascorbat als Krebsmedikament – der Stand der Forschung

Seit Jahrzehnten werden immer wieder Studien zur Wirkung von Ascorbat gegen Krebs durchgeführt. Der Gedanke an Ascorbat als Krebsmedikament ist reizvoll. Ist es doch eine gut verfügbare und außerordentlich billige Substanz, von der – verglichen mit vielen etablierten Chemotherapeutika – im Normalfall keine gravierenden Nebenwirkungen zu erwarten sind (Cameron 1991).

Bisher konnten jedoch weder Versuche an Zellkulturen oder Tieren noch klinische Studien eine Ascorbatwirkung gegen Krebs beweisen, geschweige denn den Wirkmechanismus aufklären. Auf der anderen Seite konnte die These einer Wirkung von Ascorbat gegen Krebs bis heute nicht definitiv widerlegt werden.

Die schwierige Interpretation von Zellkulturversuchen

Zellkulturversuche mit Ascorbat sind schwer zu beurteilen, da Ascorbat als Redox-System in vielfältiger Weise in verschiedene Stoffwechselprozesse eingreifen kann (**siehe 1.1.1.**).

Als Beispiel sei hier eine Studie der *Texas Tech University* an Leukämiezellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie oder myelodysplastischem Syndrom genannt (Henson et al. 1991). Die Zellen einer Zellkultur reagierten

nicht einheitlich auf Ascorbat, sondern konnten durch Ascorbat sowohl gehemmt als auch stimuliert werden oder unbeeinflusst bleiben.

Zu den Schwierigkeiten bei der Interpretation kommt die allgegenwärtige Frage, ob und inwiefern sich Ergebnisse aus Versuchen an Zellkulturen und Tieren auf die Situation im menschlichen Körper übertragen lassen (Bruchelt und Kuçi 2007).

Tierversuche

Linus Pauling (**siehe unten**) führte zwei groß angelegte Tierversuchsreihen durch, in denen er Mäuse – die selbst erhebliche Mengen an Ascorbat produzieren – mit hochdosiertem Ascorbat (bis zu 10 g Ascorbat pro Kilogramm Körpergewicht) behandelte (Henson et al. 1991).

In der ersten Studie wurden Nacktmäuse einer UV-Bestrahlung unterzogen. Mit Ascorbat behandelte Tiere entwickelten deutlich weniger Hauttumoren als die unbehandelte Kontrollgruppe.

In einer zweiten Studie wurde R III/ Imr-Mäusen, die sich durch ein gehäuftes Auftreten von spontanen Mamma-Karzinomen auszeichnen, Ascorbat verabreicht. Bei den behandelten Tieren traten wiederum deutlich weniger spontane Brusttumoren auf als bei der unbehandelten Kontrollgruppe.

Weitere Tierversuche an Mäusen und Hamstern schienen diese Beobachtungen – auch für andere Krebsarten – zu bestätigen.

Einzelfallberichte und umstrittene klinische Studien

Immer wieder wurde über Krebspatienten berichtet, die erfolgreich mit Ascorbat behandelt worden waren (Cameron und Campbell 1991).

So bestätigten laut Statistik im Jahr 1991 33 von 46 epidemiologischen Studien einen positiven Effekt von Ascorbat auf die Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen (Henson et al. 1991).

Systematische klinische Studien konnten die Frage nach einem möglichen Einsatz von Ascorbat in der Krebstherapie bisher jedoch nicht klären.

Ende der 1970er Jahre behandelten Ewan Cameron, schottischer Arzt, und Linus Pauling (**siehe unten**) eine Gruppe von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen in fortgeschrittenem Stadium mit Hochdosis-Ascorbat (Cameron und Pauling 1976). Das Therapieschema sah zu Beginn eine i.v.-Behandlung mit 10 g Ascorbat pro Tag vor, die nach zehn Tagen auf dieselbe orale Dosis umgestellt wurde (Cameron 1991). Gegenüber einer zum Vergleich herangezogenen, historischen Kontrollgruppe wiesen die mit Ascorbat behandelten Patienten eine deutlich längere Lebenserwartung auf (Cameron und Pauling 1976).

Wenngleich Pauling und Cameron kurze Zeit später eine in der statistischen Methodik verbesserte Auswertung der Studie veröffentlichten (Cameron und Pauling 1978), wurde die Studie aufgrund fehlender „Verblindung“ sowie dem Vergleich mit einer „per Hand“ ausgewählten, historischen Kontrollgruppe scharf kritisiert (Barinaga 1991).

In den folgenden Jahren konnten zwei weitere – ebenfalls umstrittene – Studien die positiven Ergebnisse von Cameron und Pauling nicht bestätigen (Wittes 1985).

Wiederum wurden Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen einer Hochdosisbehandlung mit 10 g Ascorbat täglich unterzogen (Creagan et al. 1979; Moertel et al. 1985). Die Ascorbatbehandlung erfolgte in beiden Studien ausschließlich *per os*. Das Studiendesign war durch doppelte „Verblindung“ und Randomisierung gegenüber Paulings' Studie aus dem Jahr 1976 deutlich verbessert. Die mit Hochdosis-Ascorbat behandelten Personen wiesen weder hinsichtlich ihrer Lebenserwartung noch ihres körperlichen Zustandes signifikante Vorteile gegenüber der Kontrollgruppe auf.

Linus Pauling

Der zweifache Nobelpreisträger Linus Pauling gilt als bedeutendster Biochemiker der 2. Hälfte des 20. Jahrhunderts (**Abb. 5.**). Auch er beschäftigte sich mit einem möglichen Einsatz von Ascorbat als Krebsmedikament.

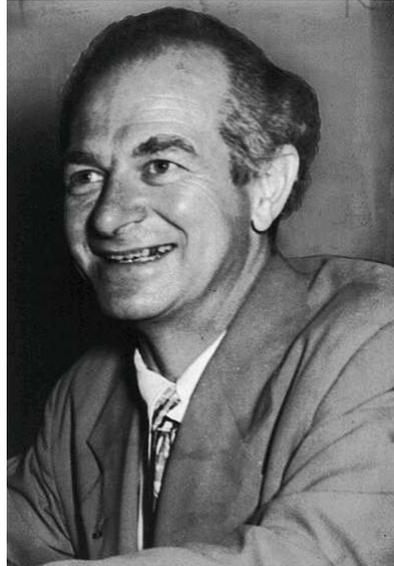


Abb. 5.: Linus Pauling um 1954

In den frühen Jahren seiner wissenschaftlichen Tätigkeit arbeitete Pauling auf dem Gebiet der Quantenchemie sowie über das Konzept der Elektronegativität, die Struktur von Kristallen und die chemische Bindung.

In der Folgezeit weckten biologische Moleküle, vor allem Proteine und ihre Struktur, Paulings Interesse. So beschäftigte er sich mit der Struktur und Pathologie von Hämoglobin sowie Antikörpern und deren synthetischer Herstellung. Er postulierte einen helicalen Aufbau von Proteinen, der zur Grundlage der Entdeckung der Doppelhelixstruktur der DNA durch Watson und Crick werden sollte.

Für seine Arbeit über chemische Bindungen wurde Linus Pauling 1954 der Nobelpreis für Chemie verliehen. Für seinen unermüdlichen Einsatz gegen Atomwaffentests erhielt er 1962 den Friedensnobelpreis. Somit wurde Pauling neben Marie Curie zum einzigen Menschen, der einen Nobelpreis auf mehr als einem Gebiet erhielt.

Paulings späte Arbeiten über die Wirkung von Ascorbat sorgten immer wieder für Kontroversen. Pauling war von der Wirkung von Ascorbat gegen die verschiedensten Krankheiten bis hin zu Krebs überzeugt. Er führte verschiedene Tierversuchsreihen sowie klinische Studien zum Thema durch. Hierzu

zählt auch die umstrittene klinische Studie zur Hochdosis-Ascorbatbehandlung von Tumorpatienten (**siehe oben**).

Pauling nahm täglich Megadosen von ca. 18 g Ascorbat zu sich, bis er im hohen Alter von 93 Jahren einem Tumorleiden erlag.

Die gegenwärtige Situation

Sich über Jahre abwechselnde Erfolgs- und Misserfolgsmeldungen sorgten in der Öffentlichkeit für Verunsicherung. Als Konsequenz setzten viele Krebspatienten ihre letzte Hoffnung auf Ascorbat. So behandelten sich im Jahr 1991 in den USA geschätzte 100.000 Krebspatienten – oft in Eigenregie – mit Ascorbat (Cameron 1991).

Die Debatte erhielt überdies oft eine emotionale, von persönlichen Überzeugungen geprägte Färbung und wurde für Auseinandersetzungen zwischen Schul- und Alternativmedizin herangezogen.

Dies ging so weit, dass manche Forscher aus Angst um ihren wissenschaftlichen Ruf das Gebiet mieden (Barinaga 1991). In den letzten Jahren wurde es ruhiger um das Thema „Ascorbat und Krebs“.

1.2. Ascorbat als Prodrug für die Bildung von zytotoxischem Wasserstoffperoxid

Aktuell lenken drei Veröffentlichungen aus der Arbeitsgruppe des renommierten Vitamin-C-Forschers Mark Levine am *NIH* in *Bethesda*, USA, das Interesse in Forscherkreisen ein weiteres Mal auf das Thema Ascorbat und Krebs.

1.2.1. Die zytotoxische Wirkung von hochdosiertem Ascorbat gegenüber Krebszellen *in vitro*

Die Forscher konnten eine *in-vitro*-Zytotoxizität von millimolarem Ascorbat (bis 20 mmol/l) gegenüber Krebszellen verschiedener solider Tumoren zeigen (Chen et al. 2005). Diese zytotoxische Wirkung wurde zunächst für humane Lymphom- (JLP 119-Zelllinie) und Mamma-Karzinom-Zelllinien (MCF7, MB231,

Hs587t) sowie murine Lungen- (KLN 205, LL/2), Nieren- (RAG), Colon- (CT26) und Melanom (B16)-Zelllinien nachgewiesen. In einer Folgearbeit zeigte sich eine große Anzahl humaner, muriner und Rattenkrebszelllinien sensibel gegenüber einer Behandlung mit hochdosiertem Ascorbat (Chen et al. 2008).

Nicht entartete humane Zellen (Hs587Bst-Mamma-Zellen, CCD34SK-Fibroblasten, Lymphozyten und Monozyten) hingegen zeichneten sich bei Vorliegen entsprechender Ascorbatkonzentrationen nicht durch eine erhöhte Apoptose- und Nekroserate aus (Chen et al. 2005).

1.2.2. Die Rolle des Ascorbat-Plasmaspiegels *in vivo*

Die Ascorbat-Konzentrationen in Plasma und Extrazellulärmilieu hängen stark von der Art der Substanzzufuhr ab. Erst in den letzten Jahren wurde systematisch untersucht, welche Ascorbat-Plasmaspiegel sich bei unterschiedlicher Verabreichung erzielen lassen.

Millimolare Ascorbatkonzentrationen im Plasma und Extrazellulärmilieu – für die *in vitro* eine zytotoxische Wirkung gegenüber Krebszellen gezeigt wurde (**siehe 1.2.1.**) – können nur durch intravenöse oder intraperitoneale Gabe der Substanz erreicht werden (Chen et al. 2007). Durch intravenöse Gabe von hochdosiertem Ascorbat (0,5 mg pro Kilogramm Körpergewicht) konnten bei Ratten problemlos Plasmaspiegel von über 8 mmol/l erzielt werden.

Bei oraler Aufnahme der Substanz – auch großer Mengen – werden maximale Plasmaspiegel von ca. 220 µmol/l nicht überschritten (Chen et al. 2005). Normalerweise liegt beim Menschen ein Ascorbatplasmaspiegel von ca. 60 µmol/l vor, der durch verschiedene biologische Mechanismen streng kontrolliert wird (Chen et al. 2007). Hierzu zählen sowohl eine begrenzte intestinale Aufnahme als auch die Sättigung des Ascorbattransporters SVCT2 im Gewebe und die renale Ausscheidung „überschüssigen“ Ascorbats.

Vor diesem Hintergrund erscheinen die widersprüchlichen Ergebnisse der klinischen Studien zur Hochdosisascorbat-Behandlung von Krebspatienten plausibel (**siehe 1.1.3.**). Aufgrund der unterschiedlichen Art der Ascorbatzufuhr

wurden von Studie zu Studie unterschiedliche Ascorbatplasmaspiegel erreicht und die Studienergebnisse lassen sich nicht vergleichen.

Interessant erscheint jedoch, dass die einzige Studie, die über einen positiven Ascorbat-Effekt berichtet, gleichzeitig die einzige Studie ist, in der die Substanz intravenös verabreicht und entsprechend hohe Plasmakonzentrationen erreicht wurden.

1.2.3. Die Bildung von zytotoxischem Wasserstoffperoxid

Die zytotoxische Wirkung wird vermutlich über die Bildung von Wasserstoffperoxid aus extrazellulärem Ascorbat vermittelt (Chen et al. 2005) (**Abb. 6.**).

Die Reaktion erfolgt *in vivo* nach Diffusion von Ascorbat aus dem Plasma in den Extrazellulärraum und wird vermutlich durch bisher unbekannte, 10 bis 30 kD große Proteine katalysiert (Chen et al. 2007). Es wird postuliert, dass diese Proteine im Proteinzentrum über Redox-aktive Metalle verfügen, die an der Oxidation von Ascorbat zu Ascorbylradikal und der sich anschließenden Bildung von Superoxid und Wasserstoffperoxid beteiligt sind (Chen et al. 2005).

Übereinstimmend mit dieser Vermutung konnten die Forscher in der Extrazellulärflüssigkeit von Ratten nach parenteraler Gabe der Substanz in Abhängigkeit von der Ascorbatkonzentration bis zu 250 nmol/l Ascorbylradikal nachweisen (Chen et al. 2007). Wasserstoffperoxid wurde in der Extrazellulärflüssigkeit nur nach parenteraler Ascorbatgabe sowie bei Vorliegen von mehr als 100 nmol/l Ascorbylradikal detektiert.

In vitro wird die Wasserstoffperoxid-Bildung anscheinend durch denselben Mechanismus vermittelt: Die für die Wasserstoffperoxid-Bildung benötigten Proteine sind vermutlich im Zellkulturmedium enthalten, das zu einem gewissen Prozentsatz aus Serum besteht. Entsprechend konnte auch nach Zugabe von Ascorbat zum Zellkulturmedium (0,5 – 10 % Serum) Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden (Chen et al. 2005).

Es ist anzunehmen, dass gewisse Mengen an Wasserstoffperoxid bereits im Blut entstehen. Eine Akkumulation ist jedoch nicht zu erwarten, da die Substanz unmittelbar durch verschiedene Systeme in den Erythrozyten entgiftet wird. Von

Bedeutung sind vor allem das Glutathion-System (**Abb. 12.**) sowie der Abbau von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff durch das Enzym Katalase.

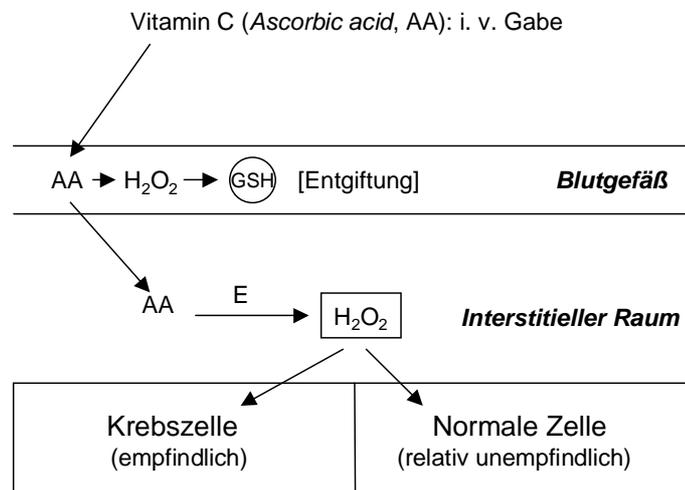


Abb. 6.: Vorstellung zur Bildung von H_2O_2 aus Ascorbat nach intravenöser Applikation. In der Blutbahn wird eine mögliche Anreicherung von H_2O_2 durch Serum bzw. durch das Glutathion (GSH)-System und durch die Katalase der Erythrozyten verhindert. Nach dem Übergang des Ascorbats in den interstitiellen Raum kommt es unter Katalyse eines wahrscheinlich ca. 10 – 30 KD großen Proteins (Enzyms, E) zur Bildung von H_2O_2 , das dann als zytotoxisches Agens selektiv (bevorzugt) Krebszellen abtöten kann.

1.2.4. Die zytotoxische Wirkung von Wasserstoffperoxid

Für Wasserstoffperoxid als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden verschiedene intrazelluläre Mechanismen einer zytotoxischen Wirkung angenommen, die allesamt zur Verarmung der Zelle an ATP beitragen und damit letztlich zum Zelltod führen (Chen et al. 2007):

Die Entgiftung von intrazellulärem Wasserstoffperoxid erfolgt durch Oxidation von Glutathion (GSH) zu Glutathion-Disulfid (GSSG) (**Abb. 12.**). Zur Regeneration von GSH werden gesteigerte Mengen an $NADPH+H^+$ aus dem Pentosephosphatweg benötigt (**Abb. 11.**). Eine Steigerung des Pentosephosphatwegs

führt automatisch zu einem Sinken der Glykolyserate und dadurch zu einem verminderten ATP-Gewinn.

Die Reparatur von durch Wasserstoffperoxid verursachten Schäden im Zellinneren zieht ebenfalls einen verminderten glykolytischen ATP-Gewinn nach sich. Wasserstoffperoxid verursacht Einzelstrangbrüche an der DNA, die mit Hilfe des Enzyms Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) repariert werden müssen. Das Enzym arbeitet unter Verbrauch von NAD^+ , was über eine Limitierung des NAD^+ -Angebots zu einer verminderten Glykolyserate beiträgt.

Mitochondrien von Krebszellen weisen möglicherweise eine erhöhte Sensibilität gegenüber Wasserstoffperoxid auf.

Entsprechend sinkt in Anwesenheit der Substanz neben der glykolytischen Energiegewinnung auch die ATP-Gewinnung über die oxidative Phosphorylierung.

Über die beschriebenen intrazellulären Mechanismen hinaus werden extrazelluläre Mechanismen einer zytotoxischen Wirkung von Wasserstoffperoxid diskutiert (Chen et al. 2005). So verursacht die Substanz möglicherweise Schäden an den Lipiden der Zellmembran.

1.2.5. Hochdosiertes Ascorbat im Mausmodell

Kürzlich konnten im Tierversuch *in vivo* erste erfolgversprechende Ergebnisse zum Einsatz von hochdosiertem Ascorbat zur Krebstherapie erzielt werden.

Nacktmäuse (Ncr-nu/nu) mit transplantierten Ovarialkarzinomen (Ovcar5), Pankreaskarzinomen (Pan02) oder Glioblastomen (9L) wurden intraperitoneal mit hochdosiertem Ascorbat (4 g/ kg Körpergewicht) behandelt (Chen et al. 2008). Tumorgewicht und Tumorwachstum konnten durch diese Behandlung um ca. 40 – 50 % reduziert werden. Eine zytotoxische Wirkung der Substanz gegenüber gesundem Gewebe wurde nicht beobachtet.

1.2.6. Hochdosiertes Ascorbat im klinischen Einsatz

Auch im klinischen Einsatz am Menschen sind von einer Hochdosis-Ascorbatbehandlung im Vergleich zu den meisten eingesetzten Chemotherapeutika keine gravierenden Nebenwirkungen zu erwarten.

In vitro zeigten gesunde Zellen eine – bisher nicht plausibel erklärte – höhere Resistenz gegenüber hochdosiertem Ascorbat (**siehe 1.2.1.**). Vermutet wird, dass gesunde Zellen auf ein durch Wasserstoffperoxid vermitteltes Sinken der glykolytischen Energiewinnung (**siehe 1.2.4.**) weniger sensibel reagieren als entartete Zellen (Chen et al. 2007) (**siehe 1.3.3.**). Auch eine höhere Resistenz der Mitochondrien von gesunden Zellen gegenüber Wasserstoffperoxid wird diskutiert.

In vivo traten bei einer intravenösen Hochdosis-Ascorbatbehandlung – wie sie in der Alternativmedizin relativ häufig ist – bisher keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf.

Kontraindiziert ist die Substanz nach heutigem Wissensstand lediglich bei Patienten mit Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel (Chen et al. 2005). Diese Patienten verfügen aufgrund einer Störung im Pentosephosphatweg über verminderte Kapazitäten zur Bildung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ und folglich eingeschränkte Fähigkeiten zur Regeneration von GSH, das unter anderem zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid benötigt wird. Vor dem Hintergrund der von *Chen et al.* postulierten These einer Wasserstoffperoxid-vermittelten Zytotoxizität von hochdosiertem Ascorbat erscheint es plausibel, dass es bei Patienten mit Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel nach intravenöser Gabe von hochdosiertem Ascorbat zur intravasalen Hämolyse kommt.

Eine relative Kontraindikation zur Gabe von hochdosiertem Ascorbat könnte darüber hinaus die Neigung zur Bildung von Oxalat-Nierensteinen sein.

1.3. Ascorbat und der Warburg-Effekt

1.3.1. Otto Heinrich Warburg

Otto Heinrich Warburg, deutscher Biochemiker und Arzt, gilt als bedeutendster Biochemiker der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts (Garber 2004) (**Abb. 7.**).



Abb. 7.: Otto Heinrich Warburg um 1931

Zu Warburgs bekanntesten Arbeiten zählen diejenigen zur mitochondrialen Atmungskette und zur Photosynthese der Pflanzen sowie zum Stoffwechsel von Tumoren (http://de.wikipedia.org/wiki/Otto_Heinrich_Warburg#_note-1). Für „die Entdeckung der Natur und der Funktion des Atmungsferments“, heute als Cytochrom-C-Oxidase bekannt, wurde Warburg 1931 der Nobelpreis für Medizin verliehen. Seine Erkenntnisse über den Stoffwechsel von Krebszellen, bekannt als Warburg-Effekt (**siehe 1.3.3.**), sind bis heute Gegenstand der Forschung.

1.3.2. Energiegewinnung in der Zelle

Zellen gewinnen ihre für Überleben und Wachstum benötigte Energie aus Adenosintriphosphat (ATP). Zur Herstellung von ATP dient der Abbau von Glukose und anderen energiereichen Substraten.

In einer im Zytosol lokalisierten enzymatischen Reaktionskette, der Glykolyse, wird Glukose zu Pyruvat umgesetzt.

Unter anaeroben Bedingungen schließt sich die zytosolische Umwandlung von Pyruvat zu Laktat an. Dieser Reaktionsschritt wird durch das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert und dient zur Reoxidation von

NADH+H⁺, das für den weiteren Ablauf der Glykolyse als Oxidationsmittel benötigt wird. Über diesen Reaktionsweg, die anaerobe Glykolyse, werden pro Molekül Glukose zwei Moleküle ATP gewonnen (**Abb. 8.**).

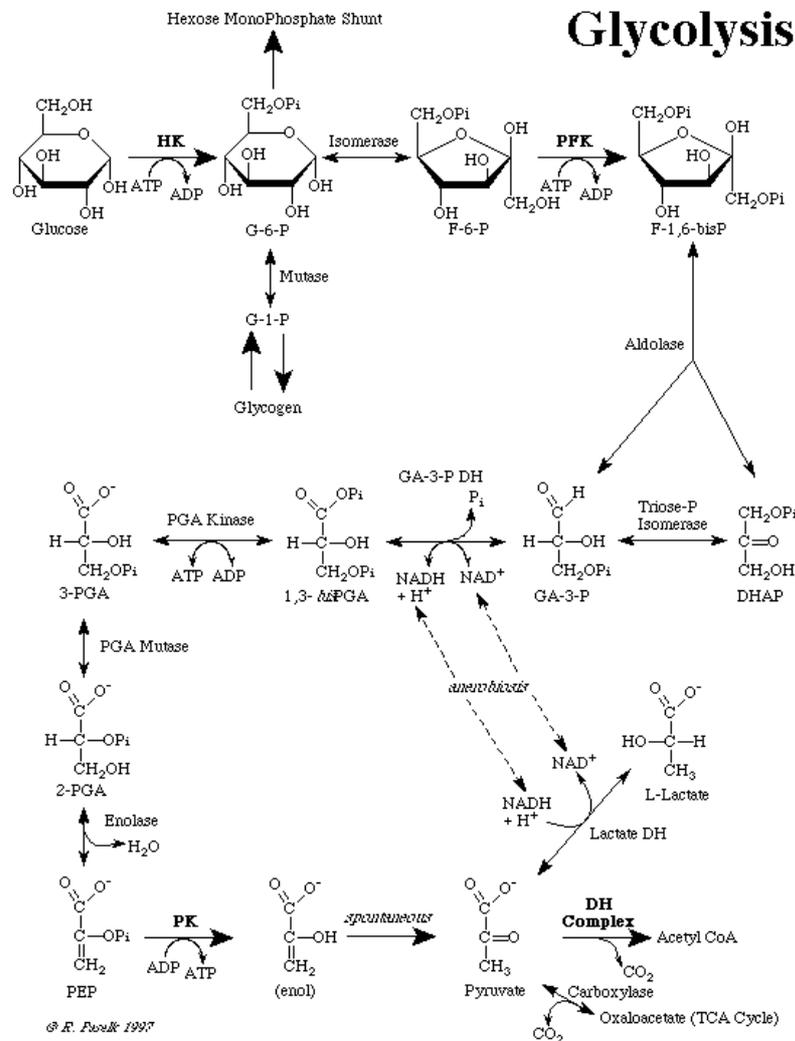


Abb. 8.: Glykolyse. Das in der Glykolyse entstandene Pyruvat wird unter anaeroben Bedingungen zu Laktat abgebaut (anaerobe Glykolyse), unter aeroben Bedingungen mit Hilfe des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes zu Acetyl-CoA verstoffwechselt und für die weitere Energiegewinnung mittels oxidativer Phosphorylierung genutzt.

Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat mit Hilfe des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes zu Acetyl-CoA umgesetzt, das im mitochondrialen Zitrat-

zyklus anschließend zu CO_2 abgebaut wird. Die dabei freiwerdende Energie wird durch Reduktion der Coenzyme NAD^+ und FAD gespeichert (**Abb. 9.**). Zusätzlich wird ein Molekül GTP (energetisch äquivalent zu ATP) gebildet (**Abb. 9.**).

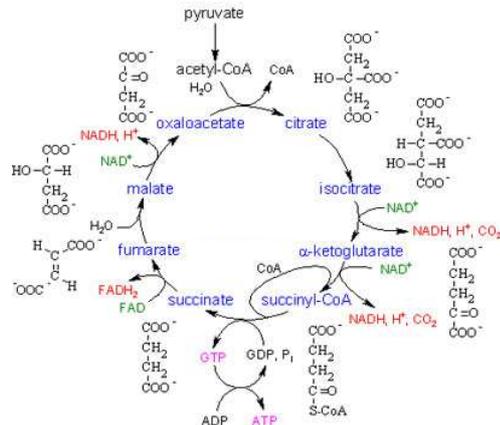


Abb. 9.: Zitratzyklus

In der oxidativen Phosphorylierung (auch: Atmungskette) werden die reduzierten Coenzyme $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 anschließend zum Aufbau eines Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran genutzt. Die Energie aus diesem Gradienten wird an den Komplexen der Atmungskette unter Bildung von H_2O Schritt für Schritt freigesetzt und zum Aufbau von ATP genutzt. Gleichzeitig werden die in der Glykolyse benötigten Coenzyme reoxidiert.

Beim oxidativen Abbau eines Moleküls Glukose über Glykolyse, Zitratzyklus und oxidative Phosphorylierung entstehen mehr als 30 Moleküle ATP .

Die meisten Zellen verfügen sowohl über die anaerobe Glykolyse als auch die oxidative Phosphorylierung und gewinnen ihre Energie je nach Verfügbarkeit von Sauerstoff über einen der beiden Wege.

1.3.3. Der Warburg-Effekt

Im Jahr 1924 beschrieb Otto Warburg, dass viele Krebszellen im Gegensatz zu gesunden Zellen auch in Anwesenheit von Sauerstoff ihre Energie bevorzugt über die Glykolyse gewinnen statt die energetisch wesentlich effektivere

oxidative Phosphorylierung zu nutzen (Warburg et al. 1924; Warburg 1956). Diese Beobachtung wurde als Warburg-Effekt oder aerobe Glykolyse bekannt.

Otto Warburg war davon überzeugt, dass die Entstehung jeglicher Krebserkrankung auf die irreversible Schädigung der „Atmung“ bzw. oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien zurückzuführen sei (Warburg 1956). Die Zelle sei daraufhin auch unter aeroben Bedingungen auf die Glykolyse angewiesen. Im Rahmen der vermehrten Nutzung dieser „primitiveren“ und stammesgeschichtlich älteren Form der Energiegewinnung wandle sich die hochdifferenzierte Körperzelle in eine undifferenzierte, unkontrolliert wachsende Krebszelle um.

1.3.4. Molekulare Grundlagen des Warburg-Effekts

Nachdem der Warburg-Effekt in der Forschung über Jahrzehnte in den Hintergrund getreten war (Garber 2004), wurden seine molekularen Grundlagen in den letzten Jahren zum Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten.

Aktuell wird die Rolle von verschiedenen Onkogenen wie *AKT* und *MYC*, Tumorsuppressorgenen wie p53 sowie die Rolle von Hypoxie, des *hypoxia-inducible factors* (HIF) und den glykolytischen Enzymen Succinatdehydrogenase (SDH) und Fumarathydratase (FH) diskutiert (Kim und Dang 2006) (**Abb. 10.**).

Von neuen Erkenntnissen aus der Molekularbiologie erhofft man sich unter anderem Hinweise darauf, welche Bedeutung eine gesteigerte Glykolyserate für Krebszellen hat. So ist umstritten, ob der Warburg-Effekt als alleiniger Grund, ein Faktor oder Nebenprodukt der Krebsentstehung einzuschätzen ist (Kim und Dang 2006) oder – wie von vielen Forschern postuliert – eine reine Reaktion auf die Umgebungsbedingungen darstellt (Garber 2004).

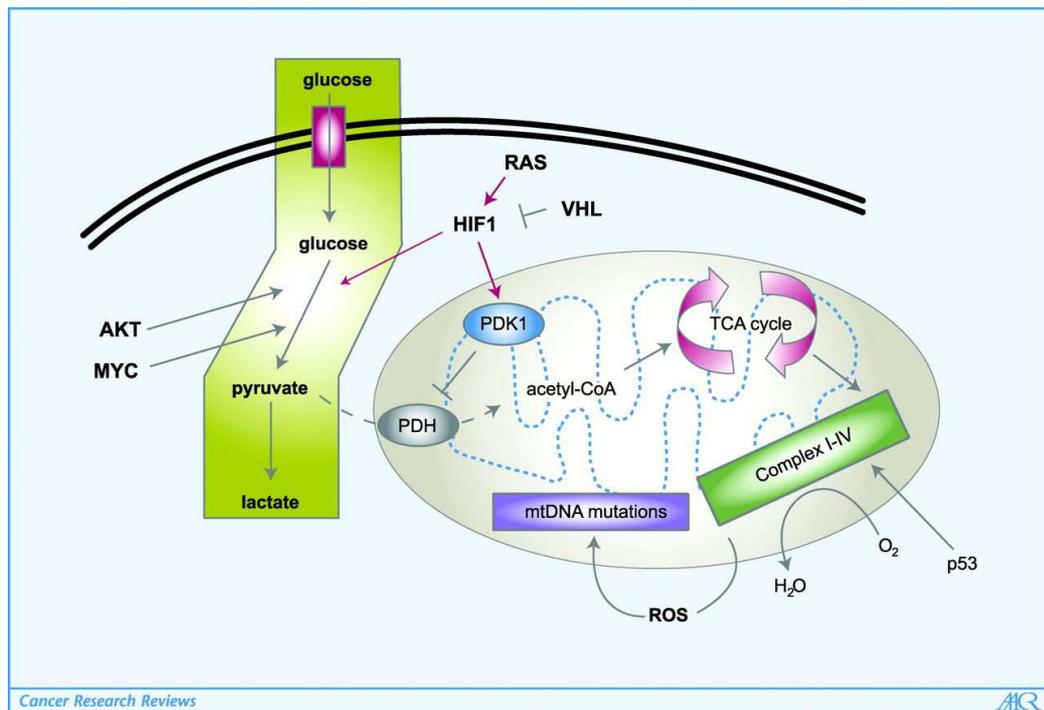


Abb. 10.: Molekulare Grundlagen des Warburg-Effekts. Die Aktivierung des Onkogens *AKT* führt zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme und – durch Aktivierung der Hexokinase 2 (*Hk 2*) – erhöhten Glykolyserate. Das Onkogen *MYC* wird mit einer Aktivierung glykolytischer Gene und einer gesteigerten Biosynthese von Mitochondrien in Verbindung gebracht. Letztere führt möglicherweise zu einem vermehrten Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was durch Schädigung der mitochondrialen DNA zur mitochondrialen Dysfunktion beitragen könnte. Das Tumorsuppressorgen *p53* aktiviert einen Bestandteil der Atmungskette und steigert dadurch den oxidativen Stoffwechsel. HIF-1 wird unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert sowie unter dem Einfluss von RAS und bei Verlust des Von-Hippel-Lindau-Proteins (VHL) vermehrt exprimiert. HIF-1 aktiviert glykolytische Gene sowie das *PDK1*-Gen, was zu einer Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase führt, welche die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert. Durch den Abbau von Acetyl-CoA im Zitronensäurezyklus werden Elektronen für die Komplexe I bis IV der mitochondrialen Atmungskette bereitgestellt. Hemmung der PDH führt zu einem Rückgang des oxidativen Stoffwechsels in den Mitochondrien, Pyruvat aus der Glykolyse wird vermehrt zu Laktat umgewandelt.

Defekte in der oxidativen Phosphorylierung

In den letzten Jahren geriet Otto Warburgs These ins Wanken, dass Krebszellen aufgrund eines Defektes in der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung auf die Glykolyse zur Energiegewinnung angewiesen sind (Bui und Thompson 2006).

Es wurde gezeigt, dass verschiedene epitheliale Mamma-Ca-Zelllinien bei Inhibition der Laktatdehydrogenase (LDH) auf eine mit normaler Effizienz arbeitende oxidative Phosphorylierung ausweichen können, um das für die Glykolyse benötigte Coenzym $\text{NADH}+\text{H}^+$ zu reoxidieren (**siehe 1.3.2.**).

Die Rolle von Onkogenen

Aktivierung von *AKT*

Als eine der molekularen Grundlagen für die gesteigerte aerobe Glykolyse von Krebszellen wurde die Aktivierung des Onkogens *AKT*, dessen Translationsprodukt Akt eine Serin-/ Threonin-Kinase darstellt, postuliert (Elstrom et al. 2004). Durch eine vermehrte Expression von Glukosetransportern und eine Aktivierung der Hexokinase 2 vermag Akt die aerobe Glykolyse zu steigern (Kim und Dang 2006). Dieser Mechanismus scheint unabhängig von HIF-1 (**siehe unten**).

In vitro wurde gezeigt, dass Akt den Glukoseverbrauch in transformierten Zellen vermehrt (Elstrom et al. 2004). Humane Glioblastomzellen mit konstitutiv aktiviertem Akt zeigten im Gegensatz zu humanen Glioblastomzellen ohne Akt-Aktivierung eine erhöhte Glykolyserate. Akt-exprimierende Zellen reagierten darüber hinaus empfindlicher auf Glukose-Entzug als Zellen ohne Akt-Exprimierung.

Aktivierung von *MYC*

Viele humane Krebszellen besitzen Mutationen oder Amplifikationen des Protoonkogens *MYC* (Kim und Dang 2006). Als Transkriptionsfaktor ist Myc unter anderem für die Aktivierung zahlreicher glykolytischer Enzyme verantwort-

lich und wurde wie Akt mit einer direkten Aktivierung der aeroben Glykolyse in Zusammenhang gebracht.

So konnte eine Aktivierung von *MYC in vitro* die aerobe Glykolyse in immortalisierten Rattenfibroblasten steigern, während im humanen B-Zell-Modell eine gesteigerte oxidative Phosphorylierung und dadurch ein vermehrter Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) resultierte.

Das Gen für die Laktatdehydrogenase-A (LDH-A) (**siehe 1.3.2.**), die in vielen humanen Krebszellen vermehrt exprimiert wird, wurde als c-MYC responsives Gen identifiziert (Shim et al. 1997).

Erhöhte LDH-A-Spiegel sind vermutlich für das Krebszellwachstum im hypoxischen Inneren einer Krebszellmasse nötig.

Verschiedene *in-vitro*-Versuche legen die Vermutung nahe, dass die Überexprimierung von LDH-A darüber hinaus für eine c-MYC-vermittelte Transformation der Zelle erforderlich ist:

Senkt man mittels LDH-A-Antisense-RNA den zellulären LDH-A-Spiegel, sinkt *in vitro* die Clonogenizität von Krebszellen mit Laktatüberproduktion. Dies wurde für c-MYC-transformierte Rat1a-Fibroblasten, c-MYC-transformierte humane lymphoblastoide Zellen und Burkitt-Lymphom-Zellen gezeigt. Unter normoxischen Bedingungen wurde – im Gegensatz zu Hypoxie – das Wachstum von adhaerenten, c-Myc-transformierten Fibroblasten durch Anwendung von Antisense-LDH-A nicht beeinträchtigt.

Weiterhin vermutet man, dass LDH-A den apoptotischen Effekt von c-MYC bei Glukoseentzug vermittelt (Shim et al. 1998). So verweilten Zellen ohne c-MYC-Transformation bei *in vitro*-Behandlung mit dem Antimetaboliten 2-Deoxy-D-Glukose (**siehe 1.4.1.**) oder Glukoseentzug in der Ruhephase des Zellzyklus, während c-MYC-transformierte Fibroblasten, lymphoblastoide Zellen und Lungen-Ca-Zellen in Apoptose gingen. Rat1a-Fibroblasten mit ektopischer LDH-A-Exprimierung gingen bei Glukoseentzug in Apoptose, nicht jedoch bei Entzug von Serum.

Inaktivierung von p53

Auch der Verlust des Tumor-Suppressor-Gens p53 wurde mit einer gesteigerten aeroben Glykolyserate in Verbindung gebracht (Matoba et al. 2006).

Das p53-Gen ist an der Regulation der Energiegewinnung beteiligt und in Krebszellen häufig mutiert. Sein Genprodukt p53 aktiviert das Enzym Cytochrom c Oxidase 2 (SCO2), das entscheidend in den Aufbau der Cytochrom-C-Oxidase, eines Bestandteils eines Atmungskettenkomplexes, involviert ist.

Humane Krebszellen mit intaktem p53-Gen reagierten *in vitro* auf eine Störung des SCO2-Gens, vergleichbar p53-defekten Zellen, mit einer Steigerung der aeroben Glykolyse.

Der Hypoxia Inducible Factor – HIF

Neben einer möglichen Rolle von Onkogenen wie *AKT* und *MYC* und Tumorsuppressorgenen wie p53 ist der Hypoxia Inducible Factor (HIF), ein Transkriptionsfaktor, am „shift“ des zellulären Stoffwechsels hin zur Glykolyse entscheidend beteiligt (Kim und Dang 2006).

Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1)

HIF ist ein Transkriptionsfaktor, der in Zellen vielfältige Reaktionen auf hypoxische Bedingungen vermittelt (Knowles et al. 2003). Hierzu zählen unter anderem eine Steigerung der Glykolyserate und eine verstärkte Angiogenese.

In eukaryotischen Zellen liegt die Unterform HIF-1 vor (Zhou und Brüne 2004). HIF-1 ist ein Heterodimer und setzt sich aus einer konstitutiv exprimierten β -Einheit (HIF-1 β) und einer durch Sauerstoff regulierten α -Einheit (HIF-1 α) zusammen. HIF-1 α unterliegt unter normoxischen Bedingungen einem ständigen Auf- und Abbau (Kim und Dang 2006).

Der Abbau von HIF-1 α erfolgt proteosomal (Zhou und Brüne 2004). Prolinreste an bestimmten Domänen des abzubauenen HIF-1 α -Moleküls werden durch Prolylhydroxylasen (PHD) unter Verbrauch von Sauerstoff und α -Keto-glutarat hydroxyliert (Kim und Dang 2006). Diese Hydroxylierung wird vom Von-Hippel-Lindau-Protein erkannt, welches die Untereinheit durch Ubiquitinierung

für den proteosomalen Abbau am 26S-Proteasom markiert (Zhou und Brüne 2004).

Unter hypoxischen Bedingungen sinkt aufgrund einer verminderten Aktivität der sauerstoffabhängigen PHD die Abbaurate von HIF-1 α . HIF-1 α akkumuliert in der Zelle und kann in Interaktion mit HIF-1 β als Transkriptionsfaktor für glykolytische und angiogenetische Faktoren wirksam werden.

Neueren Erkenntnissen zufolge wird die Konzentration von HIF-1 nicht ausschließlich durch die Sauerstoffverhältnisse reguliert, sondern ist zusätzlich dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor α (TNF α) oder NO unterworfen (Zhou und Brüne 2004).

HIF-1 und der Warburg Effekt

Krebszellen im Zentrum eines Tumors weisen als Reaktion auf die hypoxischen Bedingungen erhöhte HIF-1 α -Spiegel auf (Zhou und Brüne 2004).

Es wurden in Krebszellen jedoch auch unter normoxischen Bedingungen erhöhte Konzentrationen an HIF gefunden (Zhong et al. 1999).

Als Gründe hierfür werden die Aktivierung verschiedener Onkogene wie *Src* und H-Ras sowie Mutationen im Von-Hippel-Lindau-Protein (VHL) und verschiedenen Tumorsuppressoren aus dem Zitratzyklus wie der Succinatdehydrogenase (SDH) und der Fumarathydratase (FH) diskutiert (Kim und Dang 2006).

Neue Studien lassen darüber hinaus eine aktive Hemmung der mitochondrialen Funktion durch HIF-1 α vermuten, was ebenfalls zu einer gesteigerten Glykolyserate führt. HIF-1 α ist vermutlich indirekt an der Inaktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (**siehe 1.3.2.**) beteiligt, welcher die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA für den Zitratzyklus katalysiert.

1.3.5. Der Warburg-Effekt und seine möglichen Vorteile für die Krebszelle

Eine Steigerung der aeroben Glykolyserate scheint für die Krebszelle in vielerlei Hinsicht von Vorteil zu sein:

Bei ausreichendem Glukoseangebot ist durch eine Steigerung der Glykolyse-
rate eine deutlich schnellere Energiegewinnung möglich als mittels der oxida-
tiven Phosphorylierung (Fantin et al. 2006). Eine schnelle und zuverlässige
Energieversorgung ist für die rapide proliferierende Krebszelle essentiell.

Die glykolytische Energiegewinnung ist auch unter hypoxischen Bedingungen
– zum Beispiel im Inneren eines Tumors – möglich und könnte für Krebszellen
einen Proliferationsvorteil gegenüber gesunden Zellen darstellen.

Der Glukosemetabolismus ist darüber hinaus mit der Synthese verschiedener
Bausteine, die für Zellwachstum und Vermehrung benötigt werden, gekoppelt.
So stammen das für den Aufbau von Fettsäuren benötigte $\text{NADPH}+\text{H}^+$ sowie
verschiedene Pentosephosphate wie Ribose-5-Phosphat für die Nukleotidsyn-
these aus dem Pentosephosphatweg (**Abb. 11.**).

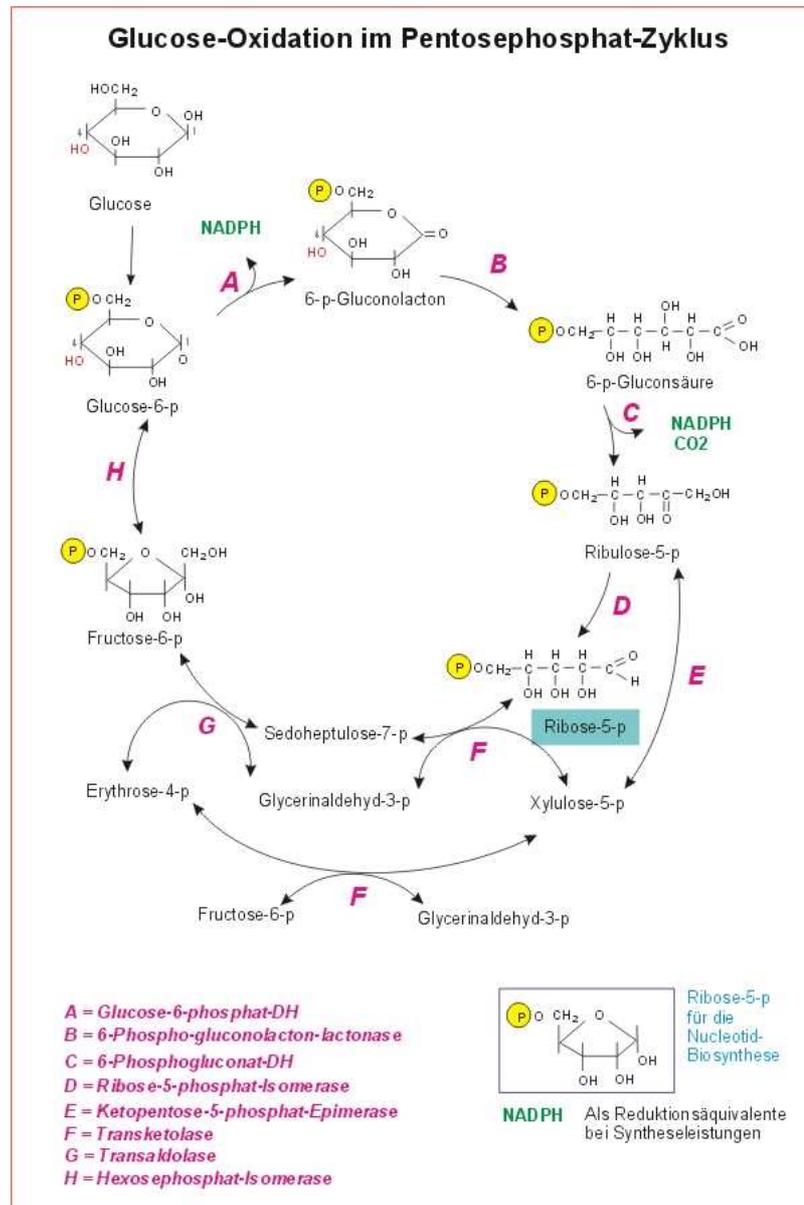


Abb.11.: Der Pentosephosphatweg: Bereitstellung von NADPH+H⁺ für die Fettsäuresynthese und die Regeneration von Glutathion sowie Produktion von Pentosephosphaten für die Nucleotidsynthese.

Auch für die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid, die an der Auslösung der Apoptose beteiligt sind, ist der Glukosemetabolismus von Bedeutung (Andringa et al. 2006).

Hier spielen wiederum die Bereitstellung von $\text{NADPH}+\text{H}^+$ durch den Pentosephosphatweg (**Abb. 11.**) sowie die Produktion von Pyruvat durch die Glykolyse eine wichtige Rolle.

$\text{NADPH}+\text{H}^+$ dient als Elektronenquelle für die Regeneration von oxidiertem Glutathion mittels der Glutathionreduktase (**Abb. 12.**). Pyruvat als α -Ketosäure kann Wasserstoffperoxid entgiften und wird bei diesem Prozess selbst nicht-enzymatisch oxidativ decarboxyliert (Nath et al. 1995).

The Glutathione Oxidation Reduction (Redox) Cycle

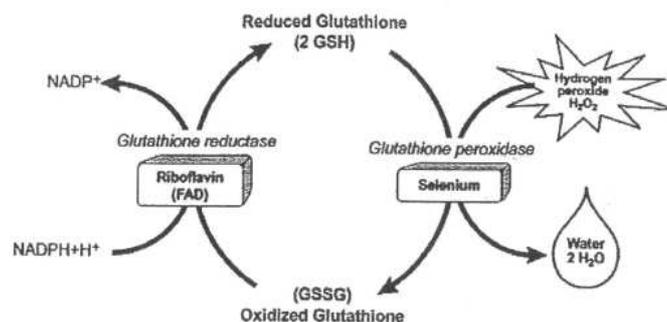


Abb. 12.: Das Glutathion-System und dessen Regeneration mittels $\text{NADPH}+\text{H}^+$ aus dem Pentosephosphatweg

Eine gesteigerte Glykolyse ist für die Krebszelle möglicherweise nicht nur hinsichtlich der Bereitstellung von Energie und Substraten sowie der Entgiftung von ROS von Bedeutung.

Kim et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass verschiedene glykolytische Enzyme immortalisierende, antiapoptotische und die Zelle mobilisierende Eigenschaften haben (Kim und Dang 2006). Auch der Verlust bzw. die Abnahme verschiedener Tumorsuppressorgene, die Enzyme des Zitratzyklus wie die Succinatdehydrogenase (SDH) oder Fumaratdehydrogenase (FDH)

kodieren, könnte durch eine gesteigerte Glykolyse verursacht werden und das Überleben der Krebszelle gewährleisten.

1.4. Ziel der eigenen Untersuchungen

Der Warburg-Effekt (**siehe 1.3.3.**) wird diagnostisch bereits seit einigen Jahren in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) genutzt. Aufgrund der gesteigerten Aufnahme und des intrazellulären „trappings“ von ^{18}F -Fluor-2-Deoxy-D-Glukose ($[^{18}\text{F}]$ -FDG) lassen sich Krebszellen radiologisch von gesundem Gewebe abgrenzen.

Möglicherweise lässt sich der Warburg-Effekt jedoch über die Diagnostik hinaus zur Therapie von Krebserkrankungen nutzen. Die Krebszelle scheint von einer gesteigerten Glykolyserate hinsichtlich verschiedener Aspekte zu profitieren (**siehe 1.3.5.**). Entsprechend sollten eine Störung der Glykolyse sowie eine Umlenkung der Energiegewinnung von der Glykolyse zur oxidativen Phosphorylierung von Nachteil für die Krebszelle sein.

In der eigenen Arbeit sollte die Wirkung einer Glykolysehemmung oder einer Umlenkung der glykolytischen Energiegewinnung zur oxidativen Phosphorylierung auf Neuroblastomzellen der Zelllinien Kelly und SK-N-SH untersucht werden. Eine Störung der glykolytischen Energiegewinnung wurde durch Behandlung der Zellen mit 2-Deoxy-D-Glukose (**siehe 1.4.1.**) oder niedrig dosiertem Ascorbat (**siehe 1.4.2.**) erreicht, eine Umlenkung zur oxidativen Phosphorylierung durch Inkubation mit Dichloressigsäure (**siehe 1.4.3.**).

Weiterhin sollte in Anlehnung an die Publikationen aus Mark Levines` Arbeitsgruppe die Wirkung von hochdosiertem Ascorbat und Wasserstoffperoxid auf Kelly- und SK-N-SH-Zellen analysiert werden (**siehe 1.2.**).

1.4.1. 2-Deoxy-D-Glukose als Hemmstoff der Glykolyse

2-Deoxy-D-Glukose unterscheidet sich von Glukose durch das Vorliegen eines Wasserstoffatoms statt einer Hydroxylgruppe am C₂-Atom (**Abb. 13.**).

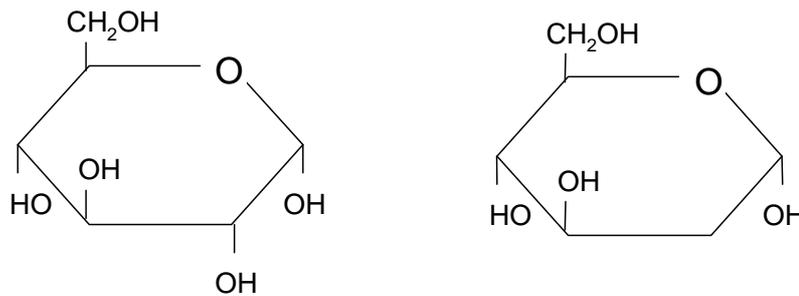


Abb. 13. : Glukose und 2-Deoxy-D-Glukose

Während Glukose praktisch für alle Zellen das wichtigste Substrat zur Energiegewinnung darstellt (**Abb. 8. und Abb. 9.**), hemmt 2-Deoxy-D-Glukose über verschiedene Mechanismen die Glykolyse und senkt dadurch Energiegewinn und Vitalität von Zellen:

Bereits die Aufnahme von 2-Deoxy-D-Glukose in die Zelle mittels der Glukotransportproteine GLUT 1 – 5 erfolgt kompetitiv mit Glukose. Folglich sinkt in Anwesenheit von 2-Deoxy-D-Glukose das für die glykolytische Energiegewinnung bereitstehende intrazelluläre Glukoseangebot.

Der erste Schritt der Glykolyse, die Phosphorylierung von Glukose durch die Hexokinase, erfolgt ebenfalls kompetitiv mit 2-Deoxy-D-Glukose (Manuel y Keenoy et al. 1992). Die Reaktion wird darüber hinaus über einen negativen, nicht kompetitiven *feed-back*-Mechanismus durch 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat gehemmt. Dieser ist deutlich stärker ausgeprägt als die physiologische *feed-back*-Hemmung der Hexokinase durch Glukose-6-Phosphat.

Der zweite Schritt der Glykolyse, die Umsetzung von Glukose-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat durch die Phosphoglucoisomerase, wird durch 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat über einen nicht kompetitiven Mechanismus inhibiert.

2-Deoxy-D-Glukose dagegen hat keinen Einfluss auf die Phosphoglucoisomerase.

Der erste Schritt des Pentosephosphatwegs, die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion, wird durch 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat nicht gestört. Es erfolgt jedoch auch keine Umsetzung der Substanz.

Es wird diskutiert, ob 2-Deoxy-D-Glukose über die beschriebene Glykolysehemmung hinaus durch Inhibition der N-Glykolyse zytotoxisch auf Krebszellen wirkt (Kurtoglu et al. 2007).

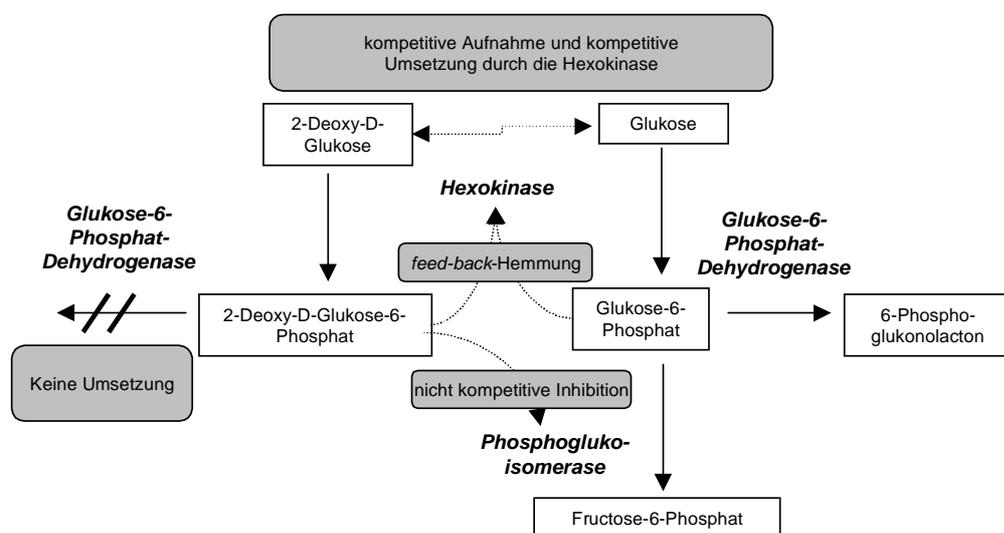


Abb. 14.: Glykolysehemmung durch 2-Deoxy-D-Glukose. Die Aufnahme in die Zelle sowie die Umsetzung durch die Hexokinase von Glukose und 2-Deoxy-D-Glukose erfolgt kompetitiv. Die Hexokinase wird über einen negativen *feed-back*-Mechanismus – physiologisch – durch Glukose-6-Phosphat sowie deutlich stärker durch 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat gehemmt. Die Phosphoglucoisomerase-Reaktion wird über einen nicht-kompetitiven Mechanismus ebenfalls durch 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat gehemmt.

Es könnte nicht nur eine 2-Deoxy-D-Glukose-Monotherapie, sondern auch eine kombinierte Behandlung von Krebserkrankungen mit 2-Deoxy-D-Glukose und anderen Therapieansätzen sinnvoll sein.

So wird diskutiert, ob sich durch Kombination von Krebstherapeutika, die gezielt die schnell proliferierenden Anteile in den Randgebieten einer Tumormasse angreifen, und 2-Deoxy-D-Glukose, von dem man sich auch eine gute

Wirksamkeit auf die anaeroben Anteile im Zentrum der Tumormasse verspricht, eine gleichzeitige zytotoxische Wirkung auf alle Bereiche eines Tumors erzielen lässt.

In verschiedenen in-vitro-Versuchen konnte bereits eine hohe Sensibilität von unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Osteosarkomzellen (143B) (Liu et al. 2001; Liu et al. 2002) und Pankreaskarzinomzellen (MIA PaCa2, Panc 1) gegenüber einer Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose gezeigt werden. Diese stand in direktem Zusammenhang mit der Expression von GLUT 1.

Auch die zytotoxische Wirkung einer externen Strahlentherapie auf Krebszellen konnte *in vitro* durch eine gleichzeitige Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose gesteigert werden (Shrivastava et al. 2006). Die Zytotoxizität medikamentös verabreichter Radionuklide gegenüber Brustkrebs- (MDA-MB-468) und Gliomzelllinien (U-87) nahm bei Kombination mit 2-Deoxy-D-Glukose ebenfalls zu.

Auch eine Kombination von 2-Deoxy-D-Glukose mit HIF-1-inhibierenden Substanzen könnte sinnvoll sein, da HIF-1 *in vitro* die Glykolyse-hemmende und zytotoxische Wirkung von 2-Deoxy-D-Glukose senkt. (Maher et al. 2007). Dies ist vermutlich auf eine gesteigerte Produktion glykolytischer Enzyme und eine entsprechend sinkende zytotoxische Wirkung gleichbleibender Konzentrationen an 2-Deoxy-D-Glukose in Anwesenheit von HIF-1 zurückzuführen.

1.4.2. Indirekte Glykolysehemmung durch niedrig dosiertes Ascorbat *in vitro*

Hochdosiertes Ascorbat besitzt eine direkte, über die Bildung von Wasserstoffperoxid vermittelte Zytotoxizität auf maligne Zellen (**siehe 1.2.**). Physiologisch dosiertes Ascorbat wirkt darüber hinaus möglicherweise über einen intrazellulären Mechanismus indirekt wachstumshemmend.

Knowles et al. konnten in Versuchen an verschiedenen Krebszelllinien (humane Prostataadenokarzinomzellen PC3, Ovarialkarzinomzellen OVCAR3, Mammakarzinomzellen HS578T, MDA 468 und MCF7) zeigen, dass physiologische Ascorbatkonzentrationen (25 µmol/l) unter normoxischen Bedingungen

die intrazelluläre Konzentration von HIF-1 α und verschiedenen HIF-1 abhängigen Genprodukten, zum Beispiel glykolytischen Enzymen, senken (Knowles et al. 2003).

Vermutlich ist dies auf einen in Anwesenheit von Ascorbat im Zellkulturmedium gesteigerten Abbau von HIF-1 α zurückzuführen. Prolylhydroxylasen, die am Abbau von HIF-1 α beteiligt sind, benötigen Ascorbat als Cofaktor (**siehe 1.3.4.**). Bei ausreichender Versorgung mit Ascorbat arbeiten sie mit erhöhter Effizienz, der zelluläre HIF-1 α -Spiegel sinkt.

Physiologische Ascorbatspiegel wirken über einen gesteigerten HIF-1 α -Abbau hinaus hemmend auf die HIF-1 α -Neusynthese. So konnte in MCF7-Mammakarzinomzellen eine durch IGF-1 und Insulin gesteigerte Expression von HIF-1 α durch Behandlung mit niedrig dosiertem Ascorbat unterdrückt werden.

1.4.3. Förderung des oxidativen Stoffwechsels durch Dichloressigsäure

Dichloressigsäure (**Abb. 15.**) wurde bereits klinisch zur Behandlung von Lactatacidosen bei Kindern eingesetzt. Aktuell wird die Substanz in der nicht-wissenschaftlichen Presse als neues Wundermittel gegen Krebs gepriesen.

Grund hierfür ist die Publikation einer kanadischen Arbeitsgruppe, die von einer selektiven *in vitro*-Toxizität von Dichloressigsäure auf humane nicht kleinzellige Lungen (A549)-, Mamma (MCF-7)-, und Glioblastom (M059K)- Zellen berichtet (Bonnet et al. 2007).

In ersten Tierversuchen konnten die Forscher bereits eine Wirksamkeit der Substanz *in vivo* zeigen. So ging bei Gabe von Dichloressigsäure-haltigem Trinkwasser (75 mg/ ml) bei Ratten mit subkutan transplantierten Lungentumorzellen (A 549) die Tumormasse deutlich zurück.

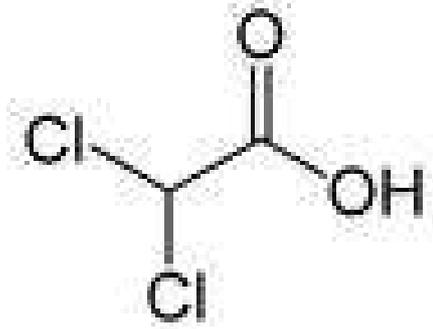


Abb. 15.: Dichloressigsäure

Die zytotoxische Wirkung von Dichloressigsäure gegenüber Krebszellen ist vermutlich auf eine Verschiebung des zellulären Energiestoffwechsels von der Glykolyse Richtung oxidative Phosphorylierung zurückzuführen, auf die Krebszellen sensibel reagieren (**siehe 1.4.**).

Die Substanz führt indirekt zu einer Aktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDH), der die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA für den Zitratzyklus katalysiert und dadurch den oxidativen Stoffwechsel fördert.

Die Aktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes wird über eine Hemmung der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase (PDH-Kinase) durch Dichloressigsäure erreicht, die in ihrer aktiven Form die PDH phosphoryliert und dadurch hemmt (**Abb. 16.**).

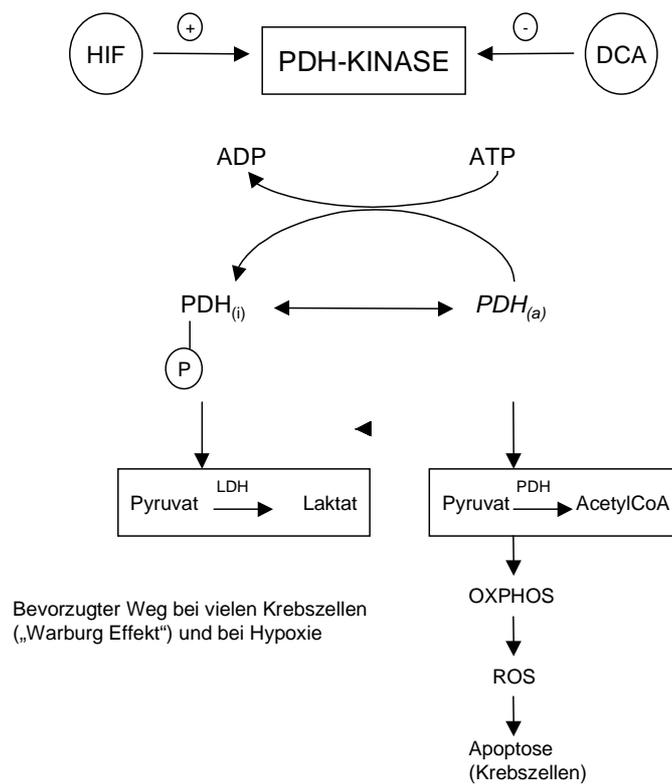


Abb. 16.: Wirkmechanismus von Dichloressigsäure (DCA). Pyruvatdehydrogenase (PDH) existiert in einer aktiven Form [PDH_(a)], die die Umwandlung von Pyruvat in AcetylCoA katalysiert, und in einer inaktiven Form [PDH_(i)], die durch Phosphorylierung mit Hilfe der PDH-Kinase gebildet wird. Die PDH-Kinase wird unter Hypoxie physiologischerweise durch HIF aktiviert (Kim et al. 2006), wodurch bei normalen Zellen die PDH inaktiviert wird und Pyruvat nicht mehr bevorzugt über AcetylCoA in Richtung oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), sondern zu Laktat umgesetzt wird. Umgekehrt kann DCA die PDH-Kinase inaktivieren, wodurch in Krebszellen durch eine nun aktive PDH Pyruvat bevorzugt zu AcetylCoA verstoffwechselt wird. In der weiterführenden OXPHOS kommt es zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen, die an der Auslösung der Apoptose beteiligt sind.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Artikel	Firma
2-Deoxy-D-Glukose, p.a.	Sigma, München
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5	Sigma
Diphenyltetrazoliumbromid (MTT), p.a.	
D-(+)Glukose, p.a.	Sigma
Dehydroascorbinsäure, mind. 80 %	Sigma
Dichloressigsäure, p.a.	Sigma
Dimethylsulfoxid, getrocknet, p.a.	Merck, Darmstadt
Eisen-II-Sulfat, p.a.	Serva, Heidelberg
Glukose-Oxidase, 20 KU/ F68,5mg lyo	Roche, Grenzach-Wyhlen
Isopropanol, p.a.	Merck
Kaliumthiozyanat, p.a.	Sigma
L-Ascorbinsäure	Sigma
Natriumhydroxid Plätzchen, p.a.	Merck
Natronlauge: 1 M und 2 M	Merck
Salzsäure: 1 M	Merck
Trichloressigsäure, p.a.	Sigma
Triton-X-100	Sigma
Trypanblau, 0,4 %	Sigma
Wasserstoffperoxid, 30 %	Sigma

2.1.2. Lösungsmittel und Puffer

Artikel	Firma
Ampuwa	Fresenius/Kabi, Bad Homburg
PBS, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe
PBS, mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Invitrogen

2.1.3. Testkits

Testkit	Firma
D-Glukose	Roche
L-Ascorbinsäure	Roche
L-Milchsäure	Roche

2.1.4. Neuroblastomzelllinien und Kulturmedien**2.1.4.1. Humane Neuroblastomzelllinien**

Zelllinie	Firma
Kelly, <i>MYCN</i> amplifiziert	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ); http://www.dsmz.de
SK-N-SH, <i>MYCN</i> nicht amplifiziert	American Type Culture Collection (ATCC); http://www.atcc.com

2.1.4.2. Kulturmedien

Artikel	Firma
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin	Biochrom AG
Penicillin/ Streptomycin, 10.000 E/ 10.000 µg/ ml	Biochrom AG
RPMI 1640, ohne Hepes	Biochrom AG
Trypsin/ EDTA-Lösung, 0,05 %/ 0,02 %	Biochrom AG

2.1.5. Verbrauchsmaterial**2.1.5.1. Steriles Verbrauchsmaterial**

Artikel	Firma
96-well-Platten	Vitaris, Baar
Combitips: 0,5 und 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Einfrierröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kanülen, 0,25 × 50 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Röhrchen: 5, 15 und 50 ml	Greiner
Spritzen: 20 ml	Braun, Melsungen

Sterilfilter, 0,2 µM	Sartorius, Göttingen
Stripetten: 5, 10 und 25 ml	Vitaris
Zellkulturflaschen, 75 cm ² , Filter-cap	Vitaris
Zellkulturflaschen, 25 cm ² , Standard-cap	Greiner

2.1.5.2. Unsteriles Verbrauchsmaterial

Artikel	Firma
Alufolie	Papstar, Kall
<i>cups</i> : 1,5 und 2 ml	Eppendorf
Handschuhe	Ansell, München
Küvetten, 10 x 4 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Pechiney Packaging Plastic, Chicago, U.S.
Pasteurpipetten, 230 mm	WU, Mainz
Pipettenspitzen: 10 µl	Biozym, Hess
Pipettenspitzen: 100 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen: 1000 µl	Sarstedt
Präzisions-Wischtücher	Kimberly Clark, Koblenz

2.1.6. Geräte

Gerät	Firma
Akku Chek Sensor Blutzuckermessgerät	Roche
Aufrechtes Lichtmikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
ELISA-Reader	Milenia, Bad Nauheim
Feinwaage	Sartorius
Hera Safe Brutschrank	Heraeus, Hanau
Hera Safe Sterilbank	Heraeus
Microprocessor pH 535 MultiCal	WTW, Weilheim
Mikro 22R Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Neubauer Zählkammer	Assistant, Sondheim
Pipetboy plus Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten: 10, 100, 250 und 1000 µl	Eppendorf
Pipetus akku Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt
Repetierpipette	Eppendorf

Rotixa 5RS Zentrifuge	Hettich
Titramax 100 Horizontalschüttler	Heidolph, Kelheim
Ultraspec Plus Photometer	LKB Biochrom, Freiburg
Vortex-Gerät	Heidolph
Wasserbad	Memmert, Schwabach

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung von Neuroblastomzellen

Die Neuroblastomzelllinien Kelly und SK-N-SH wurden in RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/ Streptomycin und 1 % L-Glutamin bei 37 °C, 5 % CO₂, in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. FCS diente als Quelle für hormonelle Faktoren, Adhäsionsfaktoren und Proteine, Penicillin/ Streptomycin schützte vor bakterieller Kontamination. L-Glutamin wurde als essentielle Aminosäure zugesetzt. Vor Zugabe des FCS zum Medium wurden die enthaltenen Komplementfaktoren über 30 min bei 56 °C inaktiviert.

Mit den Zelllinien Kelly und SK-N-SH wurden eine *MYCN*-Onkogen amplifizierte (Kelly) und eine *MYCN* nicht amplifizierte Zelllinie (SK-N-SH) ausgewählt.

Kelly besitzt eine ca. 100fache genomische Amplifikation von *MYCN*, die auf Chromosom 17 als „homogeneously staining region“ (HSR) vorliegt (Schwab et al. 1983). Die Amplifikation des Onkogens *MYCN* gilt als Parameter für aggressives Wachstum und ist ein negativer prognostischer Faktor bezüglich Verlauf und Rezidiv-Wahrscheinlichkeit des Neuroblastoms. Morphologisch erscheinen Kelly-Zellen rund bis fusiform, haben polare Nervenzell-artige Ausläufer und wachsen als adhärenente Kultur (<http://www.dsmz.de>).

SK-N-SH besitzt keine *MYCN*-Amplifikation. Die adhärenente Zelllinie bestand ursprünglich aus zwei Zelltypen, zum einen aus kleinen Zellen mit zierlichen Nervenzell-artigen Ausläufern, zum anderen aus größeren, epitheloiden Zellen (Biedler et al. 1973). Mit zunehmendem Alter der Kultur überwiegt der kleine Zelltyp. Die Zelllinie eignet sich aufgrund einer starken Expression von Noradrenalintransportern an der Zellmembran sehr gut für die Aufnahme von ¹²³Jod-Metajodobenzylguanidin ([¹²³I] mIBG) (Ballweg 2007), das in der Klinik als Tracer für die szintigraphische Diagnostik des Neuroblastoms eingesetzt wird.

Je nach benötigter Zellzahl erfolgte die Kultivierung von Kelly und SK-N-SH in 25 cm² großen Zellkulturflaschen in 25 ml Medium oder in 75 cm² großen Zellkulturflaschen in 35 ml Medium. Bei zunehmendem Verbrauch des Mediums durch die vitalen Neuroblastomzellen, der durch den Farbumschlag des Indikators Phenol-Rot ins Gelbliche ersichtlich wurde, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei Konfluenz wurde Kelly in einem Teilungsverhältnis von 1:3 bis 1:6, SK-N-SH in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Hierfür wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen durch Zugabe von Trypsin/ EDTA (25 cm²-Flasche: 1,3 ml Trypsin, 75 cm²-Flasche: 2,5 ml Trypsin) enzymatisch von ihrer Unterlage gelöst. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Resuspension der Zellen in 10 ml frischem Medium. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (20 °C, 400 g, 5 min), der Überstand verworfen und die Zellen, in frischem Medium resuspendiert, in neue Zellkulturflaschen überführt. Vitalität, Wachstum und Morphologie von Kelly und SK-N-SH wurden regelmäßig lichtmikroskopisch beurteilt.

Die Lagerung der Zellen über mehrere Monate wurde bei – 80 °C in kryokonserviertem Zustand vorgenommen. Hierzu wurde ein Zellpellet hergestellt und in Einfriermedium resuspendiert (ca. 2 ml für den Zellgehalt einer 25 cm²-Flasche, ca. 4 ml für den Zellgehalt einer 75 cm²-Flasche). Das Einfriermedium bestand aus RPMI 1640 mit 20 % inaktiviertem FCS, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) 1 % Penicillin/ Streptomycin und 1 % L-Glutamin. DMSO verhindert das Platzen der Zellen durch Kristallbildung während des Einfriervorganges. Es besitzt jedoch bei Raumtemperatur eine zeitabhängige zytotoxische Wirkung. Entsprechend wurde das Einfriermedium vor Verwendung bei 4 °C gelagert und beim Einfrieren und Auftauen von Zellen zügig gearbeitet. Je 1 ml Zellsuspension wurde in Einfrier Röhrchen pipettiert und in mehrere Lagen Zellstoff verpackt bei – 80 °C tiefgefroren.

Um eingefrorene Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die bei 37 °C aufgetauten Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert, zentrifugiert (5 min, 20 °C, 400 g) und der DMSO-haltige Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium in Zellkulturflaschen überführt und vor Verwendung mindestens einmal passagiert.

2.2.2. Zellzahlbestimmung

Zellsuspensionen definierten Zellgehaltes wurden mittels Trypanblau-Färbung und Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer hergestellt. Die Trypanblau-Färbung ermöglicht die Unterscheidung vitaler und toter Zellen. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran nehmen den Farbstoff im Gegensatz zu geschädigten oder toten Zellen mit nicht-intakter Zellmembran nicht auf. Vitale Zellen erscheinen dementsprechend unter dem Mikroskop weiß, geschädigte und tote Zellen blau.

Zunächst wurde eine Zellsuspension durch Resuspension eines geernteten Zellpellets in frischem RPMI 1640 oder PBS⁻ hergestellt. Ein repräsentatives Volumen dieser Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau versetzt. Anschließend wurde die Neubauer-Zählkammer mit der gefärbten Zellsuspension bestückt und die vitalen Zellen in allen vier Quadranten der Zählkammer, die aus je 16 kleineren Quadranten bestehen, mikroskopisch ausgezählt.

Zur Berechnung der Zellzahl pro ml Zellsuspension bildet man den Mittelwert aus den Einzelwerten der vier Quadranten und multipliziert diesen mit dem Verdünnungsfaktor des Trypanblau-Zusatzes und dem Faktor 10^4 :

$$\text{Zellzahl/ ml} = \text{gemittelte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.3. Kultivierung von Neuroblastomzellen in Anwesenheit von Ascorbat

In vivo liegt normalerweise ein Plasma-Ascorbatspiegel von ca. 40 – 60 $\mu\text{mol/l}$ vor (Chen et al. 2005) (**siehe 1.1.2.**). In Zellen des sympathischen Nervensystems können millimolare Konzentrationen erreicht werden.

Um Neuroblastomzellen unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen zu kultivieren, wurden das Zellkulturmedium von Kelly und SK-N-SH regelmäßig mit 50 $\mu\text{mol/l}$ Ascorbat (AA) versetzt (Kelly (+) und SK-N-SH (+)). Als Kontrolle wurden Kelly und SK-N-SH in Medium ohne AA geführt (Kelly (-) und SK-N-SH (-)).

Zunächst wurden je zwei Flaschen derselben Ausgangskultur mit einer Zellzahl von 500.000 Zellen in 35 ml angesetzt. So sollten Zellkulturen herangezüchtet werden, die ab der Zellteilung möglichst kontinuierlich unter denselben Bedingungen gewachsen waren. Nach 48 h Inkubationszeit erfolgte die erste Zugabe von AA zu den Kulturen von Kelly (+) und SK-N-SH (+) bzw. PBS⁻ zu den Kontrollkulturen von Kelly (-) und SK-N-SH (-). AA wurde in PBS⁻ gelöst und sterilfiltriert. Die Stockkonzentration betrug 17,5 mmol/ l. Der AA-Grundstock wurde in 100 µl-Aliquots aufgeteilt und bei – 20 °C gelagert. Bei Bedarf wurde ein Aliquot aufgetaut und mit 900 µl PBS⁻ zu einer Konzentration von 1,75 mmol/ l verdünnt. 100 µl dieser Lösung wurden ungepuffert ad 35 ml Zellkulturmedium von Kelly (+) und SK-N-SH (+) pipettiert. Die AA-Endkonzentration im Medium betrug 50 µmol/ l. Zeitgleich wurden Kelly (-) und SK-N-SH (-) mit 100 µl PBS⁻ versetzt (**Tab. 1.**). Dieser Vorgang wurde alle 48 h wiederholt. Vor Zugabe wurden jeweils 0,5 ml Medium aus der Zellkultur für die Bestimmung von Glukose und Laktat entnommen (**siehe 2.2.8.**) und bei – 20 °C eingefroren. Die entnommene Menge wurde durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden unter den genannten Bedingungen mindestens 30 d kultiviert, bevor sie in Versuchen eingesetzt wurden.

Tab. 1.: Behandlung von Neuroblastomzelldauerkulturen mit Ascorbat

	Kelly	SK-N-SH
(-)	100 µl PBS ⁻	100 µl PBS ⁻
(+)	100 µl 17,5 mmol/ l AA-Lösung (50 µmol/ l f.c.)	100 µl 17,5 mmol/ l AA-Lösung (50 µmol/ l f.c.)

2.2.4. Behandlung von Neuroblastomzellen mit Ascorbat, Dehydroascorbat, 2-Deoxy-D-Glukose, Wasserstoffperoxid und Dichloressigsäure

Um die Wirkung von Ascorbat (AA), Dehydroascorbat (DHA), 2-Deoxy-D-Glukose (dG), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Dichloressigsäure (DCA) auf Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurden Kelly und SK-N-SH über unterschiedliche Zeiträume mit unterschiedlichen Konzentrationen jeder Substanz inkubiert. Eingesetzt wurden Zellen, die in AA-haltigem Medium kultiviert worden waren (Kelly (+), SK-N-SH (+)), sowie Zellen aus AA-freiem Medium (Kelly (-), SK-N-SH (-)) (**siehe 2.2.3.**). Die Wirkung der jeweiligen Behandlung wurde mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test analysiert (**siehe 2.2.5.**).

Kelly und SK-N-SH wurden in 96-*well*-Platten ausgesät, Kelly in einer Dichte zwischen 5.000 und 30.000 Zellen/ *well*, SK-N-SH in einer Dichte zwischen 7.500 und 40.000 Zellen/ *well*. Jedes *well* enthielt 200 μ l Kulturmedium. Vor Zugabe der jeweiligen Substanz wurden die Zellen über mindestens 48 h kultiviert, bis bei mikroskopischer Beurteilung ein dichter und vitaler Zellrasen in den *wells* vorlag. Alle Substanzen wurden in einem Volumen von 10 μ l direkt in das Kulturmedium pipettiert. Um die gewünschte Substanz-Konzentration im Zellkulturansatz zu erzielen, hatte der Substanz-Arbeitsstock eine zwanzigfach höhere Konzentration als im Zellkulturansatz erwünscht. Die jeweiligen Kontrollansätze erhielten je 10 μ l des entsprechenden Lösungsmittels.

2.2.4.1. Behandlung mit Ascorbat oder Dehydroascorbat

AA wirkt in Konzentrationen im millimolaren Bereich auf humane Tumorzellen zytotoxisch, während es normale Körperzellen kaum schädigt (Chen et al. 2007). In dieser Studie wurde die Wirkung von AA auf Kelly und SK-N-SH untersucht. Insbesondere wurde der Zusammenhang zwischen Zellzahl und Wirkung der Substanz analysiert. Zusätzlich wurde die Wirkung gleicher Konzentrationen von AA und Dehydroascorbat (DHA) verglichen.

Der AA-Grundstock wurde durch Lösen der Substanz in PBS⁻ in einer Konzentration von 200 mmol/ l hergestellt. Der pH-Wert der Lösung wurde durch NaOH-Titration auf einen Wert zwischen 6,5 und 7,5 eingestellt. Nach Sterilfiltration wurde der AA-Grundstock mit PBS⁻ zu Arbeitsstocks von 150 mmol/ l, 100 mmol/ l, 50 mmol/ l, 25 mmol/ l, 12,5 mmol/ l, 7,5 mmol/ l und 3,75 mmol/ l verdünnt.

In einem ersten, einmaligen Versuchsansatz wurden Kelly und SK-N-SH über 72 h mit 0,156 mmol/ l, 0,313 mmol/ l, 0,625 mmol/ l, 1,25 mmol/ l, 2,5 mmol/ l, 5 mmol/ l, 7,5 mmol/ l und 10 mmol/ l AA (f.c.) behandelt.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde der Zusammenhang zwischen Zellzahl und Wirkung der Substanz analysiert. Hierfür wurden Zellen aus Zellkulturen mit AA-haltigem Medium (Kelly (+) und SK-N-SH (+)) oder Zellkulturen mit AA-freiem Medium (Kelly (-) und SK-N-SH (-)) neu ausgesät. Kelly (+) und SK-N-SH (+) wurden weiterhin in 50 µmol/ l AA inkubiert, Kelly (-) und SK-N-SH (-) in Kulturmedium, das die entsprechende Lösungsmittelmenge erhielt. Kelly (+) und (-) wurden in einer Dichte von 10.000, 12.000 oder 30.000 Zellen/ well, SK-N-SH (+) und (-) in einer Dichte von 15.000, 25.000, 30.000 oder 40.000 Zellen/ well ausgesät. Nach der Vorkultur wurden diese Ansätze über 48 h mit 0,156 mmol/ l, 0,313 mmol/ l, 0,625 mmol/ l, 1,25 mmol/ l, 2,5 mmol/ l und 5 mmol/ l AA behandelt. Der Versuchsansatz wurde für Kelly (-) und Kelly (+) je fünfmal, für SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+) je siebenmal durchgeführt.

DHA unterscheidet sich von AA in der chemischen Struktur durch das Fehlen von zwei Wasserstoffatomen. In folgender Studie sollte die Wirkung von AA und DHA auf Kelly verglichen werden. Hierzu wurde durch Lösen von AA in PBS⁻ eine 200 mmol/ l AA-Stocklösung hergestellt, mit NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5 eingestellt und sterilfiltriert. Zur Herstellung einer 10 mmol/ l DHA-Lösung wurden 4 ml der AA-Stocklösung zunächst über 5 min bei 37 °C mit 2 Spateln Ascorbatoxidase (AAO) inkubiert, anschließend über 10 min bei 37 °C mit 3 Spateln AAO. AAO katalysiert die Umsetzung von AA und Sauerstoff zu DHA und Wasser. Aus vorausgegangenen Versuchen war bekannt, dass unter diesen Bedingungen eine vollständige Umsetzung von AA in DHA

stattfindet (Baader et al. 1994). Die entstandene DHA-Lösung wurde sterilfiltriert. Die AA- und DHA-Stocklösung wurden jeweils mit PBS⁻ zu Arbeitsstocks von 20 mmol/ l und 2 mmol/ l verdünnt. Nach der Vorkultur wurde Kelly über 48 h mit 0,1 mmol/ l, 1 mmol/ l und 10 mmol/ l AA sowie 0,1 mmol/ l, 1 mmol/ l und 10 mmol/ l DHA inkubiert. Der Versuchsansatz wurde einmal durchgeführt.

2.2.4.2. Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose

2-Deoxy-D-Glukose (dG) wirkt hemmend auf verschiedene Enzyme der Glykolyse und senkt dadurch die glykolytische Energiegewinnung (**siehe 1.4.1.**). In dieser Studie wurde die Wirkung verschiedener dG-Konzentrationen ermittelt sowie untersucht, ob sich in ascorbathaltigem Milieu gewachsene Zellen hinsichtlich ihrer Sensibilität gegenüber dG von derjenigen von Zellen aus ascorbatfreiem Milieu unterscheiden.

dG wurde in PBS⁻ zu Grundstocks von 120 mmol/ l bzw. 40 mmol/ l gelöst, sterilfiltriert und mit PBS⁻ zu Konzentrationen von 80 mmol/ l, 40 mmol/ l, 20 mmol/ l und 10 mmol/ l verdünnt.

In ersten Orientierungsversuchen wurden Kelly und SK-N-SH über 48 h mit 2 mmol/ l, 4 mmol/ l und 6 mmol/ l dG bzw. über 72 h mit 0,5 mmol/ l, 1 mmol/ l und 2 mmol/ l dG (Kelly) oder 0,5 mmol/ l, 2 mmol/ l und 3 mmol/ l dG (SK-N-SH) behandelt. Jeder Versuchsansatz wurde einmal durchgeführt.

Im folgenden Versuchsansatz wurden Zellen aus Kulturen mit AA im Zellkulturmedium (Kelly (+) und SK-N-SH (+)) sowie Zellen aus Kulturen ohne AA im Zellkulturmedium (Kelly (-) und SK-N-SH (-)) neu ausgesät und unter unveränderten Bedingungen weiter kultiviert. Nach der Vorkultur erfolgte eine 48 h-Behandlung mit 0,5 mmol/ l, 1 mmol/ l und 2 mmol/ l dG. Der Versuchsansatz wurde für Kelly (-) und Kelly (+) je viermal, für SK-N-SH (-) bzw. SK-N-SH (+) achtmal bzw. siebenmal durchgeführt.

2.2.4.3. Behandlung mit Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) besitzt als reaktive Sauerstoffverbindung (ROS) eine direkt zytotoxische Wirkung (**siehe 1.2.4.**). In dieser Studie wurde die Wirkung verschiedener H_2O_2 -Konzentrationen auf Neuroblastomzellen ermittelt sowie der Zusammenhang zwischen H_2O_2 -vermittelter Zytotoxizität und eingesetzter Zellzahl bzw. Inkubationszeit und Toxizität der Substanz analysiert.

Eine 8,81 mol/l H_2O_2 -Lösung wurde mit PBS⁻ zu einem Grundstock von 88 mmol/l verdünnt und sterilfiltriert. Anschließend wurden durch Verdünnung mit PBS⁻-Arbeitsstocks von 6 mmol/l, 4 mmol/l, 3 mmol/l, 2 mmol/l, 1 mmol/l und 0,5 mmol/l hergestellt.

In orientierenden Versuchen wurden Kelly und SK-N-SH über verschiedene Zeiträume (2 h, 24 h, 72 h, 96 h) mit unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen (25 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 150 $\mu\text{mol/l}$, 200 $\mu\text{mol/l}$ und 300 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert. Jeder Versuchsansatz wurde einmal durchgeführt.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden Kelly und SK-N-SH in unterschiedlicher Zellzahl ausgesät: Kelly in einer Zellzahl von 5.000, 10.000, 20.000 und 30.000 Zellen/well, SK-N-SH in einer Zellzahl von 7.500, 12.000, 24.000 und 48.000 Zellen/well. Nach der Vorkultur wurden die Kulturen über 48 h mit 25 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 behandelt. Der Versuchsansatz wurde einmal durchgeführt.

Um den Zusammenhang zwischen Inkubationszeit und Toxizität zu untersuchen, wurden in einem dritten Versuchsansatz Kelly und SK-N-SH in jeweils zwei 96-well-Platten ausgesät und nach der Vorkultur zeitgleich mit 25 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 behandelt. In je einer Platte pro Zelllinie wurde nach 1 h zur Entfernung des H_2O_2 ein Mediumwechsel durchgeführt, die Parallelplatten wurden für weitere 24 h mit H_2O_2 inkubiert. Dieser Versuchsansatz wurde ebenfalls einmal durchgeführt.

2.2.4.4. Behandlung mit Dichloressigsäure

Dichloressigsäure (DCA) fördert über Aktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes die oxidative Energiegewinnung (**siehe 1.4.3.**). In dieser Studie wurde die Wirkung von DCA auf Kelly-Zellen untersucht.

DCA wurde mit RPMI 1640 zu einem Grundstock von 120 mmol/ l verdünnt und durch Titration mit NaOH auf einen pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5 eingestellt. Der Grundstock wurde sterilfiltriert und mit RPMI 1640 zu Arbeitsstocks von 40 mmol/ l, 20 mmol/ l, 15 mmol/ l, 10 mmol/ l und 5 mmol/ l verdünnt.

Vor Behandlung von Kelly mit DCA wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um den Einfluss von DCA auf Glukoseverbrauch und Laktatproduktion der Zellen in frischem Medium exakter beurteilen zu können. Die Behandlung mit DCA erfolgte über 48 h mit Konzentrationen von 250 µmol/ l, 500 µmol/ l, 750 µmol/ l, 1000 µmol/ l und 2000 µmol/ l. Vor Bestimmung der Stoffwechselaktivität von Kelly mittels MTT-Test wurden je 100 µl Kulturmedium aus allen *wells* entnommen und für die spätere Bestimmung von Glukose- und Laktatwerten bei – 20 °C eingefroren. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

2.2.4.5. Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und Wasserstoffperoxid

Es sollte untersucht werden, ob dG und H₂O₂ einen kumulativen zytotoxischen Effekt auf Neuroblastomzellen haben.

Die Grund- und Arbeitsstocks beider Substanzen wurden wie beschrieben hergestellt (**siehe 2.2.4.2. und 2.2.4.3.**). Von beiden Substanzen wurden je 10 µl Lösung ad 200 µl Kulturmedium pipettiert, Lösungsmittelsansätze erhielten 20 µl PBS⁻.

In einem ersten, einmaligen Versuchsansatz wurden Kelly und SK-N-SH über 48 h mit den verschiedenen Kombinationen aus 2, 4 oder 6 mmol/ l dG und 25 oder 50 µmol/ l H₂O₂ behandelt.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde Kelly über 48 h mit 0,1 mmol/ l, 1 mmol/ l und 10 mmol/ l H₂O₂ sowie 10 mmol/ l dG behandelt. In weiteren *wells* erfolgte eine Behandlung mit den verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen in

Kombination mit 10 mmol/ l dG. Dieser Versuchsansatz wurde ebenfalls einmal durchgeführt.

2.2.5 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test

Der MTT-Test ist eine kolorimetrische Methode zur quantitativen Erfassung der Stoffwechselaktivität von Säugetierzellen (Mosmann 1983). In vitalen Zellen wird das Tetrazoliumsalz MTT in einer NADPH-abhängigen Reaktion von mitochondrialen Dehydrogenasen zu Alkohol-löslichem Formazan reduziert. Die Intensität der dabei entstehenden bläulichen Färbung ist proportional zu der Menge aktiver mitochondrialer Dehydrogenasen und somit zu der Anzahl vitaler Zellen. Der Farbumschlag ins Bläuliche wird photometrisch bestimmt.

Der MTT-Test wurde verwendet, um die Vitalität von Kelly - und SK-N-SH-Zellen nach der Kurzzeitbehandlung mit den verschiedenen Substanzen (**siehe 2.2.4.1. – 2.2.4.4.**) bzw. die Zytotoxizität der Substanzen zu bestimmen.

Hierzu wurde nach der Inkubation mit der jeweiligen Substanz vorsichtig das Medium aus allen *wells* abgesaugt. In jedes *well* wurden 100 µl einer auf 37 °C angewärmten MTT-Lösung pipettiert. Die MTT-Lösung setzte sich im Verhältnis 1:10 aus MTT-Stammlösung und RPMI 1640 zusammen. Für die MTT-Stammlösung wurden 5 mg MTT in 1 ml PBS⁻ vollständig gelöst, die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt. Da MTT ein lichtempfindlicher Stoff ist, wurde lichtgeschützt gearbeitet. Nach 3 h Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Solubilisierungslösung gestoppt. Die Solubilisierungslösung setzte sich aus 82 % Isopropanol, 9 % Triton-X-100 und 9 % HCl (1 M) zusammen. Um die entstandenen Formazankristalle zu lösen und den Ansatz zu homogenisieren, wurden die 96-*well* Platten ca. 12 h auf einem Horizontalschüttler bewegt. Die photometrische Messung der Extinktionen erfolgte an einem ELISA-Reader. Die Testwellenlänge betrug 570 nm, die Referenzwellenlänge 630 nm.

Um den Zusammenhang zwischen Intensität der Färbung und Zahl der stoffwechselaktiven und damit vitalen Neuroblastomzellen für alle Experimente

zu standardisieren, wurde zusätzlich eine Eichkurve etabliert. Hierzu wurden 96-Loch-Platten mit unterschiedlichen Kelly und SK-N-SH Zellzahlen bestückt. Für Kelly wurden 25.000, 50.000, 100.000 und 150.000 Zellen/ 100 µl RPMI 1640/ *well* gewählt, für SK-N-SH 25.000, 50.000 und 100.000 Zellen/ 100 µl RPMI 1640/ *well*. Nach unmittelbar anschließender Zugabe von 10 µl MTT-Lösung/ *well* wurde der MTT-Test wie oben beschrieben durchgeführt. Der Versuchsansatz für die Eichkurven wurde je zweimal durchgeführt.

Für alle MTT-Tests wurden pro Behandlung mindestens sechs einzelne *wells* angesetzt. Die Extinktionen des jeweiligen Kontrollansatzes dienten als Referenz für unbehandeltes Zellwachstum und wurden in der Auswertung als 100 % eingesetzt. Stark abweichende Einzelwerte wurden gestrichen.

2.2.6. Photometrische Messung von Wasserstoffperoxid nach Thurman

Zellen verfügen über verschiedene Systeme zur Entgiftung von H₂O₂ wie das Glutathion-System (**Abb. 8.**) und das Enzym Katalase (**siehe 1.2.3.**).

In folgendem Versuchsteil sollten die Fähigkeiten von Kelly- und SK-N-SH-Zellen zur Entgiftung von H₂O₂ untersucht werden. Zur Bestimmung von H₂O₂ wurde die photometrische Methode nach Thurmann verwendet (Thurman et al. 1972). Durch Zugabe von Eisen-II-Sulfat (FeSO₄) und Kaliumthiocyanat (KSCN) entsteht in Anwesenheit von H₂O₂ ein brauner Farbkomplex. Die Tiefe der Färbung ist proportional zur Menge an vorhandenem H₂O₂ und wird photometrisch bestimmt.

Zunächst wurde je eine Eichkurve für die Intensität der Färbung in Abhängigkeit von der vorliegenden Konzentration an H₂O₂ sowie für die allmähliche Anflutung von H₂O₂ bei Produktion durch das Enzym Glukose-Oxidase (GO) erstellt. GO katalysiert folgende Reaktion:



Anschließend wurde die Entgiftung von H₂O₂ in Suspensionen von Kelly- und SK-N-H-Zellen nach Zugabe im Bolus sowie bei allmählicher Anflutung der

Substanz untersucht und der Zusammenhang mit Inkubationszeit und Zellzahl untersucht.

2.2.6.1. Versuchsansätze

Zunächst wurde eine Eichkurve für die Beziehung zwischen vorliegender H_2O_2 -Konzentration und Höhe der Extinktion erstellt. Eingesetzt wurden H_2O_2 -Konzentrationen bis 200 $\mu\text{mol/l}$ f.c. (0 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 75 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 200 $\mu\text{mol/l}$ f.c.). Die Lösungen wurden wie für die Inkubation von Kurzzeitkulturen mit H_2O_2 (**siehe 2.2.4.3.**) hergestellt. Zunächst wurde für jede H_2O_2 -Konzentration sowie den Leerwert ein Ansatz von 200 μl PBS^{++} und 10 mmol/l f.c. Glukose sowie 20 μl Trichloressigsäure (TCA) bzw. 200 μl RPMI 1640 und 20 μl TCA vorbereitet. Durch Zugabe von TCA wurde in den folgenden Versuchen durch Inaktivierung der GO und der zellulären Enzymsysteme die Reaktion abgestoppt. Hier wurden analoge Volumina von TCA zugesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. Verwendet wurde 50 %ige Trichloressigsäure (TCA), die sich im Verhältnis 1:1 aus 99 %iger TCA und Ampuwa zusammensetzte. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 10 μl einer der H_2O_2 -Lösungen bzw. mit 10 μl PBS^{++} zur Ermittlung des 0-Wertes versetzt. Die Bestimmung wurde in PBS^{++} mit 10 mmol/l f.c. Glukose einmal, in RPMI 1640 zweimal durchgeführt.

Anschließend wurde eine Eichkurve für die zeitabhängige Produktion von H_2O_2 durch GO in PBS^{++} mit 10 mmol/l f.c. Glukose und in RPMI 1640 erstellt. Zur Bestimmung des t_0 -Wertes wurde ein Ansatz von 200 μl Glukoselösung bzw. RPMI 1640 und 20 μl TCA mit 10 μl GO-Lösung versetzt. Für die Zeitwerte wurden fünf Ansätze von 200 μl Glukoselösung bzw. RPMI 1640 mit 10 μl GO-Lösung versetzt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zu den Zeitpunkten $t = 5, 10, 20, 40$ und 60 min wurde die Reaktion in je einem Ansatz durch Zugabe von 20 μl TCA beendet. Die GO-Lösungen wurden wie folgt hergestellt: GO wurde durch vorsichtiges Schütteln in PBS^{++} gelöst und sterilfiltriert. Zu Beginn wurden 5 mg GO in 1 ml PBS^{++} gelöst. Anschließend wurden mit PBS^{++} mehrere 1:10 Verdünnungen hergestellt. Die Glukose-Lösung wurde mit 10 μl

GO-Lösung in Konzentrationen von 5 mg GO/ ml, 0,5 mg GO/ ml, 0,05 mg GO/ ml, 5 µg GO/ ml, 0,5 µg GO/ ml und 0,05 µg GO/ ml inkubiert, RPMI 1640 mit 10 µl GO-Lösung in Konzentrationen von 5 µg GO/ ml, 1 µg GO/ ml, 0,5 µg GO/ ml und 0,05 µg GO/ ml. Der Versuchsansatz wurde für jede GO-Konzentration einmal durchgeführt.

Anschließend sollte die Kinetik von im Bolus zugegebenem H_2O_2 in Suspensionen von Kelly- und SK-N-SH-Zellen verfolgt werden. Hierzu wurden je 6 Ansätze unterschiedlicher Zellsuspensionen von Kelly und SK-N-SH (10.000, 100.000, 200.000 Zellen/ 200 µl RPMI 1640) mit 10 µl 2 mmol/ l H_2O_2 -Lösung versetzt. Die Endkonzentration in der Zellsuspension betrug 100 µmol/ l. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank und wurde nach den Zeitwerten $t = 0, 5, 10, 20, 40$ und 60 min durch Zugabe von 20 µl TCA in je einem *cup* pro Zelllinie und Zellkonzentration gestoppt. Für den 0-Wert erfolgte die Inaktivierung der Zellen durch Zugabe von 20 µl TCA vor Zugabe des H_2O_2 -Bolus.

Um eine allmähliche H_2O_2 -Anflutung zu simulieren wurden je 6 Ansätze à 200 µl unterschiedlicher Zellsuspensionen von Kelly und SK-N-SH (200.000 und 20.000 Zellen/ 200 µl RPMI 1640) mit 10 µl GO-Lösung (0,5 µl GO/ ml PBS^{++}) versetzt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 10, 30, 60, 90$ und 120 min wurde die Reaktion in einem *cup* pro Zelllinie und Zellkonzentration durch Zugabe von 20 µl TCA beendet. Der 0-Wert wurde wiederum durch Vorziehen der TCA-Gabe vor die Zugabe der GO-Lösung ermittelt.

2.2.6.2. Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration

Nach Abstoppen der Reaktion wurden die Versuchsansätze zentrifugiert (4 °C, 3 min, 15.000 g) und 200 µl des Überstands entnommen. Diese wurden für die Färbereaktion mit 50 µl 10 mmol/ l $FeSO_4$ -Lösung und 25 µl 2,5 mol/ l KSCN-Lösung versetzt. Zur Herstellung der $FeSO_4$ -Lösung wurden 27,8 mg $FeSO_4$ in 10 ml 0,001 molarer Salzsäure (HCl) gelöst. Die 0,001 mol/ l HCl setzte sich im Verhältnis 1:1000 aus 1 mol/ l HCl und Ampuwa zusammen. Für die KSCN-Lösung wurden 1215 mg KSCN in 5 ml PBS^{++} gelöst. Von den

entstandenen Lösungen wurden je 200 μl / well auf 96-Lochplatten gegeben und die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 490 nm im ELISA-Reader gemessen (**Tab. 2.**).

Tab. 2.: Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration

Versuchsvorgang	Zugabe
Abstoppen der Reaktion	20 μl 50 % Trichloressigsäure zu 210 μl Versuchsansatz
Zentrifugation (4 °C, 3 min, 15.000 g)	
Färbereaktion	200 μl Überstand + 50 μl 10 mmol/ l FeSO_4 + 25 μl 2,5 M KSCN
Pipettieren auf 96-Loch-Platten (200 μl / well), Bestimmung der Extinktion im Elisa-Reader bei 490 nm	

2.2.7. Versuche zum Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose auf zellulären Energiestoffwechsel

Anhand von Messungen zu Glukoseverbrauch, Laktatproduktion und Sauerstoffverbrauch durch Kelly- und SK-N-SH-Zellen sollte der Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose (dG) auf den zellulären Energiestoffwechsel analysiert werden.

Hierzu wurden Kelly- und SK-N-SH-Zellen in Lösungen von PBS^{++} bzw. RPMI 1640 mit unterschiedlichem Gehalt an Glukose und dG inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt und die Konzentrationen von Glukose und Laktat bestimmt. Zeitgleich wurde in parallelen Ansätzen derselben Zellsuspensionen der Sauerstoffverbrauch bestimmt.

Verwendet wurden für Kelly und SK-N-SH Ansätze in PBS^{++} mit 2 Mio Zellen pro ml PBS^{++} und Glukosekonzentrationen von 0, 1 und 5 mmol/ l Glukose (f.c.) sowie Ansätze von 2 Mio Zellen pro ml PBS^{++} mit Glukosekonzentrationen von 0, 1 und 5 mmol/ l Glukose (f.c.) und jeweils 1 mmol/ l dG (f.c.) (**Tab. 3.1.**).

Ansätze in RPMI 1640 enthielten 2 Mio Zellen pro ml RPMI 1640 mit und ohne 1 mmol/ l dG (f.c.) (**Tab. 3.2.**).

Hergestellt wurden die Lösungen in PBS⁺⁺ mit 0 mmol/ l Glukose, 1 mmol/ l Glukose und 5 mmol/ l Glukose, indem Zellsuspensionen von 4 Mio Zellen/ ml im Verhältnis 1:1 mit PBS⁺⁺ bzw. einer Glukose-Lösung von 2 mmol/ l oder 10 mmol/ l Glukose versetzt wurden. Durch Lösen in PBS⁺⁺ wurde eine 20 mmol/ l Glukose-Stocklösung hergestellt und mit PBS⁺⁺ zu Lösungen von 10 mmol/ l und 2 mmol/ l verdünnt. Die Lösungen in PBS⁺⁺ ohne Glukose bzw. mit 1 mmol/ l Glukose und 5 mmol/ l Glukose sowie jeweils 1 mmol/ l dG wurden hergestellt, indem eine Zellsuspension von 4 Mio Zellen/ ml im Verhältnis 2:1:1 mit PBS⁺⁺, 4 mmol/ l bzw. 20 mmol/ l Glukoselösung sowie 4 mmol/ l dG-Lösung versetzt wurde. Durch Lösen in PBS⁺⁺ wurde eine 4 mmol/ l dG-Lösung hergestellt.

Für die Lösungen in RPMI 1640 wurden eine Lösung von 4 Mio Zellen/ ml RPMI 1640 im Verhältnis 1:1 mit RPMI 1640 bzw. 2 mmol/ l dG-Lösung versetzt. Durch Lösen von dG in RPMI 1640 wurde die 2 mmol/ l dG-Lösung hergestellt. Die Zellsuspensionen sowie alle Lösungen wurden vor Zusammengeben über 15 min bei 37 °C im Wasserbad temperiert.

Zur Bestimmung des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion wurden die Ansätze in PBS⁺⁺ bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, die Ansätze in RPMI 1640 bei 37 °C im Brutschrank. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 30, 60, 120$ und 240 min wurden nach sorgfältiger Resuspension jeweils 250 µl Suspension entnommen und zum Abtöten der Zellen und Entfernen von Zellbestandteilen zentrifugiert (4 °C, 2 min, 1000 g). Aus dem Überstand wurden 2 Aliquots à 100 µl entnommen und für die spätere Bestimmung von Glukose- und Laktatwerten bei - 20 °C eingefroren. Die Glukosewerte aus der Suspension von SK-N-SH mit 1 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l 2-Deoxy-D-Glukose wurden mittels Blutzuckermessgerät bestimmt, alle übrigen Glukosewerte und sämtliche Laktatwerte photometrisch.

Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurden zeitgleich in parallelen Ansätzen derselben Zellstammsuspensionen die Sauerstoffverbrauchsmessungen gestartet. Es wurde über mindestens 30 min in 5-minütigen Abständen der Sauerstoffgehalt in den verschiedenen Suspensionen bestimmt. Genaue Daten zu Geräten und

Methodik der Sauerstoffverbrauchsmessungen sind der Dissertation von Marena Niewisch „Titel“ zu entnehmen (Niewisch 2009).

Tab. 3.: Suspensionen von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in PBS⁺⁺ (3.1.) und RPMI 1640 (3.2.) zur Bestimmung des Einflusses von 2-Deoxy-D-Glukose auf den zellulären Energiestoffwechsel

3.1.

2 Mio. Kelly- bzw. SK-N-SH-Zellen in PBS⁺⁺		
Ansatz	Glukosegehalt (f. c.)	2-Deoxy-D-Glukosegehalt (f. c.)
1	0 mmol/ l	---
2	1 mmol/ l	---
3	5 mmol/ l	---
4	---	1mmol/ l
5	1 mmol/ l	1 mmol/ l
6	5 mmol/ l	1 mmol/ l

3.2.

2 Mio Kelly- bzw. SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640		
Ansatz	Glukosegehalt (f. c.)	2-Deoxy-D-Glukosegehalt (f. c.)
1	ca. 11 mmol/ l	---
2	ca. 11 mmol/ l	1 mmol/ l

2.2.8. Bestimmung von Glukose und Laktat

Um Aufschlüsse über den Stoffwechsel von Kelly und SK-N-SH unter AA, DCA und dG Behandlung zu gewinnen, wurden Glukose- und Laktat-Konzentrationen in folgenden Proben bestimmt:

- (1) RPMI 1640
- (2) Zellkulturüberstände von Kelly (+/ -) sowie SK-N-SH (+/ -) (**siehe 2.2.3.**)
- (3) Überstände aus dem MTT-Test mit DCA (**siehe 2.2.4.4.**)
- (4) Versuchsansätze zur Untersuchung des Einflusses von dG auf den zellulären Energiestoffwechsel (**siehe 2.2.7.**)

Die Glukosewerte der Proben **(3)** und **(4)** wurden mittels Blutzuckermessgerät bestimmt, die Glukosewerte der Proben **(1)** und **(2)** photometrisch. Alle Laktatwerte wurden photometrisch bestimmt.

2.2.8.1. Photometrische Glukosebestimmung

Zur photometrischen Bestimmung von Glukose wurden enzymatische Reaktionen verwendet: Glukose und Adenosintriphosphat (ATP) werden durch das Enzym Hexokinase (Hk) zu Glukose-6-Phosphat (G-6-P) und Adenosindiphosphat (ADP) umgesetzt **(1)**. Glukose-6-Phosphat wird durch das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) unter Reduktion von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP⁺) zu D-Gluconat-6-Phosphat oxidiert **(2)**. Die in der Reaktion entstandene Menge an reduziertem NADPH (NADPH/ H⁺) ist zur vorhandenen Menge an Glukose äquivalent und wird photometrisch bestimmt.



Zur Bestimmung wurden definierte Volumina von Lösung 1 (**siehe Tab. 4.**), Probe und Ampuwa in Küvetten pipettiert und sorgfältig gemischt. Nach 3 min erfolgte die Messung der Extinktion E_1 . Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Suspension 2 mit Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydro-

genase gestartet. Nach 15 min Inkubationszeit wurde die Extinktion E_2 gemessen (**Tab. 4.**).

Alle Bestimmungen erfolgten in Halbmikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke gegen eine Wellenlänge von 365 nm bei Zimmertemperatur. Bei jeder Bestimmungsreihe wurde ein Leerwert mitgeführt.

Tab. 4.: Pipettierschema für die photometrische Bestimmung von Glukose

	Leerwert/ Glukosegehalt der Proben (f. c.)			
Zugabe (ml)	Leerwert	0 und 5 mmol/ l Glukose	1 mmol/ l Glukose	> 10 mmol/ l Glukose
Lösung 1*	0,25	0,25	0,25	0,25
Probe		0,025	0,05	0,012
Ampuwa	0,5	0,475	0,45	0,488
Mischen, nach ca. 3 min Messung von E_1 ; Starten der Reaktion durch Zugabe von				
Suspension 2**	0,005	0,005	0,005	0,005
Mischen, nach ca.15 min Messung von E_2				

* Triethanolamin-Puffer, NADP, ATP und $MgSO_4$ gelöst in Ampuwa

** Suspension mit Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Alle Volumina sind in ml angegeben.

Aus den gemessenen Extinktionen E_1 und E_2 wurde ΔE errechnet und je nach eingesetztem Probevolumen durch zwei dividiert (1 mmol/ l Glukose f.c.) oder mit zwei multipliziert (ab 10 mmol/ l Glukose f.c.) **(1)**. Dann erfolgte die Berechnung des Glukosewertes in g/ l **(2)** und die Umrechnung in mmol/ l **(3)**.

- (1) $\Delta E = [(E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}] (\div 2 \text{ zur Berechnung für } 1 \text{ mmol/ l Glukose; } \times 2 \text{ zur Berechnung ab } 10 \text{ mmol/ l Glukose})$
- (2) $c_{\text{Glukose}} (\text{g/ l}) = \Delta E_{\text{Glukose}} \times 5,441 / \epsilon$
 $\epsilon = 3,5 (\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$
- (3) $c_{\text{Glukose}} (\text{mmol/ l}) = c_{\text{Glukose}} (\text{g/ l}) \times 5,55$

2.2.8.2. Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose auf die photometrische Glukosebestimmung

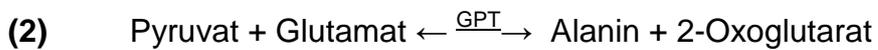
Ein Einfluss von dG auf die enzymatische Bestimmung von Glukose sollte ausgeschlossen werden.

Hierzu wurden die Glukosewerte in einer Lösung von PBS⁺⁺ mit 1 mmol/ l Glukose oder 1 mmol/ l dG sowie in einer Lösung von PBS⁺⁺ mit 1 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l dG über 15 min in ein- bis zweiminütigen Abständen mittels der photometrischen Methode bestimmt.

Durch Lösen von 1,08 mg Glukose in 3 ml PBS⁺⁺ bzw. 0,99 mg dG in 3 ml PBS⁺⁺ wurden eine 2 mmol/ l Glukoselösung und eine 2 mmol/ l dG-Lösung hergestellt. Die 1 mmol/ l Glukose- und dG-Lösungen setzten sich im Verhältnis 1:1 aus 2 mmol/ l Glukose- bzw. 2 mmol/ l dG-Lösung und PBS⁺⁺ zusammen. Die Lösung mit 1 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l dG bestand im Verhältnis 1:1 aus 2 mmol/ l Glukose- und der 2 mmol/ l dG-Lösung. Für die Bestimmung wurden jeweils 100 µl aus dem Ansatz entnommen, pipettiert wurde gemäß **Tab. 4..**

2.2.8.3. Photometrische Laktatbestimmung

Zur photometrischen Laktatbestimmung wurden enzymatische Reaktionen verwendet. Laktat wird durch das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) unter Reduktion von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) zu Pyruvat oxidiert **(1)**. Das Gleichgewicht der Reaktion kann durch Zugabe von Glutamat und des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) von der Laktat-Seite auf die Seite von Pyruvat verschoben werden **(2)**. Die gebildete NADH-Menge ist zur Laktatmenge äquivalent und wird photometrisch gemessen.



Zunächst wurden definierte Volumina von Lösung 1 (**siehe Tab. 4.**), von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Lyophilisat und Glutamat-P-Transaminase-Suspension, der Probe und Ampuwa in die Küvette gegeben und sorgfältig gemischt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die Extinktion E_1 gemessen. Durch Zugabe der Laktatdehydrogenase-Lösung wurde die Reaktion gestartet und nach 30 min die Extinktion E_2 gemessen (**Tab. 5.**). Alle Messungen wurden in Halbmikroküvetten von 1 cm Schichtdicke gegen eine Wellenlänge von 365 nm bei Zimmertemperatur durchgeführt. Bei jeder Messreihe wurde ein Leerwert mitgeführt.

Tab. 5.: Pipettierschema für die photometrische Bestimmung von Laktat

Zugabe (ml)	Leerwert	Probe
Lösung 1 *	0,333	0,333
Lösung 2 **	0,067	0,067
Suspension 3 ***	0,007	0,007
Probe		0,100
Ampuwa	0,333	0,233
Mischen, nach ca. 5 min Messung von E ₁ ; Starten der Reaktion durch Zugabe von		
Lösung 4****	0,007	0,007
Mischen, nach ca.30 min Messung von E ₂ ;		

* Glycylglycinpulver, Glutaminsäure

** Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Lyophilisat

*** Glutamat-P-Transaminase-Suspension

**** Laktat-Dehydrogenase-Lösung

Alle Volumina sind in ml angegeben.

Zur Berechnung des Laktatwertes wird zunächst aus den gemessenen Extinktionen E₁ und E₂ Δ E errechnet und aufgrund des im Verhältnis zum Volumen des Bestimmungsansatzes dreifachen Volumens der Probe durch drei dividiert **(1)**. Anschließend erfolgte die Berechnung des Laktatwertes in g/ l **(2)** und die Umrechnung in mmol/ l **(3)**.

$$(1) \quad \Delta E = [(E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}] \div 3$$

$$(2) \quad c_{\text{Laktat}} (\text{g/ l}) = \Delta E_{\text{Laktat}} \times 2,018 / \epsilon$$

$$\epsilon = 3,4 (\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$$

$$(3) \quad c_{\text{Laktat}} (\text{mmol/ l}) = c_{\text{Laktat}} (\text{g/ l}) \times 11,1$$

2.2.9. Bestimmung von Ascorbat

2.2.9.1. Bestimmung von Ascorbat in *Fetal Calf Serum*

Es sollte die Konzentration von Ascorbat (AA) in Fetal Calf Serum (FCS) sowie deren Abnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bestimmt sowie in Zusammenhang mit der Umgebungstemperatur gesetzt werden. Hierzu wurde frisch aufgetautes FCS auf zwei Aliquots aufgeteilt, von denen das eine über 3 h bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt wurde, das andere über 3 h bei 4 °C im Kühlschrank. Anschließend wurde photometrisch der AA-Gehalt bestimmt. Die Bestimmung wurde zweimal durchgeführt.

2.2.9.2. Stabilität von Ascorbat in der Zellkultur

Es sollte die Stabilität von AA in der Zellkultur untersucht werden. Hierzu wurden unmittelbar nach einer AA-Behandlung sowie nach 30 h Proben von 1 ml aus dem Zellkulturmedium entnommen und für die spätere photometrische Bestimmung von AA bei – 20 °C eingefroren. Die Bestimmung wurde exemplarisch für eine Kultur von SK-N-SH (+) durchgeführt, die photometrische Bestimmung erfolgte in 1:9 mit Ampuwa verdünnten Proben.

2.2.9.3. Photometrische Bestimmung von Ascorbat

Zur photometrischen AA-Bestimmung wurden enzymatische Reaktionen genutzt. AA und weitere Substanzen ($x-H_2$) reduzieren das Tetrazoliumsalz MTT bei einem pH-Wert von 3,5 unter Verwendung von 5-Methylphenazinium-methosulfat (PMS) als Elektronenüberträger zu einem Formazan. Im Probeansatz werden die reduzierenden Substanzen gemessen **(1)**. In einem Probeleerwert-Ansatz wird in Anwesenheit von Luft-Sauerstoff durch Oxidation mit Ascorbat-Oxidase (AAO) von den reduzierenden Substanzen der Anteil von AA entfernt. Das entstehende DHA reagiert nicht mit MTT **(2)**. Die Differenz zwischen den Extinktionsdifferenzen von Probe und Probe-Leerwert ist der in der Probe enthaltenen AA-Menge äquivalent. MTT-Formazan ist Messgröße und wird photometrisch bestimmt.

- (1) Ascorbat ($x\text{-H}_2$) + MTT^+ $\xrightarrow{\text{PMS}}$ Dehydroascorbat (x) + MTT-Formazan + H^+
- (2) Ascorbat + $\frac{1}{2} \text{O}_2$ $\xrightarrow{\text{AAO}}$ Dehydroascorbat + H_2O

Es wurden definierte Volumina von Lösung 1 (**siehe Tab. 6.**), Ampuwa und Probe in die Küvette gegeben. Die Leerwert-Ansätze wurden jeweils mit einem AAO-Spatel versetzt. Die Proben wurden 6 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. In die Leerwert-Ansätze wurde währenddessen durch Umrühren mit dem AAO-Spatel (alle 2 min) der für Oxidation nötige Luftsauerstoff eingebracht. Nach Messung der Extinktion E_1 wurde durch Zugabe von „Lösung 2“ die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C wurde die Extinktion E_2 gemessen (**Tab. 6.**). Zur Bestimmung der AA-Werte in FCS wurden alle Volumina sowie der AAO-Spatel halbiert. Alle Messungen erfolgten in Halbmikroküvetten von 1 cm Schichtdicke bei Zimmertemperatur gegen eine Wellenlänge von 578 nm. Für jede Probe wurden ein Proben-Ansatz und ein Probeleerwert-Ansatz geführt.

Tab. 6.: Pipettierschema für die photometrische Bestimmung von Ascorbat

Zugabe (ml)	Leerwert	Probe
Lösung 1 *	0,25	0,25
Ampuwa	0,375	0,375
Probe	0,025	0,025
AAO-Spatel	0,5	---
Mischen, bei 37 °C für 6 min inkubieren; Probeleerwert alle 2 min mit AAO-Spatel umrühren; Messung von E_1		
Lösung 2 **	0,025	0,025
Mischen, bei 37 °C für 15 min lichtgeschützt inkubieren; direkt aufeinanderfolgende Messung von E_2 von Probe und Probeleerwert		

* Natriumphosphat/Citrat – Puffer (pH ca. 3,5) und MTT

** 5-Methylphenaziniummethosulfat-Lösung

Alle Volumina sind in ml angegeben.

Zur Berechnung des AA-Wertes wurde aus den Extinktionen E_1 und E_2 zunächst ΔE berechnet **(1)**. Anschließend wurden AA-Wert in g/ l **(2)** bzw. mmol/ l **(3)** bestimmt.

(1) $\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$ ($\times 10$ zur Berechnung der Ascorbatstabilität in der Zellkultur)

(2) $C_{\text{Ascorbat}} \text{ (g/ l)} = \Delta E_{\text{Ascorbat}} \times 0,2814$

(3) $C_{\text{Ascorbat}} \text{ (mmol/ l)} = C_{\text{Ascorbat}} \text{ (g/ l)} \times 5,68$

3. Ergebnisse

3.1. Ascorbat als zytotoxisches Agens

Hochdosiertes Ascorbat (AA) besitzt gegenüber Tumorzellen eine direkt zytotoxische Wirkung, die auf die Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zurückzuführen ist (Chen et al. 2005, Chen et al. 2007) und bereits im Mausmodell gezeigt werden konnte (Chen et al. 2008) (**siehe 1.2.**). H_2O_2 als reaktive Sauerstoffverbindung verursacht oxidative Schäden an Zellmembranen und intrazellulären Strukturen (**siehe 1.2.4.**) und kann von Zellen durch das Enzym Katalase (**siehe 1.2.3.**) oder das Glutathion-System entgiftet werden (**Abb. 11.**).

Als Grundlage für die folgende Studie wurde zunächst eine Eichkurve für die MTT-Färbung von Neuroblastomzellen erstellt. Im ersten Teil der Studie wurde mit Hilfe des MTT-Tests die Wirkung von AA auf humane Neuroblastomzelllinien analysiert und mit derjenigen von Dehydroascorbat (DHA), der oxidierten Form von AA, verglichen. Zudem wurde die Wirkung von H_2O_2 sowie die Entgiftung der Substanz durch Neuroblastomzellen untersucht.

3.1.1. MTT-Färbung von Neuroblastomzellen

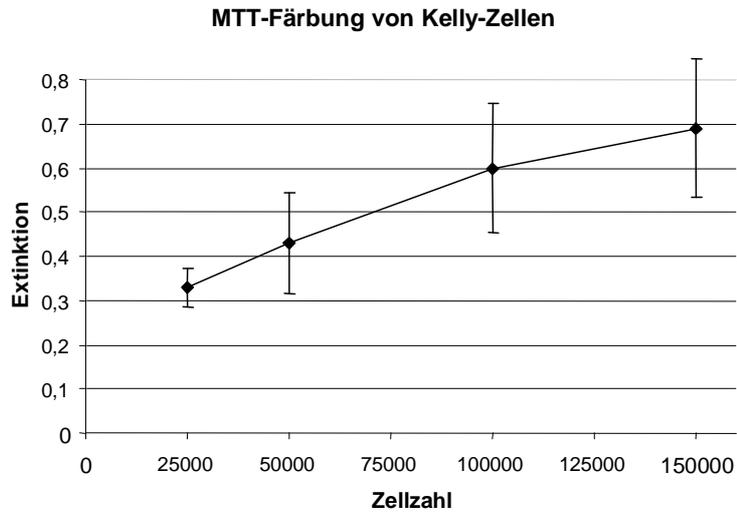
Zunächst wurde eine Eichkurve für die Korrelation zwischen Intensität der MTT-Färbung (Extinktion) und der Anzahl vitaler Zellen erstellt. Hierfür wurde der MTT-Test für Zellzahlen von Kelly zwischen 25.000 und 150.000 Zellen und SK-N-SH zwischen 25.000 und 100.000 Zellen durchgeführt. Die gemessenen Extinktionen wurden anschließend gegen die Zellzahl aufgetragen (**Abb. 17.**).

Bei Kelly wurde die Färbung beginnend bei einem Extinktionswert von 0,33 für 25.000 vitale Zellen mit steigender Zellzahl kontinuierlich intensiver. Für 150.000 Zellen wurde ein Extinktionswert von 0,69 gemessen.

Bei SK-N-SH wurden Extinktionswerte zwischen 0,24 für 25.000 und 0,55 für 100.000 Zellen gemessen. Auch hier wurde mit steigender Zellzahl eine kontinuierlich zunehmende Intensität der Färbung verzeichnet.

Angaben über die Korrelation zwischen Intensität der Färbung und Anzahl vitaler Zellen wurden für alle folgenden MTT-Färbungen aus **Abb. 17.** entnommen.

A



B

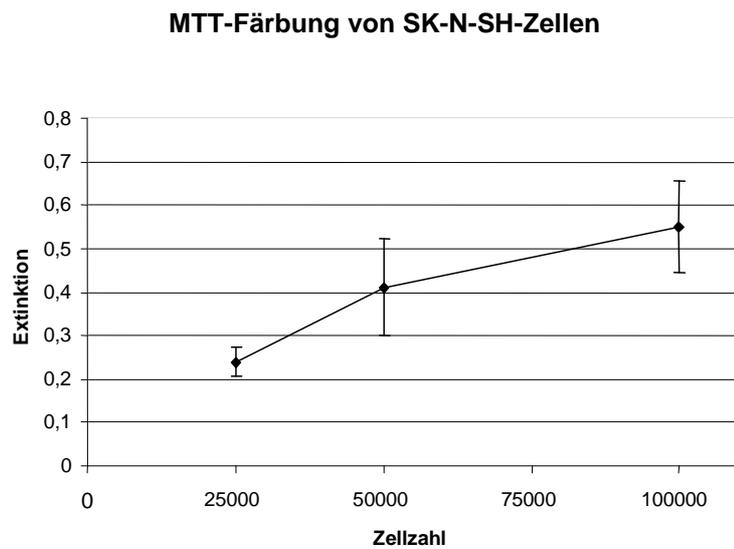


Abb. 17.: MTT-Färbung von Kelly- (**A**) und SK-N-SH-Zellen (**B**). Zellsuspensionen von Kelly in Konzentrationen von 25.000, 50.000, 100.000 und 150.000 Zellen/ 100 µl RPMI 1640 und SK-N-SH in Konzentrationen von 25.000, 50.000 und 100.000 Zellen/ 100 µl RPMI 1640 wurden mit je 10 µl MTT-Lösung versetzt. Anschließend wurde der MTT-Test durchgeführt und die Extinktionen gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (\pm SD) aus drei unabhängigen Fünffachbestimmungen ($n = 3$).

3.1.2. Kurzzeitbehandlung von Neuroblastomzelllinien mit Ascorbat

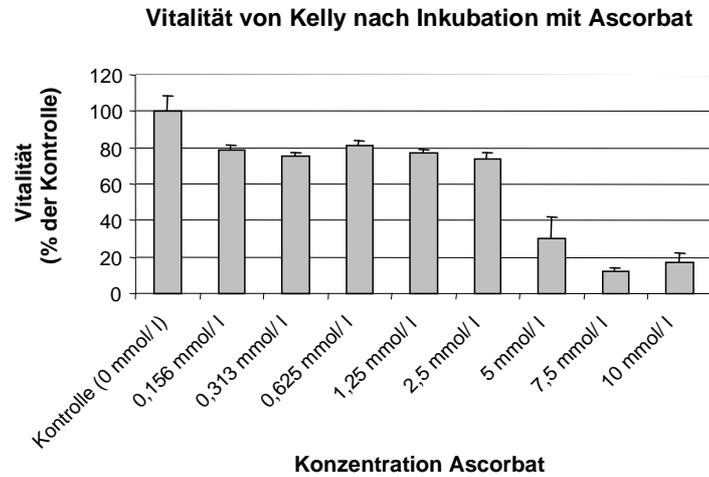
3.1.2.1. Kurzzeitbehandlung mit Ascorbat: Orientierungsversuch zur Substanzwirkung

Um den Einfluss von AA auf Kelly und SK-N-SH zu untersuchen, wurden beide Zelllinien für 72 h mit unterschiedlichen AA-Konzentrationen zwischen 0,156 und 10 mmol/ l f.c. behandelt (**Abb. 18.**). Die Zellvitalität wurde anschließend mittels MTT-Test bestimmt.

In Konzentrationen zwischen 0,156 und 2,5 mmol/ l bewirkte AA bei Kelly eine Wachstumshemmung um ca. 20 – 25 %. Bei Dosissteigerung bis 10 mmol/ l nahm die AA-induzierte Toxizität zu. So ging die Zellvitalität bei Erhöhung von 2,5 auf 5 mmol/ l von ca. 75 auf 30 % zurück ($p = 0,004$). Bei 7,5 und 10 mmol/ l wurden jeweils weniger als 20 % vitale Zellen gemessen. In den Kontrollen lag ein lockerer Zellrasen von weniger als 25.000 Zellen vor (**siehe Abb. 17.**).

Auf SK-N-SH wirkte AA im Bereich zwischen 0,156 und 2,5 mmol/ l mit einer Wachstumsreduktion um bis zu ca. 15 % schwach zytotoxisch. Ab 2,5 mmol/ l nahm die Zytotoxizität der Substanz konzentrationsabhängig zu. Nach Behandlung mit 5 mmol/ l lagen noch mehr als 70 % vitale Zellen vor. Bei Erhöhung auf 7,5 mmol/ l sank die Zellvitalität auf ca. 30 % ($p = 2,6 \times 10^{-6}$), bei 10 mmol/ l auf ca. 10 % ($p = 0,03$). In den Kontrollen lagen dünne Kulturen von weniger als 25.000 Zellen vor (**siehe Abb. 17.**).

A



B

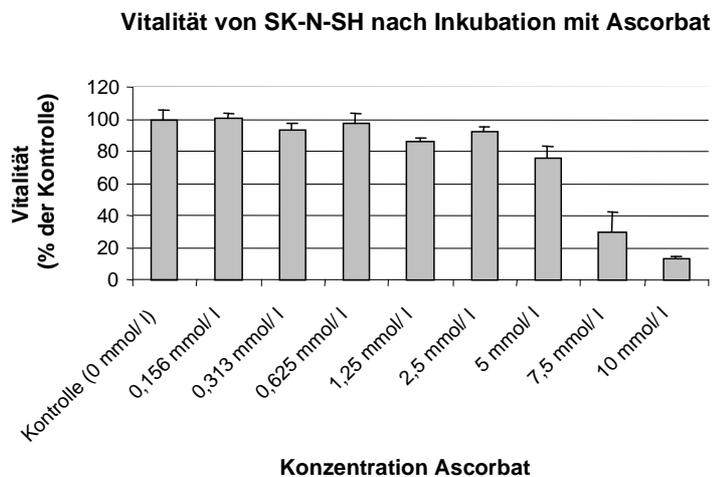


Abb. 18.: Einfluss von Ascorbat (AA) auf die Vitalität von Kelly- (**A**) und SK-N-SH-Zellen (**B**). Kelly und SK-N-SH wurden für 72 h mit AA in Konzentrationen von 0,156, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 7,5 und 10 mmol/l f.c. behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 % (Extinktion der Kontrollen: Kelly: 0,24 \approx < 25.000 Zellen; SK-N-SH: 0,19 \approx < 25.000 Zellen). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (\pm SD) aus einer Sechsfachbestimmung.

3.1.2.2. Kurzzeitbehandlung mit Ascorbat: Zusammenhang zwischen Substanzwirkung und Zellzahl sowie Substanzwirkung und Vorinkubation mit physiologischen Ascorbatkonzentrationen

Wird die zytotoxische Wirkung von AA über die Entstehung von H_2O_2 vermittelt (Chen et al. 2005), ist ein Zusammenhang zwischen behandelter Zellzahl und Toxizität zu erwarten: Aufgrund des größeren Pools H_2O_2 -abbauender Systeme sollte bei Erhöhung der behandelten Zellzahl die Toxizität identischer AA-Konzentrationen sinken.

Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurden unterschiedlich dichte Kulturen von Kelly und SK-N-SH gezüchtet. Von beiden Zelllinien wurden sowohl Zellen aus Zellkulturen, die über mindestens 30 Tage alle 48 h mit 50 $\mu\text{mol/l}$ f.c. Ascorbat versetzt worden waren (Kelly (+); SK-N-SH (+)) (**siehe 2.2.3.**), als auch Zellen aus ascorbatfreiem Medium (Kelly (-); SK-N-SH (-)) verwendet. So sollte zusätzlich analysiert werden, ob sich in Anwesenheit von physiologischen AA-Konzentrationen kultivierte Zellen hinsichtlich ihrer Sensibilität gegenüber hochdosiertem AA von Zellen aus ascorbatfreiem Medium unterscheiden. Es erfolgte eine 48-stündige Behandlung mit unterschiedlichen AA-Konzentrationen zwischen 0,156 und 5 mmol/l f.c. (**Abb. 20.1.** und **Abb. 20.2.**). Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt.

Unter mikroskopischer Kontrolle zeigte sich je nach ausgesäter Zellzahl unterschiedlich dichter Zellbewuchs in den Kontrollwells der Kulturen von Kelly (-) und Kelly (+) sowie SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+).

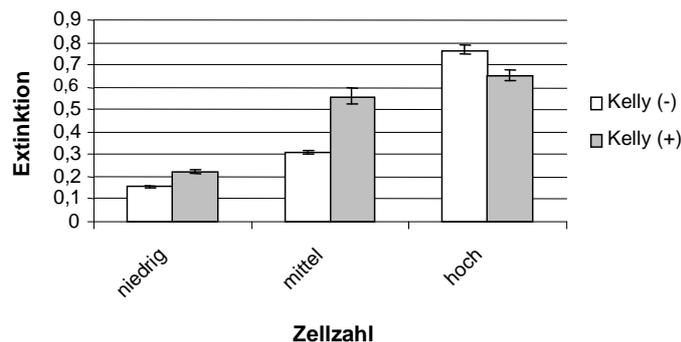
Der optische Eindruck bestätigte sich bei MTT-Färbung. Für Kelly (-) lagen in der dünnsten Kontrollkultur weniger als 10.000 vitale Zellen vor, die dichteste Kultur bestand aus mehr als 150.000 Zellen. Die Dichte des Zellrasens in den Kontrollen von Kelly (+) bewegte sich zwischen weniger als 10.000 Zellen und ca. 130.000 Zellen (**Abb. 19. (A)**). Die Kulturen in den Kontrollen von SK-N-SH (-) bestanden aus weniger als 20.000 bis 90.000 Zellen, diejenigen von SK-N-SH (+) aus weniger als 25.000 bis über 100.000 Zellen (**Abb. 19. (B)**).

Der Zellbewuchs in den Kontrollen korrespondierender Ansätze von Kelly (-) und Kelly (+) bzw. SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+) unterschied sich jedoch in

allen Fällen um mindestens 10.000 Zellen (**Abb. 19.**). Ein Einfluss der behandelten Zellzahl auf die Substanztoxizität konnte folglich nicht ausgeschlossen werden und es ließen sich keine Aussagen bezüglich einer unterschiedlichen Sensibilität von Zellen aus AA- und Lösungsmittel-Dauerkulturen gegenüber der AA-Kurzzeitbehandlung treffen.

A

Zellzahlen in den Kontrollwells von Kelly (-) und Kelly (+)
im Vergleich



B

Zellzahlen in den Kontrollwells von SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+)
im Vergleich

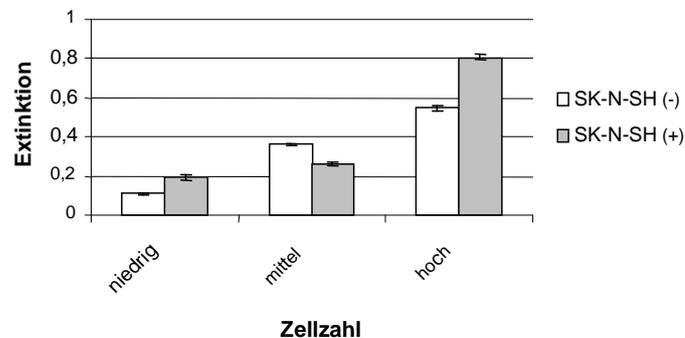
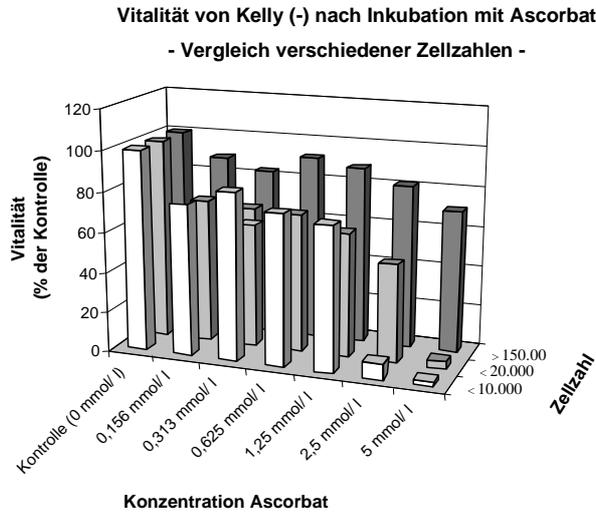


Abb. 19.: Zellzahlen in den Kontrollwells von Kelly(-)-Zellen und Kelly(+)-Zellen (**A**) bzw. SK-N-SH(-)-Zellen und SK-N-SH(+)-Zellen (**B**) im Vergleich. Zellkulturen von Kelly (+) und SK-N-SH (+) wurden vor Verwendung über 30 d alle 48 h mit 50 $\mu\text{mol/l}$ AA versetzt, Kulturen von Kelly (-) und SK-N-SH (-) mit entsprechenden Mengen des Lösungsmittels. Nach dem Aufbringen auf 96-well-Platten wurden die Zellkulturen in den Kontrollwells unter entsprechenden Bedingungen weiterkultiviert. Nach Inkubation der Versuchswells mit unterschiedlichen AA-Konzentrationen wurde zeitgleich in allen wells die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Gezeigt sind die Extinktionen und Standardabweichungen (\pm SD) aus einer Zwölfachbestimmung für die Kontrollwells ($n = 1$).

Eine Behandlung mit steigenden Ascorbatkonzentrationen wirkte auf die Kulturen unterschiedlicher Dichte von Kelly (-) und Kelly (+) sowie SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+) zunehmend zytotoxisch (**Abb. 20.1.** und **Abb. 20.2.**).

Für alle Zelllinien wurde darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen der Toxizität der Substanz und der behandelten Zellzahl deutlich. Bei Erhöhung der behandelten Zellzahl sank die zytotoxische Wirkung identischer Ascorbatkonzentrationen. Dieser Zusammenhang trat bei Inkubation mit hohen Ascorbatkonzentrationen (ab 2,5 mmol/l) besonders deutlich hervor.

A



B

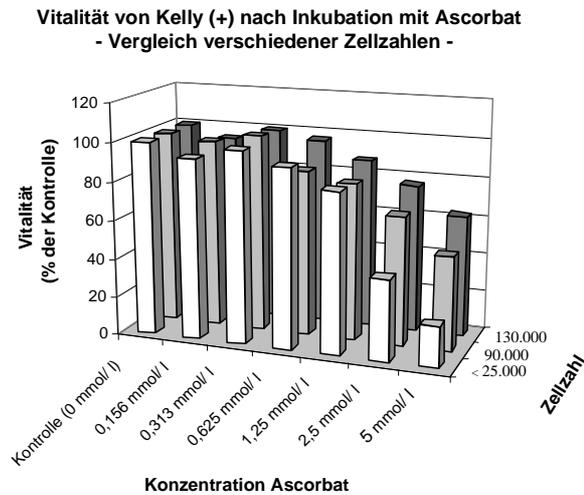
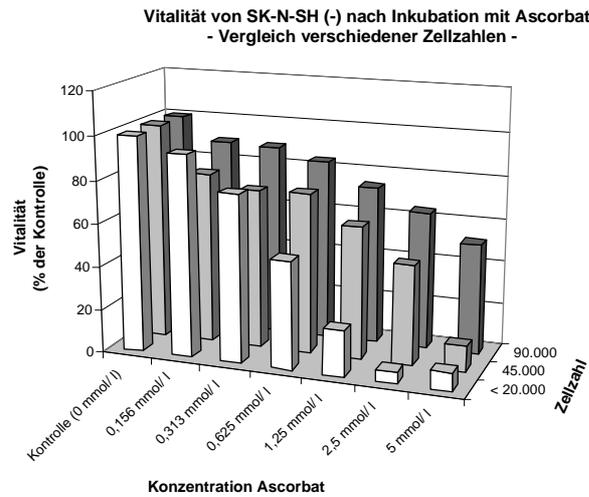


Abb. 20.1.: Einfluss von Ascorbat (AA) auf die Vitalität von Kelly(-)-Zellen (A) und Kelly-(+)-Zellen (B). Vergleich verschiedener Zellzahlen. Die Zellkulturen wurden vor Verwendung über 30 d alle 48 h mit 50 µmol/l f.c. AA (Kelly (+)) oder entsprechenden Volumina Lösungsmittels (Kelly (-)) versetzt. Unterschiedliche Zellzahlen beider Zelllinien wurden für 48 h mit 0,156, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5 und 5 mmol/l f.c. AA behandelt. Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 % (Extinktion der Kontrollen: Kelly (-): 0,157 ≈ < 10.000 Zellen; 0,312 ≈ < 20.000 Zellen; 0,767 ≈ > 150.000 Zellen. Kelly (+): 0,222 ≈ < 25.000 Zellen; 0,559 ≈ 90.000 Zellen; 0,652 ≈ 130.000 Zellen). Pro Zelllinie sind die Werte aus drei Versuchsdurchführungen dargestellt. Durchgeführt wurden für Kelly (-) und Kelly (+) jedoch je fünf unabhängige Sechsfachbestimmungen (n = 5). Die Daten aller Versuchsdurchführungen, die p-Values sowie Standardabweichungen (Kelly (-) 0,5 – 8 %, Kelly (+) 0,5 – 7 %) wurden im Anhang aufgelistet.

A



B

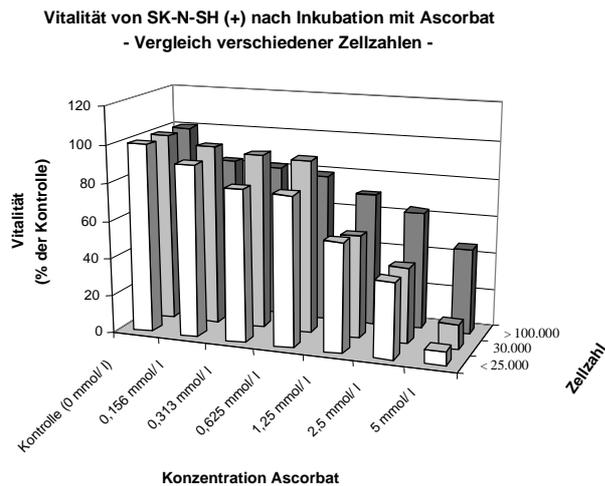


Abb. 20.2.:

Einfluss von Ascorbat (AA) auf die Vitalität von SK-N-SH(-)-Zellen (A) und SK-N-SH(+)-Zellen (B). Vergleich verschiedener Zellzahlen. Die Zellkulturen wurden vor Verwendung über 30 d alle 48 h mit 50 $\mu\text{mol/l}$ f.c. AA (SK-N-SH (+)) oder entsprechenden Volumina Lösungsmittel (SK-N-SH (-)) versetzt. Unterschiedliche Zellzahlen beider Zelllinien wurden für 48 h mit 0,156, 0,313, 0,625, 1,25, 2,5 und 5 mmol/l f.c. AA behandelt. Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 % (Extinktion der Kontrollen: SK-N-SH (-): 0,108 \approx < 20.000 Zellen; 0,360 \approx 45.000 Zellen; 0,55 \approx 90.000 Zellen. SK-N-SH (+): 0,195 \approx < 25.000 Zellen; 0,26 \approx 30.000 Zellen; 0,804 \approx > 100.000 Zellen.). Pro Zelllinie wurden die Werte aus drei Versuchsdurchführungen dargestellt. Durchgeführt wurden für SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+) je sieben unabhängige Sechsfachbestimmungen ($n = 7$). Die Daten aller Versuchsdurchführungen, die p-Values sowie Standardabweichungen (SK-N-SH (-) 0,5 – 12,5 %, SK-N-SH (+) 1 – 20 %) wurden im Anhang aufgelistet.

3.1.3. Kurzzeitbehandlung mit Ascorbat im Vergleich zu Dehydroascorbat

Dehydroascorbat entsteht durch Oxidation von Ascorbat und unterscheidet sich von AA durch die fehlende Fähigkeit zur Abgabe zweier Wasserstoffatome. Somit ist es kein „prodrug“ für die Bildung von zytotoxischem H_2O_2 .

Um die Wirkung äquimolarer Konzentrationen von AA und DHA zu vergleichen, wurden Kelly-Zellen für 48 h mit AA oder DHA in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0,1 und 10 mmol/ l f.c. behandelt (**Abb. 21.**). Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt.

AA-Behandlung mit Konzentrationen bis 1 mmol/ l bewirkte eine Reduktion der vitalen Zellen um ca. 10 %. Bei Dosissteigerung auf 10 mmol/ l ging die Zellvitalität auf ein Sechstel (ca. 15 %) zurück ($p = 7,3 \times 10^{-6}$).

Bei Behandlung mit DHA in Konzentrationen bis 1 mmol/ l sank die Zellvitalität um ca. 20 %. Inkubation mit 10 mmol/ l reduzierte die Zahl der vitalen Zellen auf etwa ein Zehntel ($p = 5,3 \times 10^{-8}$).

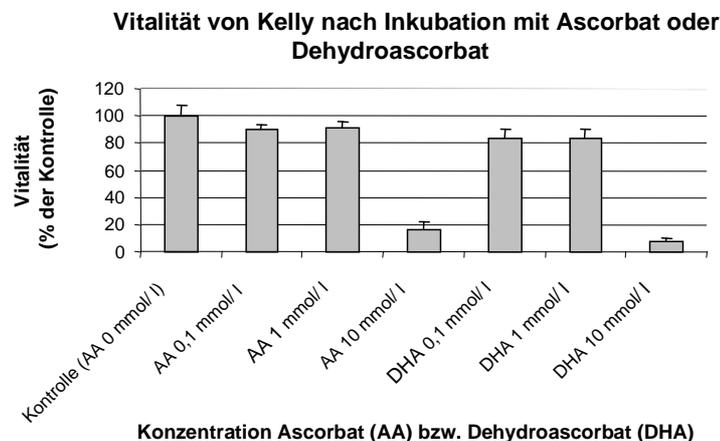


Abb. 21.: Einfluss von Ascorbat (AA) oder Dehydroascorbat (DHA) auf die Vitalität von Kelly. Kelly wurde für 48 h mit AA oder DHA in Konzentrationen von 0,1, 1 und 10 mmol/ l f.c. behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 % (Extinktion der Kontrolle: $0,47 \approx 60.000$ Zellen). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (\pm SD) aus einer Sechsfachbestimmung ($n = 1$).

3.1.4. Behandlung von Suspensionskulturen mit Wasserstoffperoxid

Da die zytotoxische Wirkung von hochdosiertem AA durch die Bildung von H_2O_2 verursacht werden soll (Chen et al. 2005), wurden die Fähigkeiten von Kelly- und SK-N-SH-Zellen zur Entgiftung von H_2O_2 untersucht. H_2O_2 wurde zunächst als Bolus zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit in der GO-Reaktion (**siehe 2.2.6.**) kontinuierlich gebildetem H_2O_2 konfrontiert, wodurch die allmähliche Anflutung von H_2O_2 bei Bildung aus Ascorbat simuliert werden sollte.

3.1.4.1. Photometrische Bestimmung von Wasserstoffperoxid

Zur Bestimmung von H_2O_2 wurde die photometrische Methode nach Thurman verwendet (**siehe 2.2.6.**).

Um eine Eichkurve für die Färbung zu erstellen, wurden für verschiedene H_2O_2 -Konzentrationen zwischen 0 und 200 $\mu\text{mol/l}$ f.c. in PBS^{++} mit 10 mmol/l f.c. Glukose sowie in RPMI 1640 die entsprechenden Extinktionen bestimmt (**Abb. 22.**).

Für 0 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 wurde in PBS^{++} mit 10 mmol/l f.c. Glukose ein Extinktionswert von 0,080 gemessen, in RPMI 1640 ein Extinktionswert von 0,185. In Abwesenheit von H_2O_2 sind diese Werte vermutlich auf unspezifische Färbefeffekte zurückzuführen.

Im Folgenden wurde **Abb. 22.** wiederholt verwendet, um in verschiedenen Versuchen gemessene Extinktionen in die zugehörigen H_2O_2 -Konzentrationen zu übertragen. Die Eichkurven wurden zu diesem Zweck durch den Nullpunkt verschoben, indem die unspezifische Extinktion zum Zeitpunkt $t = 0$ von allen Extinktionswerten abgezogen wurde.

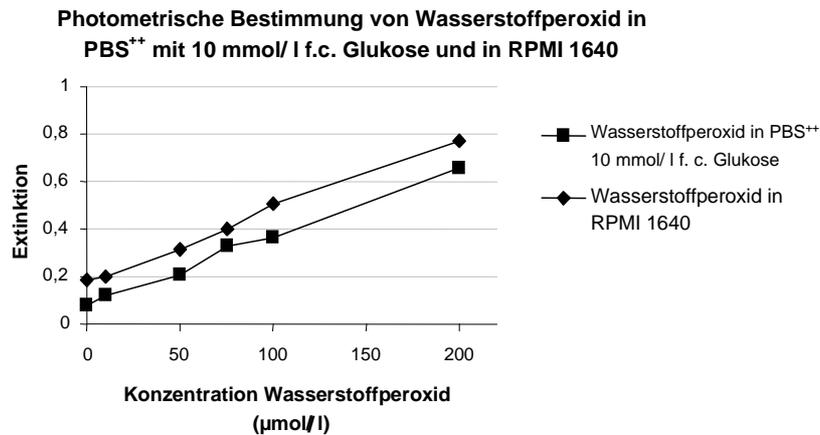


Abb. 22.: Eichkurve für die photometrische Bestimmung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) nach Thurman in PBS⁺⁺ mit 10 mmol/ l f.c. Glukose sowie in RPMI 1640. Für H_2O_2 in Konzentrationen von 0, 10, 50, 75, 100 und 200 µmol/ l f.c wurden die Extinktionen ermittelt und gegen die jeweilige H_2O_2 -Konzentration aufgetragen. Gezeigt sind die Daten aus einer Versuchsdurchführung in PBS⁺⁺ mit 10 mmol/ l f.c. Glukose (n = 1) und die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen in RPMI 1640 (n = 2).

3.1.4.2. Produktion von Wasserstoffperoxid durch Glukose-Oxidase

Das Enzym Glukose-Oxidase (GO) katalysiert die zeitabhängige Umsetzung von Glukose und Sauerstoff zu Glukonolacton und H_2O_2 . Durch Zugabe von GO wurde die allmähliche Entstehung von H_2O_2 aus extrazellulärem AA in der Zellsuspension simuliert.

Um eine Eichkurve für die Produktion von H_2O_2 durch GO zu erstellen, wurde GO in verschiedenen Konzentrationen in PBS⁺⁺ mit 10 mmol/ l f.c. Glukose oder in RPMI 1640 mit ca. 11 mmol/ l f.c. Glukose (**siehe 3.2.1.**) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von 60 min wurde die Lösung nach der Methode von Thurman gefärbt und ihre Extinktion bestimmt. Anschließend wurden die Extinktionen gegen die jeweilige Inkubationszeit aufgetragen (**Abb. 23.**).

In PBS⁺⁺ und 10 mmol/ l f.c. Glukose wurde der Versuch nach Zugabe von 10 µl folgender GO-Lösungen durchgeführt:

- 1) 5 mg GO/ ml Lösung
- 2) 0,5 mg GO/ ml Lösung
- 3) 0,05 mg GO/ ml Lösung
- 4) 5 µg GO/ ml Lösung
- 5) 0,5 µg GO/ ml Lösung
- 6) 0,05 µg GO/ ml Lösung.

Nach Zugabe von 1) und 2) wurde bereits innerhalb der ersten 5 min mit ca. 2,5 der maximale Extinktionswert des jeweiligen Versuchsansatzes erreicht. Bei Zugabe von 3) wurde dieser Wert nach ca. 20 min gemessen. In allen drei Ansätzen blieb der Extinktionswert nach Erreichen des Maximums im weiteren Verlauf der Inkubationszeit stabil.

In den drei niedriger verdünnten Ansätzen (0,05 – 5 µg GO/ ml Lösung) nahm die Extinktion innerhalb der einstündigen Inkubation kontinuierlich zu, eine Plateauphase wurde nicht erreicht. Bei Zugabe von 4) betrug der maximale Extinktionswert 2,424. Bei Zugabe von 5) wurde nach 60 min ein Extinktionswert von ca. 0,458 erreicht, nach Zugabe von 6) ein Wert von ca. 0,066. Die Werte von 5) und 6) entsprachen ca. 160 µmol/ l und 25 µmol/ l f.c. H₂O₂ (**siehe Abb. 22.**).

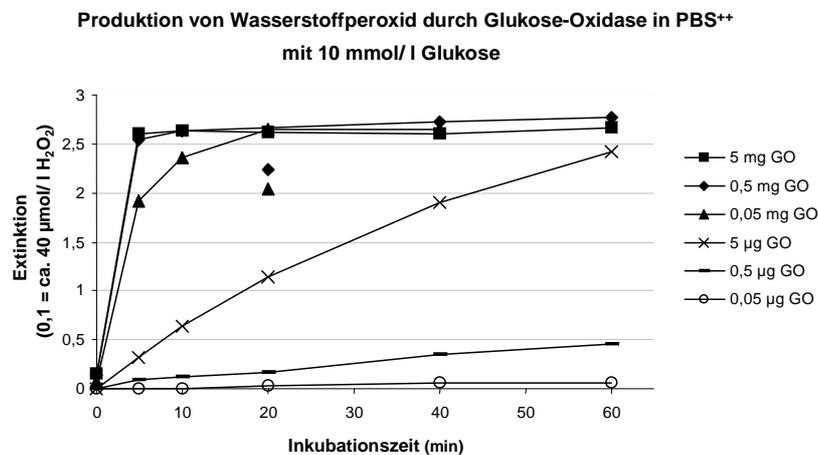
In RPMI 1640 wurde der Versuch mit folgenden GO-Konzentrationen durchgeführt:

- 1) 5 µg GO/ ml Lösung
- 2) 1 µg GO/ ml Lösung
- 3) 0,5 µg/ ml Lösung
- 4) 0,05 µg/ ml Lösung

In allen Ansätzen erfolgte innerhalb der einstündigen Inkubation ein kontinuierlicher Anstieg der H₂O₂-Konzentration. Bei Zugabe von 1) wurde nach 60 min ein maximaler Extinktionswert von 2,34 gemessen, bei Zugabe von 2), 3) und 4) Werte von 1,094, 0,765 und 0,359. In 3) und 4) wurden dementsprechend

innerhalb der einstündigen Inkubation 260 $\mu\text{mol/l}$ und 110 $\mu\text{mol/l}$ f.c. H_2O_2 produziert (siehe Abb. 22.).

A



B

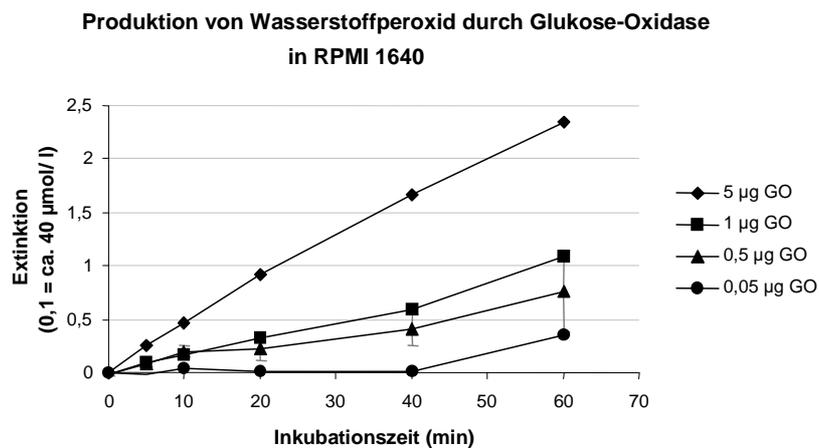


Abb. 23.: Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch Glukose-Oxidase (GO) in PBS⁺⁺ mit 10 mmol/l f.c. Glukose (**A**) und in RPMI 1640 mit ca. 11 mmol/l f.c. Glukose (**B**). 200 μl Glukoselösung bzw. RPMI 1640 wurden mit 10 μl GO-Lösung verschiedenen GO-Gehalts zwischen 5 mg GO/ml und 0,05 μg GO/ml inkubiert. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 5, 10, 20, 40$ und 60 min wurde nach der Methode nach Thurmann die jeweilige Extinktion bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (\pm SD) aus zwei unabhängigen Bestimmungen für 0,5 μg GO/ 1 ml RPMI 1640 ($n = 1$) und die Werte aus den Einfachbestimmungen für alle anderen Konzentrationen ($n = 1$). Die Konzentrationsangaben in den Legenden von (**A**) und (**B**) beziehen sich auf den GO-Gehalt/ml Lösung.

3.1.4.3. Entgiftung von Wasserstoffperoxid durch Kelly- und SK-N-SH- Zellen nach Zugabe im Bolus

Zellen sind physiologischerweise einer ständigen geringen Produktion von H_2O_2 ausgesetzt. Sie verfügen über verschiedene Mechanismen wie die Katalase (**siehe 1.2.3.**) oder das Glutathion-System (**Abb. 11.**) zur Entgiftung der Substanz. In Versuchsteil **3.1.5.** werden Neuroblastomzellen durch Zugabe der Substanz im Bolus mit einer unphysiologisch schnellen Anflutung konfrontiert.

Um die Fähigkeiten von Kelly und SK-N-SH zur Entgiftung von H_2O_2 nach Zugabe im Bolus zu untersuchen, wurden Zellsuspensionen in RPMI 1640 mit $100 \mu\text{mol/l}$ f.c. der Substanz versetzt. Innerhalb eines Zeitraumes von 120 min wurde wiederholt die vorliegende H_2O_2 -Konzentration bestimmt (**Abb. 24.**). Zum Vergleich zweier Zelllinien und verschiedener Zellzahlen wurde der Versuch für Zellsuspensionen von Kelly und SK-N-SH in Gegenwart von 10.000, 100.000 und 200.000 Zellen durchgeführt.

In der graphischen Auswertung wurden Prozentwerte dargestellt. Der Extinktionswert zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde als 100 %-Wert für die jeweilige Zellsuspension gesetzt.

Aufgrund von Entgiftung durch die Zellen wurde generell eine zeitabhängige Abnahme der H_2O_2 -Konzentration erwartet. Aufgrund eines größeren Gesamtpools an H_2O_2 -abbauenden Systemen und längerer Zeit für enzymatischen Abbau sollte ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen Zellzahl und Inkubationszeit auf der einen Seite sowie H_2O_2 -Konzentration auf der anderen Seite bestehen.

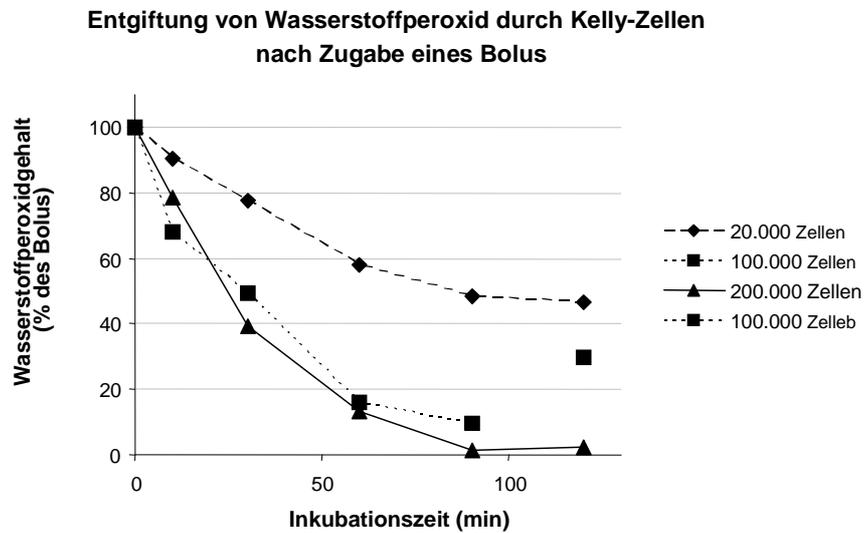
Diese Erwartungen bestätigten sich für beide Zelllinien. Kelly verfügte über höhere Kapazitäten zur Entgiftung der Substanz als SK-N-SH. Weiterhin erfolgte generell innerhalb der ersten Stunde Inkubationszeit eine etwas schnellere Abnahme der Substanz als innerhalb der zweiten Stunde.

Die im gesamten Versuchsaufbau schnellste H_2O_2 -Entgiftung erfolgte in der Suspension von 200.000 Kelly-Zellen. Hier ließen sich nach 30 min Inkubationszeit noch ca. 40 % des zugegebenen H_2O_2 nachweisen, nach 100 min konnte mit ca. 2 % nahezu kein H_2O_2 mehr nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu

lagen in der Suspension von 20.000 Kelly-Zellen nach 30 min noch ca. 80 % der Substanz vor, nach 120 min noch ca. 50 %.

In vergleichbaren Ansätzen von SK-N-SH wurden durchweg höhere H₂O₂-Konzentrationen gemessen. Zu entsprechenden Zeitwerten lagen in den Suspensionen von SK-N-SH bis zu 40 % mehr H₂O₂ vor als in Suspensionen gleichen Zellgehalts von Kelly. Die schnellste Abnahme erfolgte auch bei SK-N-SH in der Suspension von 200.000 Zellen. Hier waren nach 30 min noch ca. 50 % der Substanz nachweisbar, nach 120 min noch ca. 10 %. Mit ca. 15 % in 30 min und 35 % in 120 min erfolgte in der Suspension von 20.000 SK-N-SH-Zellen die langsamste Substanzabnahme.

A



B

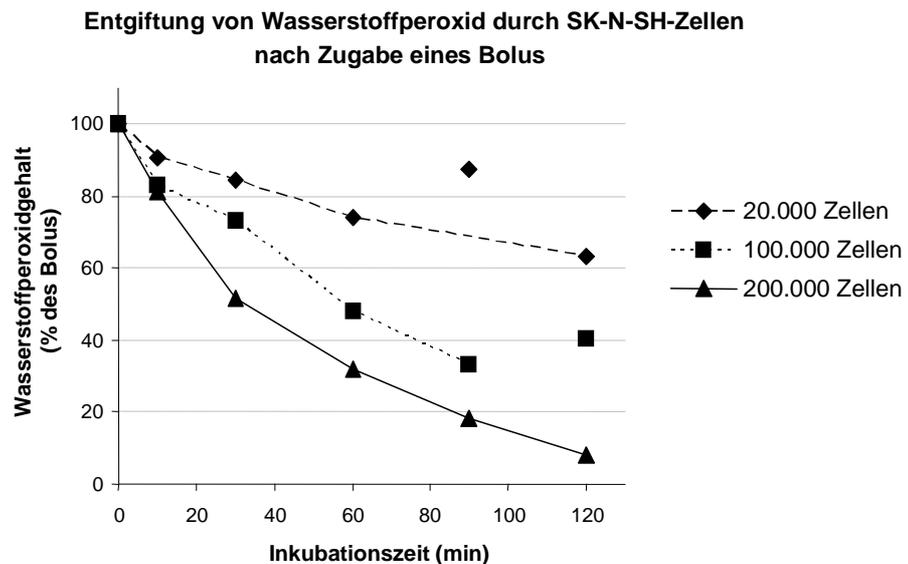


Abb. 24.: Entgiftung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch Kelly- (A) und SK-N-SH-Zellen (B) nach Zugabe eines Bolus. Zellsuspensionen von Kelly und SK-N-SH von 20.000, 100.000 und 200.000 Zellen / 200 μ l RPMI 1640 wurden mit einem Wasserstoffperoxid-Bolus von 100 μ mol/l f.c. versetzt. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 5, 10, 20, 40$ und 60 min wurden die H_2O_2 -Konzentrationen mittels der Methode nach Thurman bestimmt. Graphisch dargestellt sind Prozentwerte. Der Extinktionswert zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde als 100 %-Wert für die jeweilige Kurve gesetzt. Gezeigt ist eine Einzelbestimmung pro Zellzahl und Zelllinie ($n = 1$).

3.1.4.4. Entgiftung von kontinuierlich gebildetem Wasserstoffperoxid

Um die Entgiftung von allmählich anflutendem H_2O_2 durch Kelly- und SK-N-SH-Zellen zu untersuchen, wurden 200 μl Zellsuspension in RPMI 1640 mit GO versetzt und innerhalb von 120 min wiederholt die Extinktionen bestimmt. Für die gemessenen Extinktionen wurden aus **Abb. 22.** die entsprechenden H_2O_2 -Konzentrationen abgelesen und gegen die Inkubationszeit aufgetragen (**Abb. 25.**). Zugewetzt wurden 10 μl einer GO-Lösung, die 0,5 μg GO/ ml Lösung enthielt. In vorausgegangenen Versuchen hatte diese GO-Konzentration in RPMI 1640 innerhalb von 60 min ca. 160 $\mu\text{mol/ l}$ f.c. H_2O_2 produziert (**Abb. 23.**). Zum Vergleich zweier Zelllinien und verschiedener Zellzahlen wurden Suspensionen von Kelly und SK-N-SH mit Zellgehalt von 20.000 und 200.000 Zellen eingesetzt.

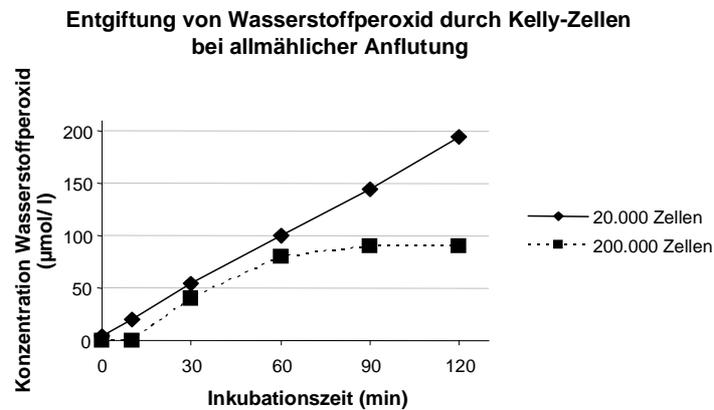
Für entsprechende Ansätze von Kelly und SK-N-SH- Zellen wurden nahezu identische H_2O_2 -Gehalts-Kurven gemessen. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min unmittelbar nach Zugabe von GO wurde in den unterschiedlichen Versuchsansätzen kein oder nur Spuren von H_2O_2 (5 $\mu\text{mol/ l}$) nachgewiesen.

In den Ansätzen von 20.000 Zellen wurde jeweils ein nahezu linearer Anstieg der H_2O_2 -Konzentration beobachtet. Innerhalb von 120 min wurden Werte von 195 $\mu\text{mol/ l}$ in der Suspension von Kelly und 200 $\mu\text{mol/ l}$ f.c. in der Suspension von SK-N-SH erreicht.

In den Ansätzen von 200.000 Zellen erfolgte ein langsamerer Anstieg der H_2O_2 -Konzentration und somit eine effizientere Entgiftung. In der Suspension von 200.000 Kelly-Zellen wurde nach 90-minütiger Inkubation ein Wert von 90 $\mu\text{mol/ l}$ f.c. H_2O_2 gemessen, der sich innerhalb der letzten halben Stunde Inkubationszeit nicht mehr veränderte. In der Suspension von 200.000 SK-N-SH-Zellen wurde ein nahezu linearer Anstieg bis zu 95 $\mu\text{mol/ l}$ f.c. nach 120 min Inkubation beobachtet.

Die eingesetzte GO-Konzentration hatte in Abwesenheit von Zellen in RPMI 1640 innerhalb von 60 min ca. 260 $\mu\text{mol/ l}$ f.c. H_2O_2 produziert. In allen Ansätzen mit Zellen lag nach einstündiger Inkubation eine deutlich geringere H_2O_2 -Konzentration (80 – 100 $\mu\text{mol/ l}$ f.c.) vor. Dies deutete auf eine aktive Entgiftung von H_2O_2 durch die Zellen hin.

A



B

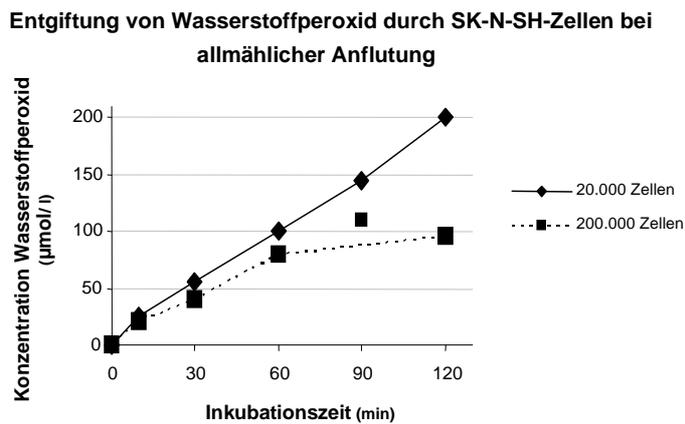


Abb. 25.: Entgiftung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch Kelly- (**A**) und SK-N-SH-Zellen (**B**) bei allmählicher Anflutung. Zellsuspensionen von Kelly und SK-N-SH in Konzentrationen von 20.000 und 200.000 Zellen/ 200 µl RPMI 1640 wurden mit 10 µl Glukose-Oxidase-Lösung (0,5 µg Glukose-Oxidase (GO)/ ml Lösung) versetzt. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 10, 30, 60, 90$ und 120 min wurde die jeweilige Extinktion mittels der Methode nach Thurman bestimmt. Für die gemessenen Extinktionen wurden aus **Abb. 22.** die entsprechenden H_2O_2 -Konzentrationen abgelesen und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Gezeigt ist eine Einzelbestimmung pro Zellzahl und Zelllinie ($n = 1$).

3.1.5. Kurzzeitbehandlung von Neuroblastomzelllinien mit Wasserstoffperoxid

3.1.5.1. Kurzzeitbehandlung mit Wasserstoffperoxid: Orientierungsversuch zur Substanzwirkung

Um die Toxizität von H₂O₂ im micromolaren Bereich auf Kelly und SK-N-SH zu untersuchen, wurden beide Zelllinien über Zeiträume zwischen 2 h und 96 h mit H₂O₂ in Konzentrationen zwischen 25 und 300 µmol/ l behandelt.

In **Abb. 26.** wurde exemplarisch die Vitalität von Kelly und SK-N-SH nach 72-stündiger Behandlung mit H₂O₂ in Konzentrationen zwischen 0 µmol/ l und 200 µmol/ l f.c. dargestellt. Die Daten aus den graphisch nicht dargestellten Versuchsserien wurden im Anhang aufgelistet. Die Zellvitalität wurde für alle Versuchsserien mittels MTT-Test bestimmt.

Bei Kelly bewirkte H₂O₂ in Konzentrationen bis 50 µmol/ l eine geringe Wachstumshemmung um bis zu 15 %. Bei Inkubation mit 100 µmol/ l ging die Zellvitalität auf ca. 30 % zurück ($p = 7,658 \times 10^{-8}$). Bei weiterer Steigerung auf 150 bzw. 200 µmol/ l ließen sich praktische keine vitalen Zellen mehr nachweisen. In den unbehandelten Kontrollkulturen lagen weniger als 25.000 vitale Kelly-Zellen vor (**Abb. 17.**).

Auf SK-N-SH wirkte die Substanz in einer Konzentration von 25 µmol/ l unwesentlich zytotoxisch. Bei Erhöhung der Konzentration nahm die Zytotoxizität nahezu linear zu. So waren nach Inkubation mit 200 µmol/ l noch ca. 35 % vitale Zellen nachweisbar. In den Kontrollkulturen von SK-N-SH lagen ebenfalls weniger als 25.000 vitale Zellen vor (**Abb. 17.**).

In den verschiedenen Versuchsdurchführungen fiel eine unterschiedliche Zytotoxizität identischer Substanzkonzentrationen auf. Dies ließ eine mit zunehmender Zellzahl sinkende Zytotoxizität identischer Substanzkonzentrationen vermuten.

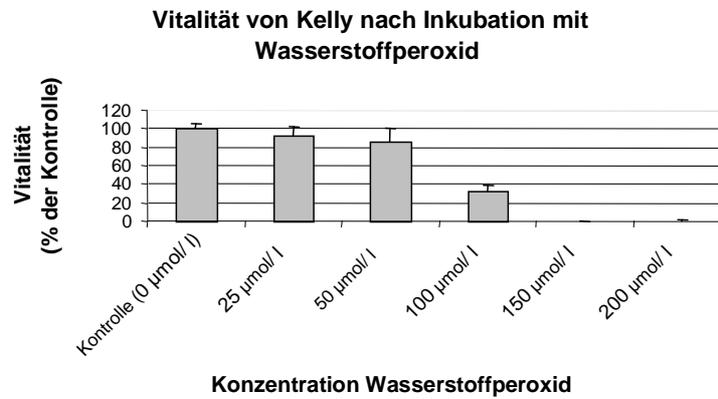
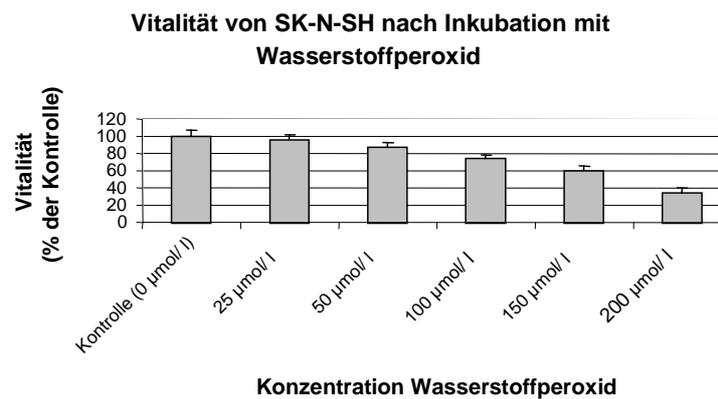
A**B**

Abb. 26.: Einfluss von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auf die Vitalität von Kelly (**A**) und SK-N-SH (**B**). Kelly und SK-N-SH wurden für 72 h mit H_2O_2 in Konzentrationen von 25, 50, 100, 150 und 200 $\mu\text{mol/l}$ f.c. behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 % (Extinktion der Kontrollen: Kelly: 0,283 \approx < 25.000 Zellen; SK-N-SH: 0,185 \approx < 25.000 Zellen). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (+ SD) aus einer Zwölfachbestimmung ($n = 1$).

3.1.5.2. Kurzzeitbehandlung mit Wasserstoffperoxid: Zusammenhang zwischen Substanzwirkung und Zellzahl

In vorausgegangenen Experimenten wurde für die wahrscheinlich durch H_2O_2 -vermittelte Toxizität von AA ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zur behandelten Zahl an Neuroblastomzellen beobachtet (**Abb. 20.1.** und **Abb. 20.2.**). Ebenso wurde in Suspensionskulturen eine mit steigender Zellzahl zunehmende effiziente Entgiftung der Substanz gezeigt (**Abb. 24.** und **Abb. 25.**). Somit sollte mit steigender Zellzahl die Zytotoxizität von H_2O_2 sinken, da der Pool an H_2O_2 -entgiftenden Systemen mit der Zellzahl zunimmt.

Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurden unterschiedlich dichte Kulturen von Kelly und SK-N-SH aus derselben Ausgangszellpopulation gezüchtet und zeitgleich für 48 h mit H_2O_2 zwischen 0 und 100 $\mu\text{mol/l}$ f.c. behandelt (**Abb. 27.**). Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt.

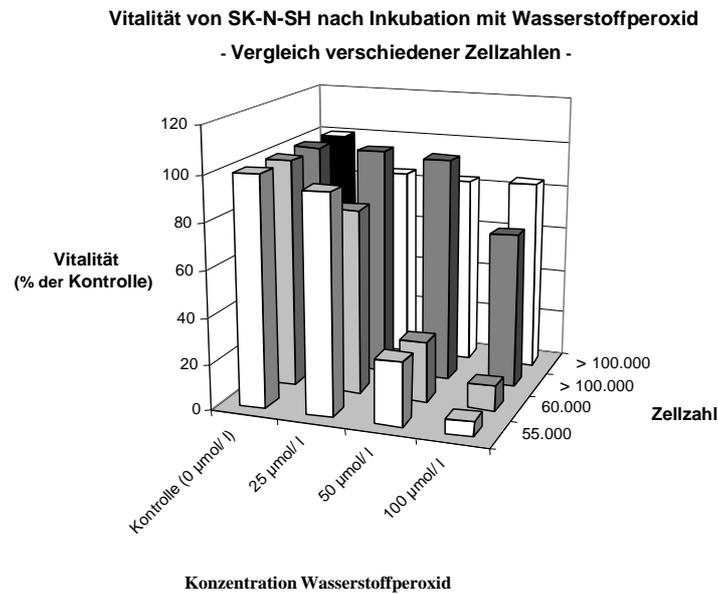
Das mikroskopische Bild unterschiedlich dichten Zellbewuchses in den Kontrollwells wurde durch die MTT-Färbung bestätigt. Die unbehandelten Kontrollkulturen von Kelly bestanden aus weniger als 25.000 bis über 150.000 Zellen, diejenigen von SK-N-SH aus 55.000 bis über 100.000 Zellen (**Abb. 17.**).

Behandlung von Kelly mit 25 $\mu\text{mol/l}$ H_2O_2 hatte nur in der dünnsten Kultur von weniger als 25.000 Zellen eine gering zytotoxische Wirkung. Die Zellvitalität wurde hier um ca. 30 % reduziert. Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ bewirkte in allen Kulturen eine Vitalitätsminderung und ließ einen deutlichen Zusammenhang zwischen Zytotoxizität und behandelter Zellzahl erkennen. Während in den dichten Kulturen von 80.000 und mehr als 150.000 Zellen eine Reduktion um 5 und 10 % erfolgte, nahm die Zellvitalität in den beiden dünnen Kulturen von weniger als 25.000 um ca. 35 und 60 % ab. Bei Behandlung mit 100 $\mu\text{mol/l}$ wurden in den dünnen Kulturen nur 2 und 1 % vitale Zellen nachgewiesen, in den dichten Kulturen ca. 40 und 65 %.

Behandlung von SK-N-SH mit 25 $\mu\text{mol/l}$ bewirkte in allen Kulturen eine Vitalitätsreduktion um bis zu 20 %. Bei Behandlung mit 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ zeigte sich wiederum ein Zusammenhang zwischen Toxizität und Zellzahl. Bei Behandlung mit 50 $\mu\text{mol/l}$ erfolgte in den dichten Kulturen von über 100.000

Zellen eine Vitalitätsreduktion um bis zu 30 %, in den dünnen Kulturen von 55.000 und 60.000 Zellen um bis zu ca. 65 %. Bei Steigerung der Substanz auf 100 $\mu\text{mol/l}$ lagen ca. 70 – 85 % vitale Zellen in den dichten, ca. 5 – 10 % vitale Zellen in den dünnen Kulturen vor.

A



B

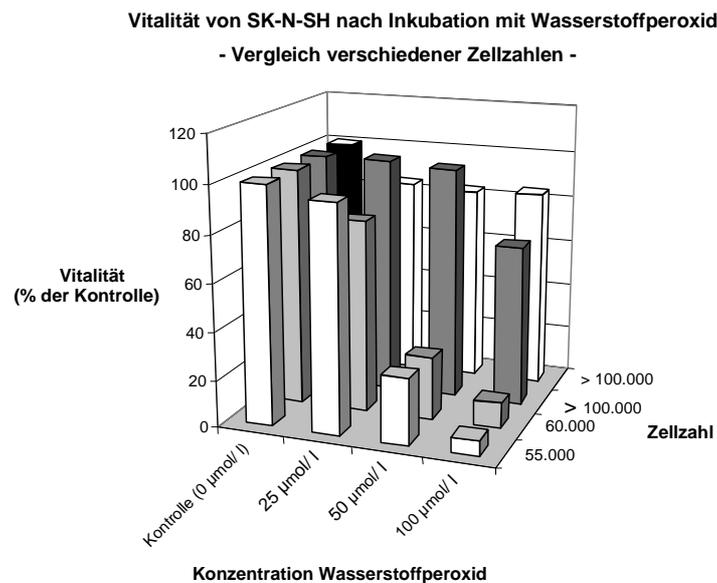


Abb. 27:

Einfluss von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auf die Vitalität von Kelly (**A**) und SK-N-SH (**B**). Vergleich verschiedener Zellzahlen. Verschiedene Zellzahlen von Kelly und SK-N-SH wurden für 48 h mit H_2O_2 in Konzentrationen von 25, 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ f.c. behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 % (Extinktion der Kontrollen: Kelly: 0,139 \approx < 25.000 Zellen; 0,163 \approx < 25.000 Zellen; 0,534 \approx 80.000 Zellen; 0,78 \approx > 150.000 Zellen. SK-N-SH: 0,412 \approx 55.000 Zellen; 0,442 \approx 60.000 Zellen; 0,622 \approx > 100.000 Zellen; 0,657 \approx > 100.000 Zellen). Gezeigt sind die Werte aus vier unabhängigen Sechsfachbestimmungen ($n = 4$). Die Standardabweichungen betragen für Kelly 0,5 – 7 %, für SK-N-SH 1 – 15,5 % und wurden wie die p-Values und die Daten aus den verschiedenen Versuchsdurchführungen im Anhang aufgelistet.

3.1.5.3. Kurzzeitbehandlung mit Wasserstoffperoxid: Zusammenhang zwischen Substanzwirkung und Inkubationszeit

Zellen verfügen über zellzahl – und zeitabhängige Fähigkeiten zur Metabolisierung von H_2O_2 . Diese Fähigkeiten nehmen in Suspensionen von Kelly und SK-N-SH mit der Zellzahl und Inkubationszeit zu (**Abb. 24.** und **Abb. 25.**).

Um dementsprechend den Zusammenhang zwischen Substanztoxizität und Inkubationszeit zu untersuchen, wurden je zwei parallele Kulturen von Kelly und SK-N-SH über 1 bzw. 24 h mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen zwischen 25 und 100 $\mu\text{mol/l}$ f.c. behandelt (**Abb. 28.**). Anschließend wurde die Zellvi-talität mittels MTT-Test bestimmt.

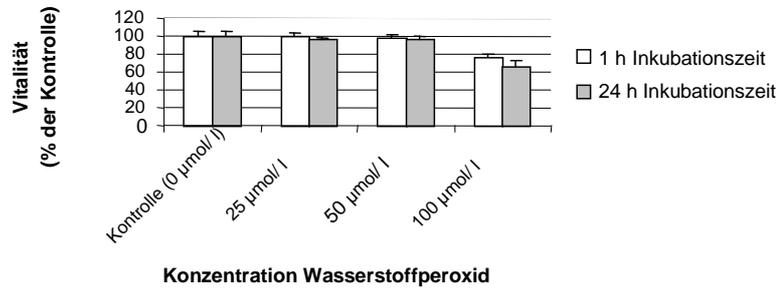
In den Kontrollen korrespondierender Platten von Kelly lag ein ähnlicher Bewuchs mit ca. 30.000 Zellen vor, in den Kontrollen korrespondierender Platten von SK-N-SH 35.000 bzw. 55.000 vitale Zellen (**Abb. 17.**). Für Kelly konnte demnach unter Ausschluss eines Einflusses unterschiedlicher behandelter Zellzahlen der Zusammenhang zwischen Inkubationszeit und Substanztoxizität beurteilt werden.

Behandlung von Kelly mit bis zu 50 $\mu\text{mol/l}$ erbrachte bei einstündiger und 24-stündiger Inkubation eine ähnliche Reduktion der Zellvitalität um 1 bis 4 %. Bei Steigerung der Substanz auf 100 $\mu\text{mol/l}$ lagen nach einstündiger Inkubation ca. 75 % vitale Zellen vor, nach 24-stündiger Inkubation ca. 65 %.

Behandlung von SK-N-SH mit 25 $\mu\text{mol/l}$ bewirkte keine Abnahme der Zellvitalität. Nach einstündiger Inkubation mit 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ wurden eine Reduktion um ca. 10 und 37 % beobachtet, nach 24-stündiger Inkubation mit entsprechenden Konzentrationen eine Reduktion um ca. 20 und 41 %. Bei SK-N-SH zeigte sich somit trotz stärkerer Zelldichte der für 24 h mit der Substanz inkubierten Platte eine im Vergleich zu einstündiger Inkubation geringfügig stärkere Reduktion der Zellvitalität.

A

**Vitalität von Kelly nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid
- Einfluss der Inkubationszeit -**



B

**Vitalität von SK-N-SH nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid
- Einfluss der Inkubationszeit -**

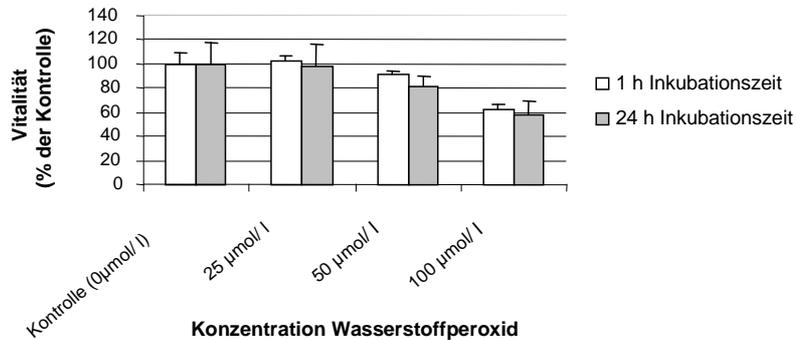


Abb. 28.: Einfluss von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) auf die Vitalität von Kelly (**A**) und SK-N-SH (**B**) bei einstündiger und 24-stündiger Behandlung. Kelly und SK-N-SH wurden für 1 oder 24 h mit H₂O₂ in Konzentrationen von 25, 50 und 100 µmol/ l f.c. behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 % (Extinktion der Kontrollen: Kelly 1 h: 0,35 ≈ 30.000 Zellen; Kelly 24 h: 0,35 ≈ 30.000 Zellen. SK-N-SH 1 h: 0,35 ≈ 40.000 Zellen; SK-N-SH 24 h: 0,42 ≈ 55.000 Zellen). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (+ SD) aus einer Zwölfachbestimmung (n = 1).

3.2. Ascorbat als Modulator des zellulären Energiestoffwechsels

Viele maligne Zellen gewinnen laut der Warburg-Hypothese auch in Anwesenheit von Sauerstoff ihre Energie bevorzugt über die Glykolyse statt die wesentlich ergiebigere oxidative Phosphorylierung zu nutzen. Möglicherweise lässt sich durch den Einsatz von die Glykolyse hemmenden Substanzen der Energiestoffwechsel von Tumorzellen Richtung oxidative Phosphorylierung verschieben und somit selektiv die Vitalität von Krebszellen hemmen.

AA ist ein essentieller Bestandteil von Prolylhydroxylasen, die u. a. für den proteosomalen Abbau von HIF-1 α verantwortlich sind. Dadurch werden die durch HIF verstärkten glykolytischen Aktivitäten der Zelle unterdrückt. Die Effekte treten schon bei geringen, im Serum vorhandenen AA-Konzentrationen (25 $\mu\text{mol/l}$) auf (Knowles et al. 2003). Da die normalerweise verwendeten Zellkulturmedien kein AA enthalten, ist dieser Aspekt beim Arbeiten mit Zellkulturen völlig ausgeblendet. Möglicherweise spielt er aber bei der Wirkung von AA auf den Energiestoffwechsel eine nicht zu vernachlässigende Rolle. In diesem zweiten Block zur Wirkung von AA auf Neuroblastomzellen sollten diesbezügliche Aspekte untersucht werden.

Parallel dazu wurden zwei Substanzen mit bekannten Wirkungen auf die Glykolyse untersucht: 2-Deoxy-D-Glukose (dG) und Dichloressigsäure (DCA). dG wirkt als direkter Hemmstoff der Glykolyse, während DCA durch indirekte Aktivierung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes die Metabolisierung von Pyruvat Richtung Acetyl-CoA lenkt.

In den folgenden Experimenten wurden zunächst der Glukose- und Laktatgehalt in frischen RPMI 1640 bestimmt sowie der AA-Gehalt des Zellkulturmediums und die Stabilität von AA in der Zellkultur analysiert. Anschließend wurde der Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen bei Langzeitbehandlung mit AA sowie der Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose (dG) auf Vitalität und Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen untersucht. Ergänzend wurde die Wirkung einer Kombination von dG und H₂O₂ auf Neuroblastomzellen untersucht. Zuletzt wurde der Einfluss von DCA auf Energiestoffwechsel und Vitalität von Neuroblastomzellen analysiert.

3.2.1. Glukose und Laktat in RPMI 1640

Im Folgenden wurden Experimente zum Energiestoffwechsel von Kelly- und SK-N-SH-Zellen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Zur besseren Beurteilung von Glukoseverbrauch und Laktatproduktion durch die Zellen wurden zunächst der Gehalt an Glukose und Laktat in frischem RPMI 1640 bestimmt.

Sowohl für die Bestimmung von Glukose als auch für die Bestimmung von Laktat wurde die photometrische Methode angewandt. Die Rohdaten und Standardabweichungen der dreifachen Bestimmung sind im Anhang aufgelistet. In frischem RPMI 1640 wurden ca. 11 mmol/ l f.c. Glukose gemessen. Nach Herstellerangaben sind 2 g/ l Glukose enthalten, was einer Konzentration von 11,1 mmol/ l entspricht (www.biochrom.de). Laktat konnte nicht nachgewiesen werden.

3.2.2. Langzeitbehandlung von Neuroblastomzelllinien mit Ascorbat

3.2.2.1. Ascorbat im Zellkulturmedium

Zellkulturen werden in „Mangelmedien“ geführt. Eine große Anzahl an Faktoren, die die Zelle *in vivo* beeinflussen, ist in den verwendeten Zellkulturmedien nicht enthalten. Dementsprechend erlauben Untersuchungen an Zellkulturen nur bedingte Rückschlüsse auf das Verhalten von Zellen *in vivo*.

Da im Folgenden Untersuchungen zum Einfluss von Ascorbat auf den Energiestoffwechsel von Krebszellen durchgeführt werden sollten, wurde zunächst der AA-Gehalt im verwendeten Zellkulturmedium bestimmt.

Die synthetischen Bestandteile des verwendeten Mediums – RPMI 1640, Penicillin/ Streptomycin und L-Glutamin – enthalten laut Herstellerangaben kein Ascorbat (www.biochrom.de).

Als tierischer Inhaltsstoff wurden dem Medium für die hier durchgeführten Untersuchungen 10 % fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Der AA-Gehalt in 100 %igem FCS wurde photometrisch gemessen. Die Bestimmung wurde für frisch aufgetautes und über 3 h bei 4 °C bzw. 37 °C gelagertes FCS je zweimal durchgeführt.

Nach Lagerung bei 4 °C wurden in FCS ca. 20 µmol/l AA f.c. gemessen. Bei Lagerung bei 37 °C sank der AA-Gehalt auf ca. 4 µmol/l f.c.. In komplettem Zellkulturmedium mit 10 % FCS lagen somit nach dreistündiger Lagerung bei 4 °C bzw. 37 °C 2 µmol/l bzw. 0,4 µmol/l AA vor. Die Rohdaten und Standardabweichungen dieser Bestimmung wurden im Anhang aufgelistet.

3.2.2.2. Stabilität von Ascorbat in der Zellkultur

Zur Untersuchung des Einflusses von AA auf den Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen wurden AA-Dauerkulturen von Kelly und SK-N-SH geführt. Diese Kulturen wurden alle 48 h mit 50 µmol/l f.c. AA versetzt.

Um die Stabilität von AA in der Zellkultur zu verfolgen, wurden unmittelbar nach einer AA-Zugabe sowie nach 30 h Inkubationszeit Proben aus dem Zellkulturmedium entnommen. Der AA-Gehalt dieser Proben wurde photometrisch gemessen. Die Bestimmung wurde beispielhaft für eine Kultur von SK-N-SH (+) durchgeführt, die Rohdaten der Bestimmung wurden im Anhang aufgelistet.

Unmittelbar nach Zugabe wurde eine AA-Konzentration von 64 µmol/l gemessen, nach 30-stündiger Inkubation ließ sich kein AA mehr nachweisen.

3.2.2.3. Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen in Anwesenheit von Ascorbat im Zellkulturmedium

AA wirkt in Krebszellen als Modulator des Energiestoffwechsels. In Anwesenheit von AA werden HIF und glykolytische Enzyme vermindert exprimiert (Knowles et al. 2003). Der Stoffwechsel der Zelle könnte somit von der bevorzugten Glykolyse Richtung oxidative Phosphorylierung verschoben werden.

Um dies für Neuroblastomzellen nachzuweisen, wurden Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in Zellkulturen von Kelly und SK-N-SH in RPMI 1640 über 144 h beobachtet. In frischem RPMI 1640 sind ca. 11 mmol/l f.c. Glukose enthalten, Laktat wurde nicht nachgewiesen (**3.2.1.**).

Verglichen wurden Kulturen, die in Anwesenheit von Ascorbat im Zellkulturmedium geführt wurden (Kelly (+), SK-N-SH (+)) und Kulturen in AA-freiem Medium (Kelly (-), SK-N-SH (-)) (**Abb. 29.**). Die erste Messung erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0$ kurz vor der ersten AA-Behandlung nach 48 h Vorkultur. Die Bestimmung der Glukose-Werte erfolgte mittels Blutzuckermessgerät, die Bestimmung der Laktatwerte photometrisch.

Sollte AA die Glykolyse negativ beeinflussen, ist in AA-freiem Zellkulturmedium eine höhere Glykolyserate zu erwarten als in den Kulturen mit ascorbat-haltigem Medium. Die Zunahme der Laktatkonzentration und die Abnahme der Glukosekonzentration sollte in den Kulturen von Kelly (-) und SK-N-SH (-) dementsprechend vergleichsweise schneller erfolgen.

In den Kulturen von Kelly (-) und Kelly (+) wurde nach 48-stündiger, ascorbat-freier Vorkultur ein ähnlicher Glukosegehalt von 9,7 und 9,5 mmol/ l gemessen. Nach 144 h lag in der Kultur von Kelly (+) mit 5,2 mmol/ l eine geringfügig höhere Glukosekonzentration vor als in der Kultur von Kelly (-) mit 4,9 mmol/ l. In der Lösungsmitteldauerkultur erfolgte die Glukoseabnahme etwas schneller, zumal hier eine im Vergleich zur AA-Dauerkultur 0,2 mmol/ l höhere Ausgangskonzentration an Glukose gemessen wurde.

Der Laktatgehalt in der Kultur von Kelly (+) stieg innerhalb von 144 h von 1,5 auf 2,7 mmol/ l zu. Bei Kelly (-) erfolgte ein Anstieg von 0,9 auf 3,8 mmol/ l. Mit 2,9 mmol/ l erfolgte in der Lösungsmitteldauerkultur ohne AA auch die Laktatzunahme deutlich schneller als in der Ascorbatdauerkultur mit 1,2 mmol/ l.

Sowohl bei Kelly (+) als auch bei Kelly (-) erfolgten Glukoseabnahme und Laktatzunahme in der ersten Hälfte der Inkubationszeit schneller als in der zweiten Hälfte.

In der Kultur von SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+) lagen nach der 48-stündigen Vorkultur unterschiedliche Glukosekonzentrationen von 7,8 und 10,4 mmol/ l vor. Bei SK-N-SH (-) sank der Glukosegehalt innerhalb von 144 h auf ca. 5,3 mmol/ l, bei SK-N-SH (+) auf ca. 7,6 mmol/ l. Es erfolgte eine ähnliche Abnahme um 2,5 mmol/ l bei SK-N-SH (-) und 2,8 mmol/ l bei SK-N-SH (+).

Der Laktatgehalt stieg bei SK-N-SH (-) in derselben Zeit von ca. 1,3 auf ca. 3,5 mmol/ l, bei SK-N-SH (+) von ca. 0,8 mmol/ l auf ca. 3 mmol/ l. Somit erfolgte in beiden Kulturen eine Laktatzunahme um 2,2 mmol/ l.

In den Kulturen von SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+) erfolgten Glukoseabnahme und Laktatzunahme in den letzten 44 h der Inkubationszeit am schnellsten.

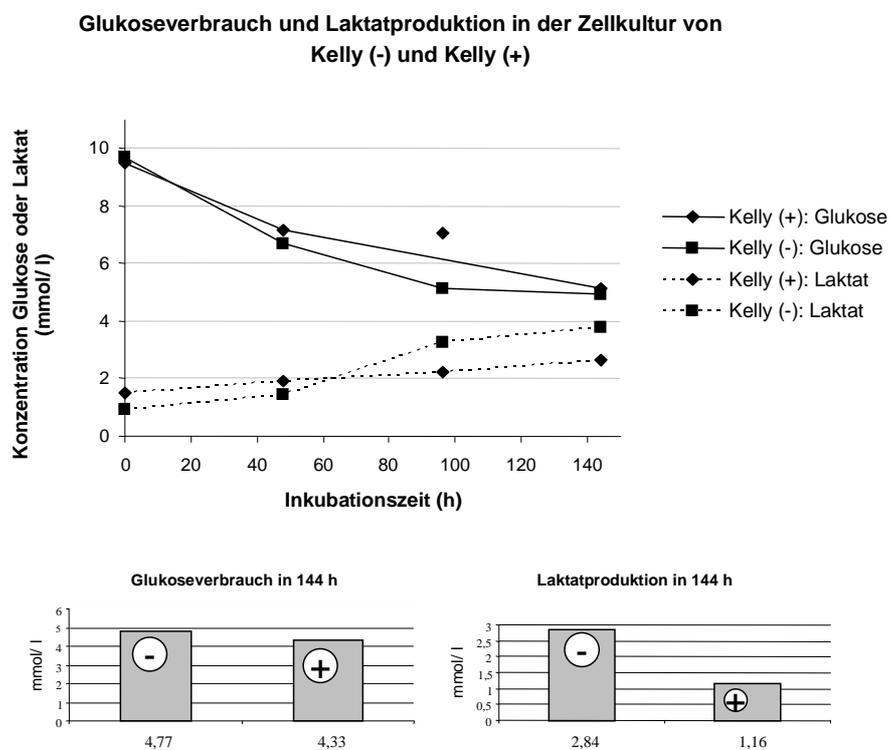


Abb. 29.1.: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in der Lösungsmittel- (Kelly (-))- und Ascorbatdauerkultur (Kelly(+)) von Kelly. In Kulturen von Kelly (-) und Kelly (+) wurden innerhalb von 144 h alle 48 h Glukose- und Laktatwerte bestimmt. Die Glukosebestimmung erfolgte mittels Blutzuckermessgerät, die Laktatbestimmung photometrisch. Gezeigt sind die Werte aus einer Versuchsdurchführung (n = 1).

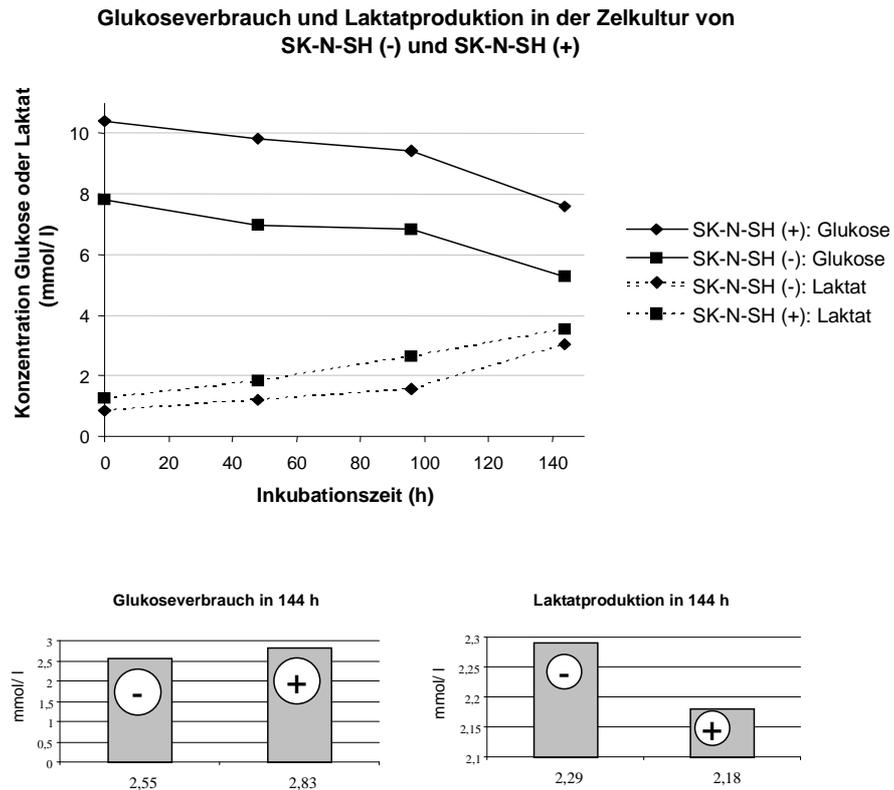


Abb. 29.2.: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in der Lösungsmittel- (SK-N-SH (-))- und Ascorbatdauerkultur (SK-N-SH(+)) von SK-N-SH. In Kulturen von SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+) wurden innerhalb von 144 h alle 48 h Glukose- und Laktatwerte bestimmt. Die Glukosebestimmung erfolgte mittels Blutzuckermessgerät, die Laktatbestimmung photometrisch. Gezeigt sind die Werte aus einer Versuchsdurchführung (n = 1).

3.2.3. Kurzzeitbehandlung von Neuroblastomzelllinien mit 2-Deoxy-D-Glukose

3.2.3.1. Kurzzeitbehandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose: Orientierungsversuch zur Substanzwirkung

dG wirkt als Inhibitor verschiedener glykolytischer Enzyme (**siehe 1.4.1.**).

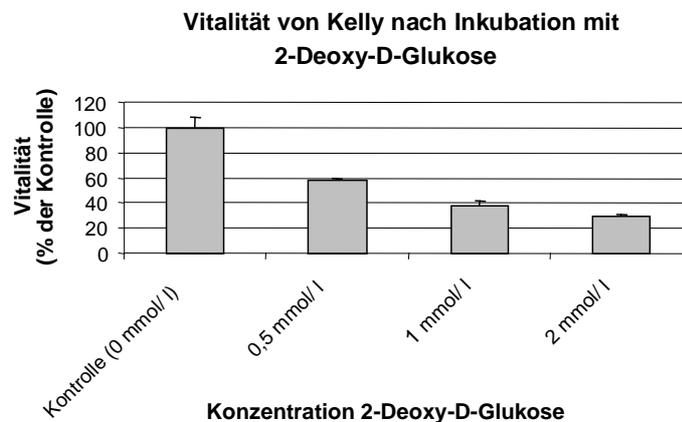
Um die Wirkung von dG auf Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurde Kelly über 72 h mit 0,5, 1 und 2 mmol/ l dG behandelt, SK-N-SH mit 0,5, 2 und 3 mmol/ l (**Abb. 30.**). Das verwendete Zellkulturmedium enthielt in frischem

Zustand ca. 11, 1 mmol/ l Glukose (**siehe 3.2.1.**) Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt.

Behandlung von Kelly mit 0,5, 1 und 2 mmol/ l erbrachte eine mit der Substanzkonzentration zunehmende Reduktion der Zellvitalität um ca. 40, 60 und 70 %.

Bei Behandlung von SK-N-SH mit dG in Konzentrationen von 0,5, 2 und 3 mmol/ l sank die Zellvitalität zunehmend um ca. 15 %, 25 % und 50 %.

A



B

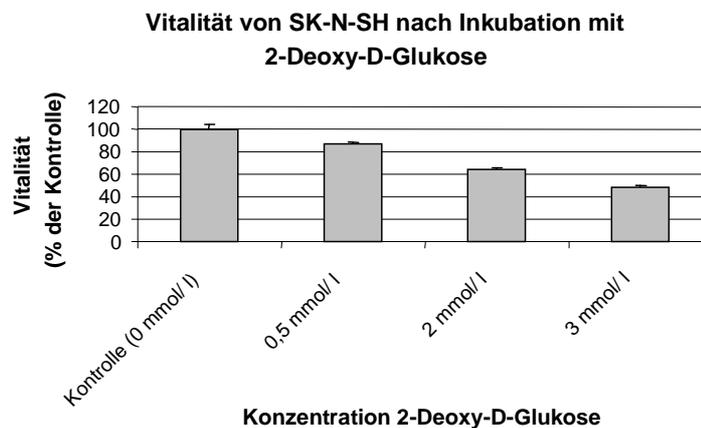


Abb. 30.: Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose (dG) auf die Vitalität von Kelly (**A**) und SK-N-SH (**B**). Kelly wurde für 48 h mit dG in Konzentrationen von 0,5, 1 und 2 mmol/ l behandelt, SK-N-SH mit dG in Konzentrationen von 0,5, 2 und 3 mmol/ l. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 % (Extinktionen der Kontrollen: Kelly: 0,6 \approx 100.000 Zellen, SK-N-SH: 0,11 \approx < 25.000 Zellen). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (+ SD) aus einer unabhängigen Zwölfachbestimmung (n = 1).

Der Versuch wurde mit dG-Konzentrationen von 2, 4 und 6 mmol/ l und 72-stündiger Inkubationszeit wiederholt. Inkubation von Kelly mit 2, 4 und 6 mmol/ l erbrachte eine Reduktion der Zellvitalität um ca. 65, 73 und 75 %, Inkubation von SK-N-SH mit 2, 4 und 6 mmol/ l eine Reduktion um ca. 50, 60 und 70 %. Es fiel auf, dass durch Erhöhung der Substanzkonzentration ab ca. 2 mmol/ l kein starker Wirkungszuwachs mehr zu erzielen war. Die Daten aus diesem Versuch wurden im Anhang aufgelistet.

3.2.3.2. Kurzzeitbehandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose: Vergleich von Zellen aus ascorbatfreiem und ascorbathaltigem Zellkulturmedium

AA im micromolaren Konzentrationsbereich trägt möglicherweise dazu bei, dass sich der Energiestoffwechsel von Krebszellen von der Glykolyse in Richtung oxidative Phosphorylierung verlagert (Knowles et al. 2003).

Es sollte die Wirkung von dG auf Neuroblastomzellen verglichen werden, die in AA-haltigem oder AA-freiem Zellkulturmedium kultiviert worden waren. Dementsprechend wurden Kelly (-) und Kelly (+) sowie SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+) für 48 h mit dG in Konzentrationen zwischen 0,5 und 2 mmol/ l f.c. behandelt (**Abb. 31.**). Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt.

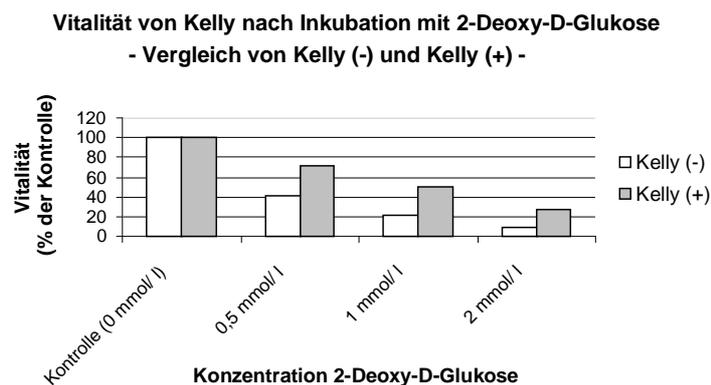
Sowohl bei Kelly (-) als auch bei Kelly (+) nahm die Substanztoxizität im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 2 mmol/ l kontinuierlich zu. Bei Behandlung von Kelly (-) mit 0,5, 1 und 2 mmol/ l sank die Zellvitalität auf ca. 40 %, 20 % und 10 %. Bei Kelly (+) lagen nach entsprechender Behandlung ca. 70 %, 50 % und 30 % und damit pro Konzentration 20 – 30 % mehr vitale Zellen vor. In Konzentrationen von 0,5 mmol/ l und 1 mmol/ l besaß dG gegenüber Kelly (-) eine signifikant höhere Zytotoxizität als gegenüber Kelly (+) (0,5 mmol/ l: $p = 0,002$; 1 mmol/ l: $p = 1,811 \times 10^{-4}$).

In den Kontrollen von Kelly (-) bzw. Kelly (+) lagen ca. 30.000 bzw. weniger als 25.000 Zellen vor. Aufgrund einer ähnlichen Aufnahme von Glukose und dG

durch die einzelnen Zellen und der intrazellulären Wirkung von dG ist kein Zusammenhang zwischen dG-Wirkung und behandelter Zellzahl zu vermuten.

Sowohl bei SK-N-SH (-) als auch bei SK-N-SH (+) bewirkte die Substanz in steigender Konzentration bis 2 mmol/l eine Reduktion der Zellen um bis zu 25 %. Eine unterschiedliche Sensibilität von SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+) wurde nicht festgestellt.

A



B

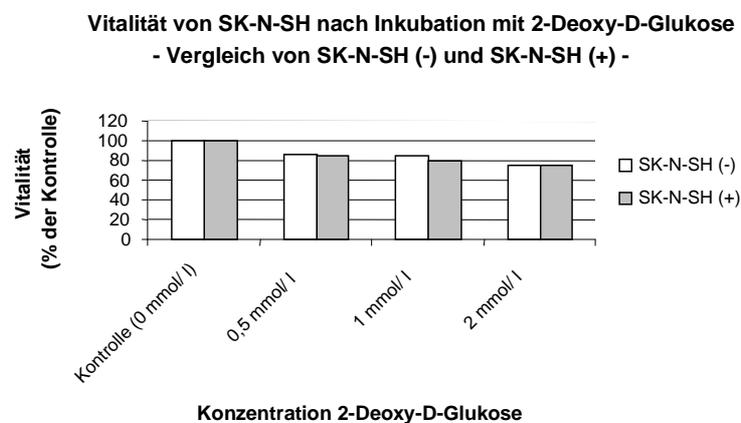


Abb. 31.: Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose (dG) auf die Vitalität von Kelly (**A**) und SK-N-SH (**B**). Vergleich von Kelly (-) und Kelly (+) sowie SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+). Kelly (-) und Kelly (+) sowie SK-N-SH (-) und SK-N-SH (+) wurden für 48 h mit dG in Konzentrationen von 0,5, 1 und 2 mmol/l f.c. behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 % (Durchschnittliche Extinktion der Kontrollen: Kelly (-): 0,338 \approx 25.000 Zellen; Kelly (+): 0,289 \approx < 25.000 Zellen. SK-N-SH (-): 0,281 \approx 30.000 Zellen; SK-N-SH (+): 0,248 \approx < 25.000 Zellen). Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Zwölfachbestimmungen für Kelly (-) und Kelly (+) (n = 4) und acht bzw. sieben unabhängigen Zwölfachbestimmungen für SK-N-SH (-) bzw. SK-N-SH (+) (n = 8; n = 7). Die Standardabweichungen der einzelnen Versuchsdurchführungen betragen 1 – 15 % und wurden wie die Daten aus den einzelnen Versuchsdurchführungen und die p-Values im Anhang aufgelistet.

3.3.3. Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose auf den Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen

3.3.3.1. Bestimmung von Glukose in Anwesenheit von 2-Deoxy-D-Glukose

Die Glukosebestimmung erfolgte mit Hilfe enzymatischer Reaktionen und deren photometrischer Messung. Glukose wurde durch das Enzym Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat umgesetzt. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysierte anschließend die Umsetzung des entstandenen Glukose-6-Phosphat zu D-Gluconat-6-Phosphat. Das dabei entstehende $\text{NADPH} + \text{H}^+$ war der vorhandenen Glukosemenge äquivalent und wurde photometrisch gemessen.

Um einen Einfluss von dG auf die enzymatische Glukosebestimmung auszuschließen, wurde in Lösungen von 1 mmol/ l f.c. Glukose, 1 mmol/ l f.c. dG sowie 1 mmol/ l f.c. Glukose + 1 mmol/ l f.c. dG innerhalb von 15 min wiederholt mittels dieser Reaktionen der Glukosegehalt bestimmt (**Abb. 32.**).

In der Lösung von 1 mmol/ l dG wurde zu keinem Zeitpunkt Glukose nachgewiesen. In der Lösung von 1 mmol/ l Glukose sowie in der Lösung von 1 mmol/ l Glukose + 1 mmol/ l dG wurden korrekte Werte von ca. 1 mmol/ l Glukose gemessen. Diese Werte veränderten sich innerhalb der 15-minütigen Inkubationszeit nur unwesentlich.

Aufgrund der für alle Lösungen erhaltenen korrekten Werte konnte die photometrische Methode in Anwesenheit von dG zur Glukosebestimmung verwendet werden

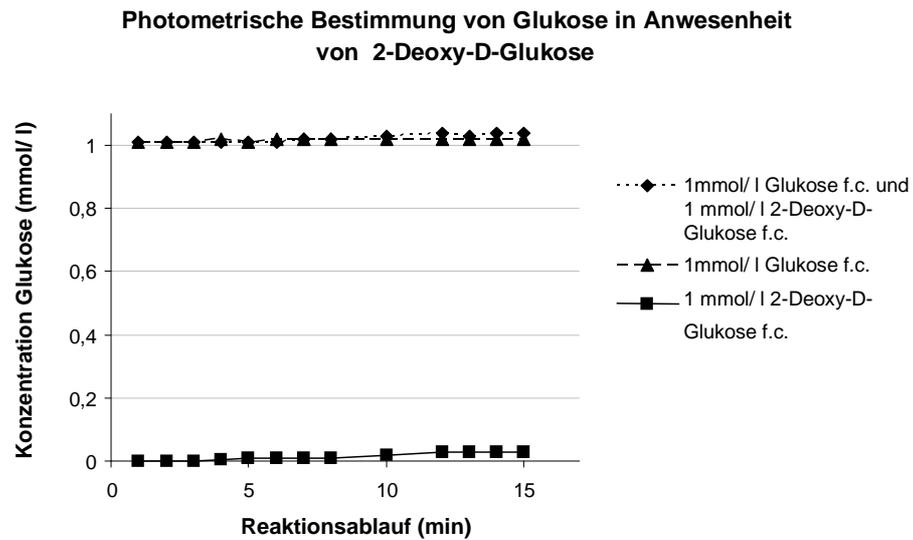


Abb. 32.: Photometrische Bestimmung von Glukose in Anwesenheit von 2-Deoxy-D-Glukose (dG). In Lösungen von 1 mmol/ l Glukose f.c., 1 mmol/ l dG f.c. und 1 mmol/ l Glukose f.c. + 1 mmol/ l dG f.c. in PBS⁺⁺ wurde innerhalb von 15 min in ca. einminütigen Abständen photometrisch der Glukosegehalt bestimmt. Gezeigt sind die Werte aus einer Bestimmung (n = 1).

3.3.3.2. Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellen in Anwesenheit von 2-Deoxy-D-Glukose

3.3.3.2.1. Glukose- und Laktatstoffwechsel sowie Sauerstoffverbrauchsrate bei Inkubation der Neuroblastomzellen in PBS⁺⁺ mit Glukose

dG hemmt über verschiedene Mechanismen die glykolytische Energiegewinnung. Dementsprechend sollten Zellen in Anwesenheit von dG eine geringere Glykolyserate aufweisen. Glukoseverbrauch und Laktatproduktion sollten zurückgehen, die Sauerstoffverbrauchsrate sollte aufgrund einer gesteigerten oxidativen Phosphorylierung zunehmen.

Um Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in Anwesenheit von dG zu untersuchen, wurden Kelly- und SK-N-SH-Zellen in Lösungen von 1 mmol/ l f.c. Glukose und 1 mmol/ l f.c. dG oder 5 mmol/ l f.c. Glukose und 1 mmol/ l f.c. dG inkubiert. Die Kontrollen wurden in einer 1 mmol/ l f.c. oder 5 mmol/ l f.c.

Glukoselösung in Abwesenheit von dG geführt. Innerhalb von 240 min wurde wiederholt der Glukose- und Laktatgehalt bestimmt. Zeitgleich wurden die Sauerstoffverbrauchsrate in parallelen Ansätzen der verschiedenen Zellstammlösungen gemessen. Glukose- und Laktatgehalt sowie Sauerstoffverbrauchsrate wurden für die Suspensionen von Kelly-Zellen in **Abb. 33.1.** gegen die Inkubationszeit aufgetragen, für Suspensionen von SK-N-SH-Zellen in **Abb. 33.2.**

Die Versuche wurden für beide Zelllinien zusätzlich mit 0 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l dG sowie 0 mmol/ l Glukose als Kontrolle durchgeführt. In diesen Lösungen konnten weder Glukose noch Laktat nachgewiesen werden. Entsprechend wurden die Ergebnisse aus diesen Bestimmungen zu den Zeitpunkten $t = 0$ min und $t = 240$ min lediglich im Anhang aufgelistet. Auch die Sauerstoffverbrauchsrate dieser Zellsuspensionen sind im Anhang aufgeführt.

In der Lösung von Kelly mit 1 mmol/ l Glukose nahm der Glukosegehalt innerhalb von 240 min von 1,1 auf 0,5 mmol/ l ab. Der Laktatgehalt stieg von 0,1 auf 0,4 mmol/ l. In Anwesenheit von 1 mmol/ l Glukose sowie 1 mmol/ l dG erfolgte bei Kelly eine Glukoseabnahme von 1,4 auf 0,6 mmol/ l. Der Laktatgehalt stieg von 0,1 auf 0,4 mmol/ l. Die Sauerstoffverbrauchsrate war in der Suspension mit 1 mmol/ l f. c. Glukose mit $- 4, 15 \mu\text{mol/ min}$ deutlich höher als in der Suspension mit 1 mmol/ l f. c. Glukose und 1 mmol/ l f. c. dG mit $- 1, 9 \mu\text{mol/ min}$.

In der Lösung von Kelly mit 5 mmol/ l Glukose sank der Glukosegehalt innerhalb von 240 min von 4,9 auf 4,4 mmol/ l, der Laktatgehalt stieg von 0,2 auf 1 mmol/ l. In Anwesenheit von 5 mmol/ l Glukose sowie 1 mmol/ l dG wurde eine Abnahme der Glukosekonzentration von 5,4 auf 4,0 mmol/ l sowie eine Zunahme der Laktatkonzentration von 0,1 auf 0,8 mmol/ l verzeichnet. Mit $- 2 \mu\text{mol/ min}$ war die Sauerstoffverbrauchsrate in Anwesenheit von 5 mmol/ l Glukose etwas höher als in Anwesenheit von 5 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l dG ($- 1,7 \mu\text{mol/ min}$).

Tab. 7. stellt eine Übersicht über die Abnahme der Glukosekonzentration und die Zunahme der Laktatkonzentration zwischen den Zeitpunkten $t = 0$ min und $t = 240$ min sowie die Sauerstoffverbrauchsraten innerhalb des Zeitraumes $t = 10$ min bis $t = 45$ min (1 mmol/ l Glukose + 1 mmol/ l dG, 5 mmol/ l Glukose + 1 mmol/ l dG) bzw. des Zeitraumes $t = 0$ min bis $t = 10$ min (1 mmol/ l Glukose, 5 mmol/ l Glukose) in den verschiedenen Suspensionskulturen von Kelly-Zellen dar.

Tab. 7.: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion sowie Sauerstoffverbrauchsraten bei Inkubation von Kelly-Zellen in PBS⁺⁺ mit Glukose

	Kelly-Zellen		
Glukose- bzw. dG-Gehalt in der Suspensionskultur	Glukoseverbrauch (mmol/ l)	Laktatproduktion (mmol/l)	O ₂ -Verbrauch (- 0,001 µmol/ min)
1 mmol/ l Glukose	0,6	0,3	t = 0 min bis t = 10 min 4,15
1 mmol/ l Glukose + 1 mmol/ l dG	0,8	0,3	t = 10 min bis t = 45 min 1,9
5 mmol/ l Glukose	0,5	0,1	t = 0 min bis t = 10 min 2
5 mmol/ l Glukose + 1 mmol/ l dG	1,4	0,7	t = 10 min bis t = 45 min 1,7

A

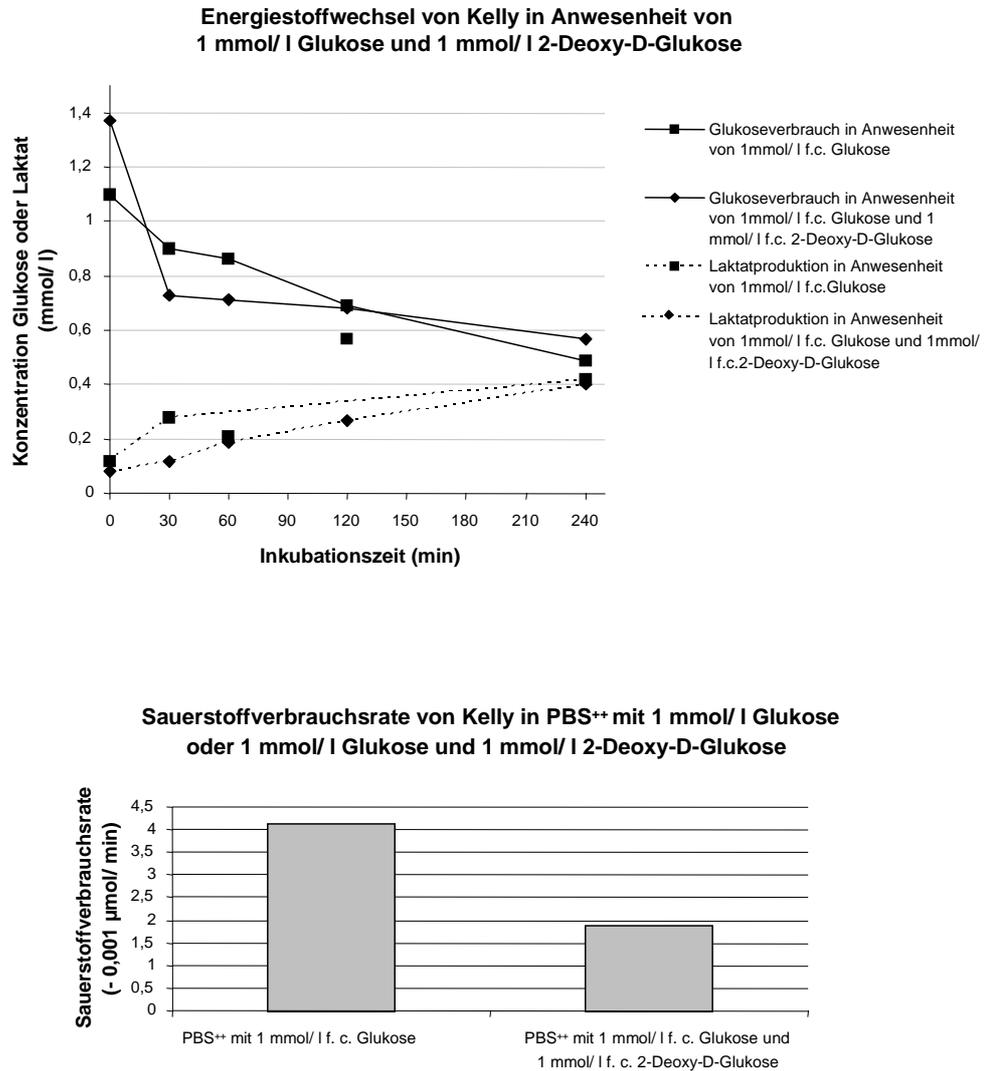
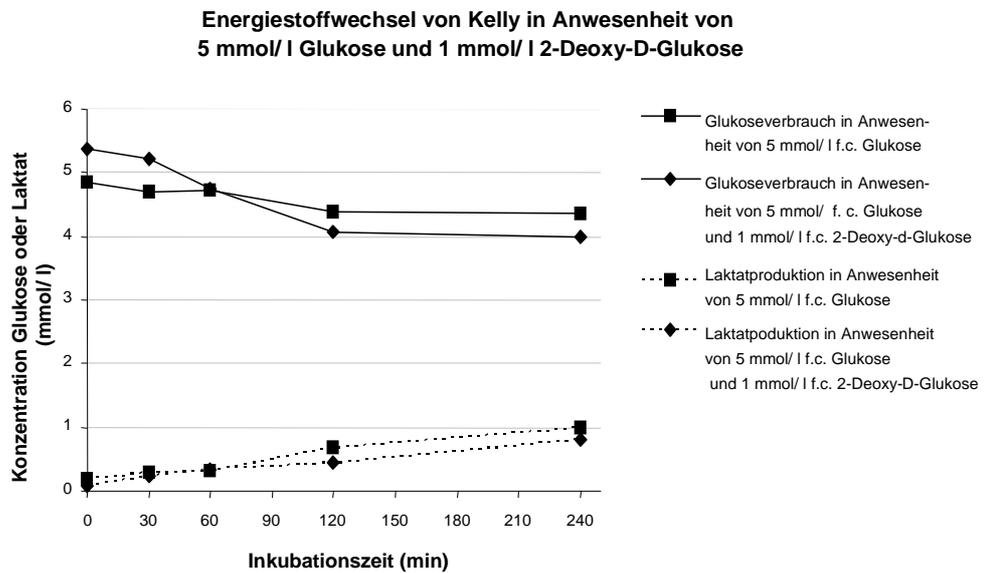


Abb. 33.1. (A): Energiestoffwechsel von Kelly-Zellen in Anwesenheit von 1 mmol/l Glukose und 1 mmol/l 2-Deoxy-D-Glukose (dG). Zellsuspensionen von Kelly in einer Konzentration von 2 Mio Zellen/ml wurden in PBS⁺⁺ mit verschiedenem Glukose- und dG-Gehalt inkubiert. Zu den Zeitpunkten t = 0, 30, 60, 120 und 240 min wurden Glukose- und Laktatwerte photometrisch bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. In den Suspensionen von PBS⁺⁺ mit 1 mmol/l f. c. Glukose wurden die Sauerstoffraten innerhalb des Zeitraumes t = 0 min bis t = 10 min gemessen, in den Suspensionen von PBS⁺⁺ mit 1 mmol/l f. c. Glukose und 1 mmol/l f. d. dG innerhalb des Zeitraumes t = 10 min bis t = 45 min. Gezeigt sind die Werte aus einer Bestimmung (n = 1).

B



**Sauerstoffverbrauchsrate von Kelly in PBS⁺⁺ mit 5 mmol/l Glukose
oder 5 mmol/l Glukose und 1 mmol/l 2-Deoxy-D-Glukose**

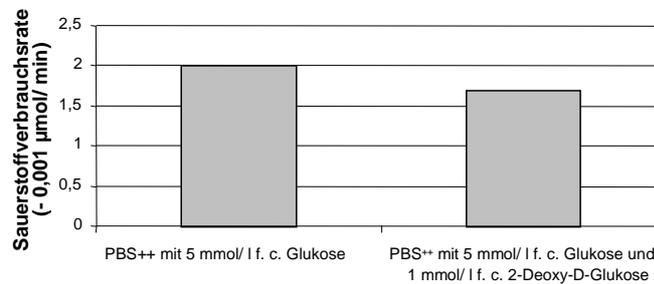


Abb. 33.1. (B): Energiestoffwechsel von Kelly-Zellen in Anwesenheit von 5 mmol/l Glukose und 1 mmol/l dG. Zellsuspensionen von Kelly in einer Konzentration von 2 Mio Zellen/ml wurden in PBS⁺⁺ mit verschiedenem Glukose- und dG-Gehalt inkubiert. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 30, 60, 120$ und 240 min wurden Glukose- und Laktatwerte photometrisch bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. In den Suspensionen von PBS⁺⁺ mit 5 mmol/l f. c. Glukose wurden die Sauerstoffraten innerhalb des Zeitraumes $t = 0$ min bis $t = 10$ min gemessen, in den Suspensionen von PBS⁺⁺ mit 5 mmol/l f. c. Glukose und 1 mmol/l f. c. dG innerhalb des Zeitraumes $t = 10$ min bis $t = 45$ min. Gezeigt sind die Werte aus einer Bestimmung ($n = 1$).

In der Lösung von SK-N-SH mit 1 mmol/ l Glukose sank der Glukosegehalt von 1 auf 0,5 mmol/ l, der Laktatgehalt stieg von 0,1 auf 0,4 mmol/ l. In Anwesenheit von 1 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l dG sank der Glukosegehalt geringfügig langsamer von 0,9 auf 0,6 mmol/ l, der Laktatgehalt stieg deutlich langsamer von 0,05 auf 0,15 mmol/ l. In Anwesenheit von 1 mmol/ l Glukose wurde mit $- 1,55 \mu\text{mol/ min}$ eine höhere Sauerstoffverbrauchsrate gemessen als in Anwesenheit von 1 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l dG ($- 0,86 \mu\text{mol/ min}$).

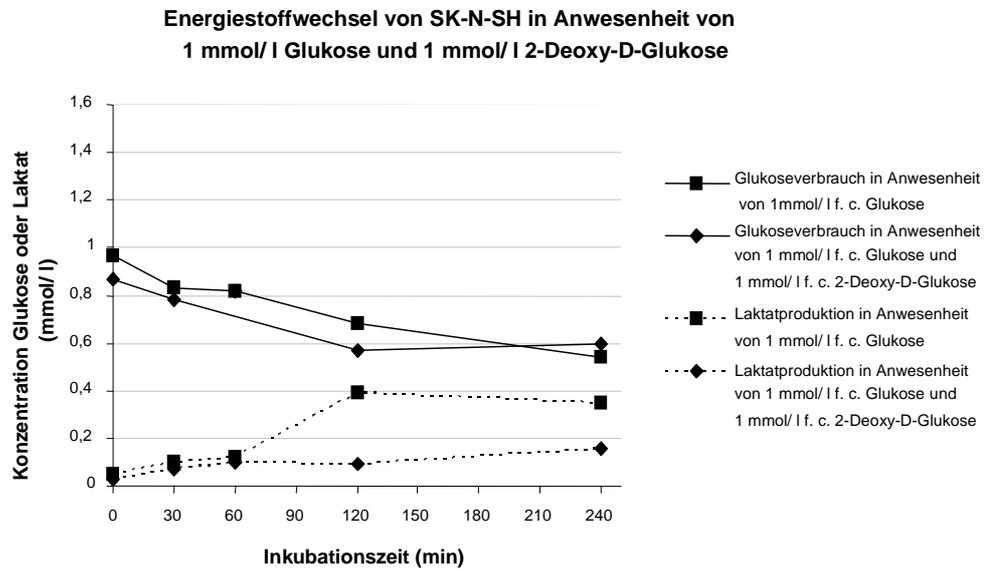
In der Lösung von SK-N-SH mit 5 mmol/ l Glukose sank der Glukosegehalt von 5 auf 4,5 mmol/l, der Laktatgehalt stieg von 0,1 auf 0,5 mmol/ l. In Anwesenheit von 5 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l dG sank der Glukosegehalt von 6,4 auf 4,2 mmol/ l, der Laktatgehalt stieg von 0 auf ca. 0,3 mmol/ l. In der Suspension von 5 mmol/ l Glukose zeigte sich mit $- 1,5 \mu\text{mol/ min}$ eine höhere Sauerstoffverbrauchsrate als in der Suspension von 5 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l dG ($- 0,78 \mu\text{mol/ min}$).

In **Tab. 8.** wurden Glukoseverbrauch und Laktatproduktion zwischen den Zeitpunkten $t = 0 \text{ min}$ und $t = 240 \text{ min}$ in den Suspensionen von SK-N-SH-Zellen aufgelistet. Die Sauerstoffverbrauchsraten beziehen sich auf den Zeitraum $t = 10 \text{ min}$ bis $t = 45 \text{ min}$ (1 mmol/ l Glukose + 1 mmol/ l dG, 5 mmol/ l Glukose + 1 mmol/ l dG) bzw. den Zeitraum $t = 15 \text{ min}$ bis $t = 40 \text{ min}$ (1 mmol/ l Glukose, 5 mmol/ l Glukose).

Tab. 8.: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion sowie Sauerstoffverbrauchsraten bei Inkubation von SK-N-SH-Zellen in PBS⁺⁺ mit Glukose

	SK-N-SH-Zellen		
Glukose- bzw. dG-Gehalt in der Suspensionskultur	Glukoseverbrauch (mmol/ l)	Laktatproduktion (mmol/ l)	O ₂ -Verbrauchsrate (- 0,001 µmol/ min)
1 mmol/ l Glukose	0,5	0,3	t = 15 min bis t = 40 min 1,55
1 mmol/ l Glukose + 1 mmol/ l dG	0,3	0,1	t = 10 min bis t = 45 min 0,86
5 mmol/ l Glukose	0,5	0,4	t = 15 min bis t = 40 min 1,5
5 mmol/ l Glukose + 1 mmol/ l dG	2,2	0,3	t = 10 min bis t = 45 min 0,78

A



**Sauerstoffverbrauchsrate von SK-N-SH in PBS⁺⁺ mit 1 mmol/l Glukose
oder 1 mmol/l Glukose und 1 mmol/l 2-Deoxy-D-Glukose**

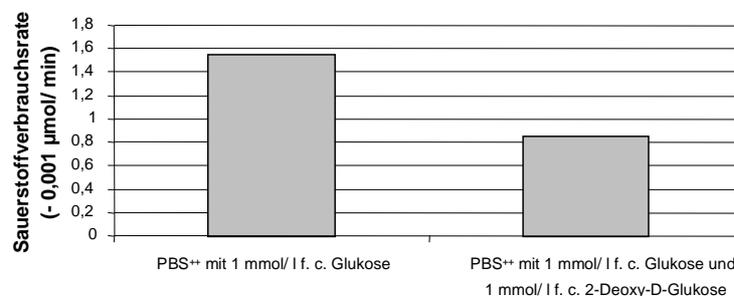
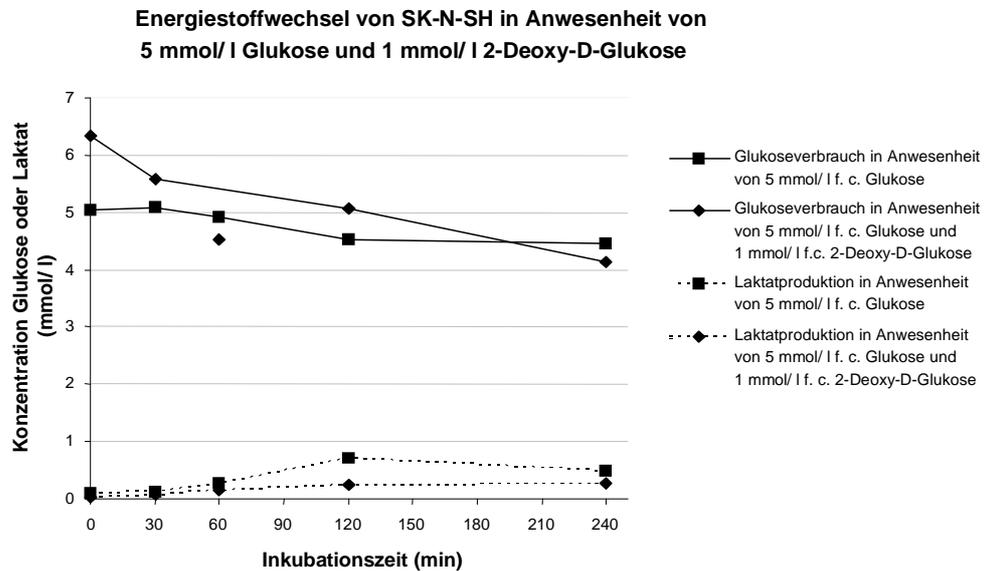


Abb. 33.2 (A):

Energiestoffwechsel von SK-N-SH-Zellen in Anwesenheit von 1 mmol/l Glukose und 1 mmol/l 2-Deoxy-D-Glukose (dG). Zellsuspensionen von SK-N-SH in einer Konzentration von 2 Mio Zellen/ml wurden in PBS⁺⁺ mit verschiedenem Glukose- und dG-Gehalt inkubiert. Zu den Zeitpunkten t = 0, 30, 60, 120 und 240 min wurden Glukose- und Laktatwerte photometrisch bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. In den Suspensionen von PBS⁺⁺ mit 1 mmol/l f. c. Glukose wurden die Sauerstoffraten innerhalb des Zeitraumes t = 15 min bis t = 40 min gemessen, in den Suspensionen von PBS⁺⁺ mit 1 mmol/l f. c. Glukose und 1 mmol/l f. d. dG innerhalb des Zeitraumes t = 10 min bis t = 45 min. Gezeigt sind die Werte aus einer Bestimmung (n = 1).

B



**Sauerstoffverbrauchsrate von SK-N-SH in PBS⁺⁺ mit 5 mmol/l Glukose
oder 5 mmol/l Glukose und 1 mmol/l 2-Deoxy-D-Glukose**

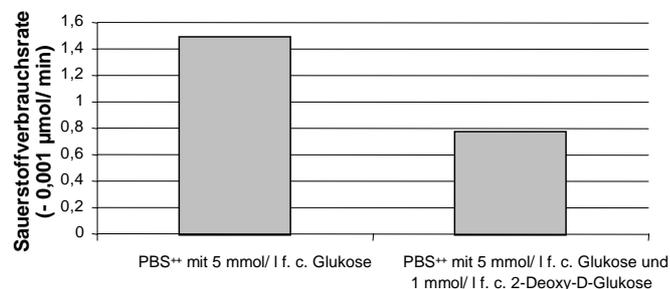


Abb. 33.2. (B):

Energiestoffwechsel von SK-N-SH-Zellen in Anwesenheit von 5 mmol/l Glukose und 1 mmol/l dG. Zellsuspensionen von SK-N-SH in einer Konzentration von 2 Mio Zellen/ml wurden in PBS⁺⁺ mit verschiedenem Glukose und dG-Gehalt inkubiert. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 30, 60, 120$ und 240 min wurden Glukose- und Laktatwerte photometrisch bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. In den Suspensionen von PBS⁺⁺ mit 5 mmol/l f. c. Glukose wurden die Sauerstoffraten innerhalb des Zeitraumes $t = 15$ min bis $t = 40$ min gemessen, in den Suspensionen von PBS⁺⁺ mit 5 mmol/l f. c. Glukose und 1 mmol/l f. c. dG innerhalb des Zeitraumes $t = 10$ min bis $t = 45$ min. Gezeigt sind die Werte aus einer Bestimmung ($n = 1$).

3.3.3.2.2. Glukose- und Laktatstoffwechsel sowie Sauerstoffverbrauchsrate bei Inkubation der Neuroblastomzellen in RPMI 1640

Um den Einfluss von dG auf den Energiestoffwechsel von Neuroblastomzellensuspensionskulturen in RPMI 1640 zu untersuchen, wurden Kelly- und SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640 sowie in RPMI 1640 mit einer dG-Konzentration von 1 mmol/ l f.c. inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von 240 min wurden Glukose- und Laktatgehalt photometrisch bestimmt (**Abb. 34.**). Zeitgleich wurden die Sauerstoffverbrauchsrate in den verschiedenen Zellsuspensionen bestimmt (**Abb. 34.**).

Im verwendeten Zellkulturmedium RPMI 1640 sind ca. 11 mmol/ l f.c. Glukose enthalten, Laktat konnte nicht nachgewiesen werden (**siehe 3.2.1.**).

Bei Inkubation von Kelly-Zellen in RPMI 1640 sank der Glukosegehalt innerhalb von 240 min von 11,1 auf 8,2 mmol/ l, der Laktatgehalt stieg von 0,2 auf 1,6 mmol/ l. In Anwesenheit von 1 mmol/ l dG sank der Glukosegehalt etwas langsamer von 10,7 auf 9,9 mmol/ l, der Laktatgehalt nahm von 0,2 auf 1,2 mmol/ l zu.

Bei Inkubation von SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640 war innerhalb von 240 min eine Abnahme des Glukosegehalts von 11,9 auf 10,6 mmol/ l sowie eine Zunahme des Laktatgehalts von 0,1 auf 0,6 mmol/ l zu verzeichnen. In Anwesenheit von 1 mmol/ l dG sank der Glukosegehalt von 11,1 auf ca. 9,6 mmol/ l zum Zeitpunkt $t = 120$, der Laktatgehalt sank von 1,0 auf 0,9 mmol/ l.

In der Suspension von Kelly-Zellen mit 1 mmol/ l f. c. dG wurde innerhalb des Zeitraums $t = 10$ min bis $t = 45$ min mit $- 2,4 \mu\text{mol/ min}$ eine im Vergleich zur Suspension von Kelly-Zellen ohne dG um ca. $- 0,2 \mu\text{mol/ min}$ höhere Sauerstoffverbrauchsrate gemessen. In den Suspensionen von SK-N-SH-Zellen hingegen war die Sauerstoffverbrauchsrate in Anwesenheit von 1 mmol/ l dG mit $- 0,85 \mu\text{mol/ min}$ um ca. $- 0,35 \mu\text{mol/ min}$ geringer als in der Suspension ohne dG.

In **Tab. 9.** wurden Glukoseverbrauch und Laktatproduktion im Zeitraum $t = 0$ min bis $t = 240$ min sowie der Sauerstoffverbrauch im Zeitraum $t = 10$ min bis $t = 45$ min in den Suspensionen von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640 bzw. RPMI 1640 mit 1 mmol/ l dG aufgelistet.

Tab. 9.: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion sowie Sauerstoffverbrauchs-raten bei Inkubation von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640

	Kelly-Zellen			SK-N-SH-Zellen		
	Glukose- verbrauch (mmol/ l)	Laktat- produktion (mmol/ l)	O ₂ - Verbrauchs- Rate (- 0,001 µmol/ min)	Glukose- verbrauch (mmol/ l)	Laktat- produktion (mmol/ l)	O ₂ - Verbrauchs- rate (- 0,001 µmol/ min)
RPMI 1640	2,9	1,4	t = 10 min bis t = 45 min: 2,19	1,3	0,5	t = 10 min bis t = 45 min: 1,19
RPMI 1640 + 1 mmol/ l dG	0,8	1,0	t = 10 min bis t = 45 min: 2,46	0,5	0,1	t = 10 min bis t = 45 min: 0,85

A

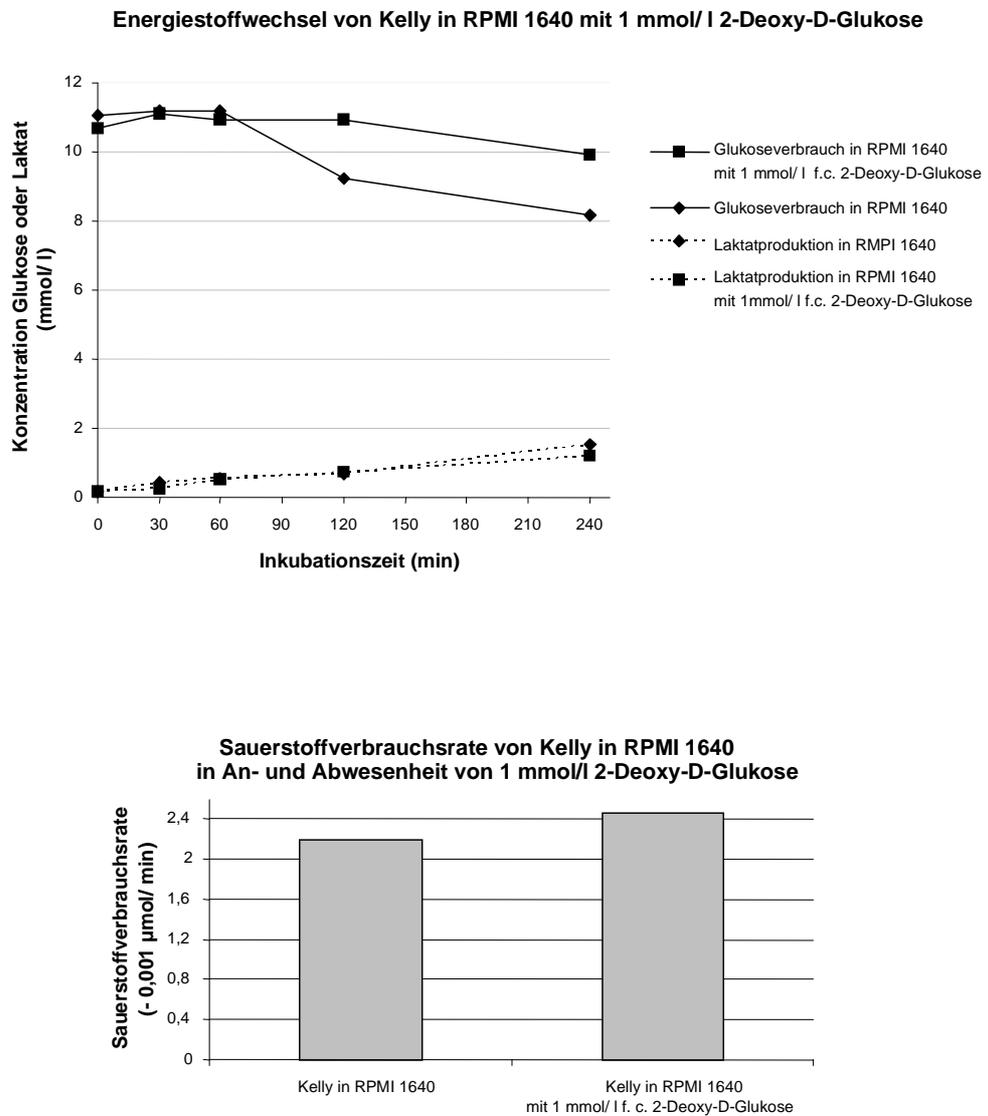


Abb. 34. (A): Energiestoffwechsel von Kelly-Zellen in RPMI 1640 mit 1 mmol/l 2-Deoxy-D-Glukose f. c. (dG). Zellsuspensionen von Kelly-Zellen in einer Konzentration von 2 Mio Zellen/ml wurden in RPMI 1640 und in RPMI 1640 mit 1 mmol/l f.c. dG inkubiert. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 30, 60, 120$ und 240 min wurden Glukose- und Laktatwerte photometrisch bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Gleichzeitig wurden innerhalb des Zeitraums $t = 10$ min bis $t = 45$ min die Sauerstoffverbrauchsrate in den jeweiligen Suspensionen gemessen. Gezeigt sind die Werte aus einer Bestimmung ($n = 1$).

B

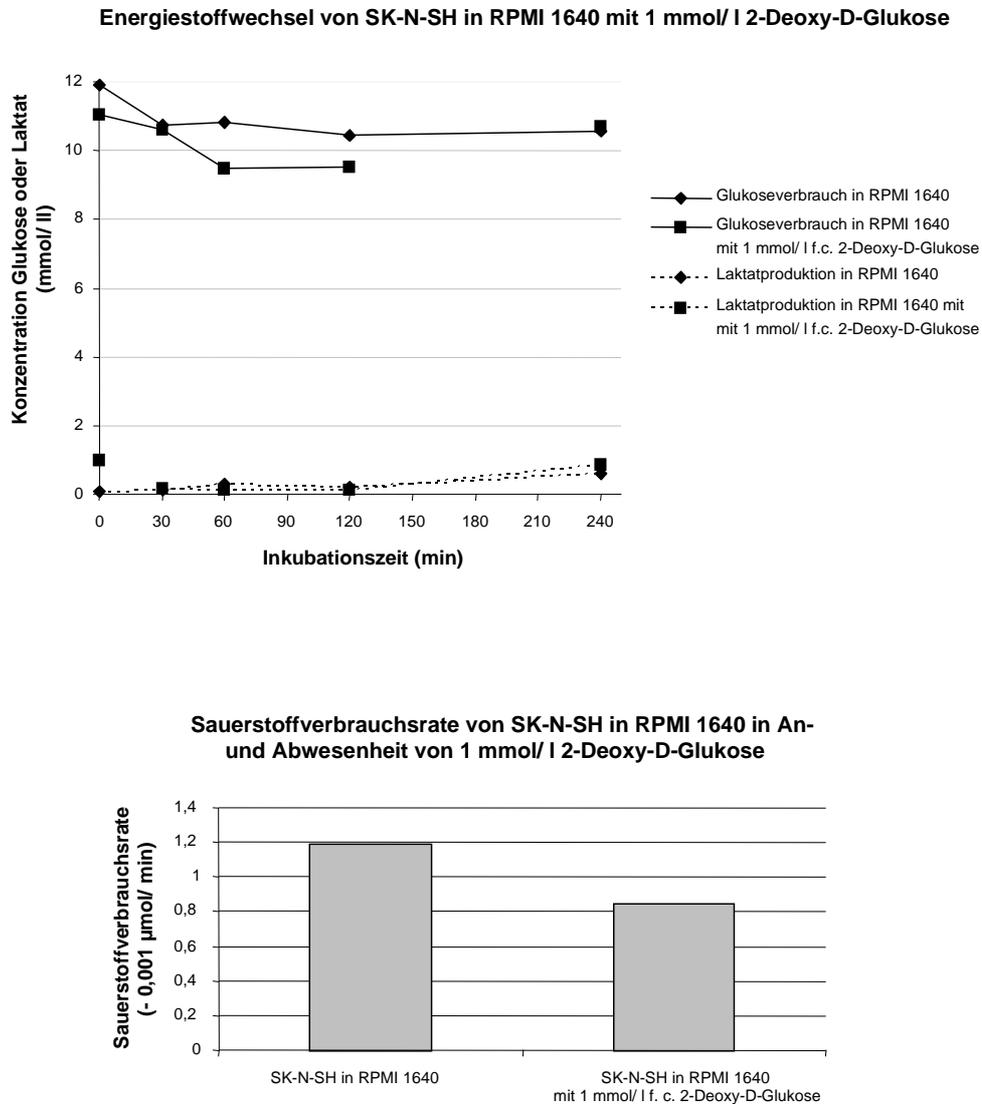


Abb. 34. (B): Energiestoffwechsel von SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640 mit 1 mmol/l 2-Deoxy-D-Glukose f. c. (dG). Zellsuspensionen SK-N-SH-Zellen in einer Konzentration von 2 Mio Zellen/ml wurden in RPMI 1640 und in RPMI 1640 mit 1 mmol/l f.c. dG inkubiert. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 30, 60, 120$ und 240 min wurden Glukose- und Laktatwerte photometrisch bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Gleichzeitig wurden innerhalb des Zeitraums $t = 10$ min bis $t = 45$ min die Sauerstoffverbrauchsrate in den jeweiligen Suspensionen gemessen. Gezeigt sind die Werte aus einer Bestimmung ($n = 1$).

3.3.4 Kurzzeitbehandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und Wasserstoffperoxid

3.3.4.1. Kurzzeitbehandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und Wasserstoffperoxid im micromolaren Konzentrationsbereich

H₂O₂ besitzt eine direkte Toxizität gegenüber Neuroblastomzellen. dG ist ein Hemmstoff der Glykolyse.

Um einen kumulativen Effekt der Toxizität von dG und H₂O₂ im micromolaren Bereich auf Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurden Kelly und SK-N-SH für 48 h mit verschiedenen Kombinationen der beiden Substanzen behandelt. dG in Konzentrationen von 2 mmol/ l, 4 mmol/ l und 6 mmol/ l dG f.c. wurde mit H₂O₂ in Konzentrationen von 25 µmol/ l und 50 µmol/ l f.c. kombiniert. (**Abb. 35.**). Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt.

Bei Kelly ergab sich für alle eingesetzten Kombinationen eine ähnliche Reduktion der Zellvitalität um 65 % – 75 %. Nach Behandlung mit 2 mmol/ l dG sowie 25 und 50 µmol/ l H₂O₂ betrug die Zellvitalität jeweils ca. 35 %. Mit ca. 25 % vitalen Zellen nach Behandlung mit 6 mmol/ l dG sowie 25 und 50 µmol/ l H₂O₂ stieg die Toxizität der Substanzkombination leicht an. Kombination von dG mit 50 µmol/ l H₂O₂ ließ eine unwesentlich stärkere Zytotoxizität erkennen als Kombination mit 25 µmol/ l.

Bei SK-N-SH bewirkte eine Inkubation mit 2, 4 und 6 mmol/ l sowie 25 µmol/ l H₂O₂ einen Rückgang der Zellvitalität auf ca. 30 %, 20 % und 20 %. Bei Kombination der verschiedenen dG-Konzentrationen mit 50 µmol/ l H₂O₂ sank die Zellvitalität durchwegs auf ca. 10 %.

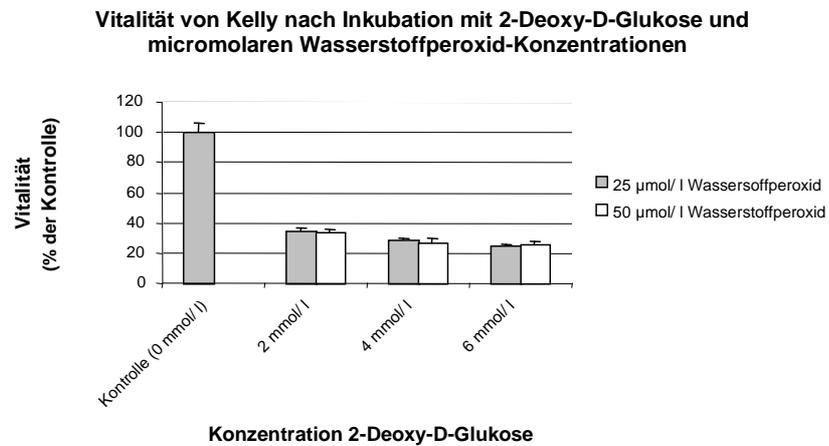
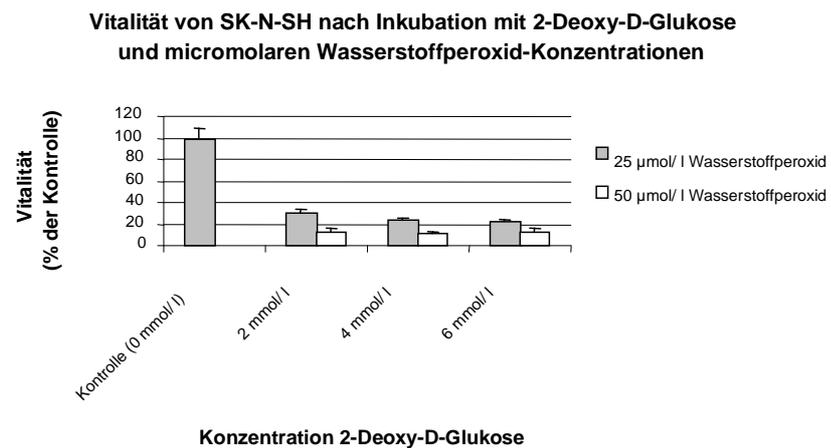
A**B**

Abb. 35.: Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose (dG) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im micromolaren Konzentrationsbereich auf die Vitalität von Kelly (**A**) und SK-N-SH (**B**). Kelly und SK-N-SH wurden für 48 h mit dG in Konzentrationen von 2, 4 und 6 mmol/l f.c. in Kombination mit H_2O_2 in Konzentrationen von 25 sowie 50 µmol/l f.c. behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 % (Extinktion der Kontrollen: Kelly: 0,45 \approx 65.000 Zellen, SK-N-SH: 0,08 \approx < 25.000 Zellen). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (+ SD) aus einer unabhängigen Sechsfachbestimmung (n = 1).

3.3.4.2. Kurzzeitbehandlung mit 2-Deoxy-D-Glukose und Wasserstoffperoxid im millimolaren Konzentrationsbereich

Um einen kumulativen Effekt von dG und H_2O_2 im millimolaren Konzentrationsbereich auf Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurde Kelly für 48 h mit H_2O_2 in Konzentrationen von 0,1, 1 und 10 mmol/ l H_2O_2 f.c. oder dG in einer Konzentration von 10 mmol/ l f.c. behandelt. In weiteren *well's* erfolgte eine Behandlung mit beiden Substanzen. H_2O_2 -Konzentrationen von 0,1, 1 oder 10 mmol/ l wurden hierfür jeweils mit 10 mmol/ l dG kombiniert (**Abb. 36.**). Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt.

Bei Behandlung mit 10 mmol/ l dG wurde die Zellvitalität auf ca. 10 % reduziert, bei Behandlung mit 0,1 mmol/ l H_2O_2 auf ca. 50 %. Mit Ausnahme von ca 5 % vitalen Zellen bei Kombination von 0,1 mmol/ l H_2O_2 und 10 mmol/ l dG war ansonsten keine Zellvitalität nachweisbar.

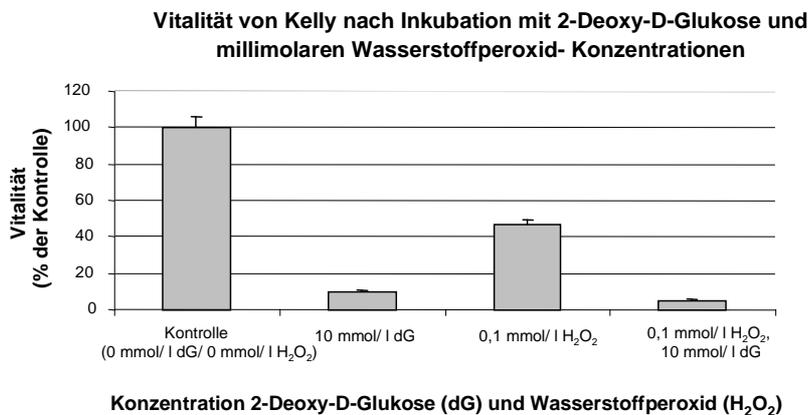


Abb. 36.: Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose (dG) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im millimolaren Konzentrationsbereich auf die Vitalität von Kelly. Kelly wurde für 48 h mit H_2O_2 in Konzentrationen von 0,1, 1 und 10 mmol/ l f.c. und 10 mmol/ l dG f.c. behandelt. In weiteren *well's* erfolgte eine Behandlung mit beiden Substanzen. H_2O_2 -Konzentrationen von 0,1, 1 oder 10 mmol/ l wurden hierfür jeweils 10 mmol/ l dG kombiniert. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 % (Extinktion der Kontrolle: 0,44 \approx 55.000 Zellen). Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (+ SD) aus einer Sechsfachbestimmung (n = 1) für die Behandlung mit 10 mmol/ l dG, 0,1 mmol/ l H_2O_2 sowie die Kombination aus 0,1 mmol/ l H_2O_2 und 10 mmol/ l dG.

3.3.5 Behandlung von Kurzzeitkulturen mit Dichloressigsäure

3.3.5.1. Energiestoffwechsel in Anwesenheit von Dichloressigsäure

DCA greift über Blockierung der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase in den Energiestoffwechsel von Zellen ein. Der Stoffwechsel von Krebszellen kann so von der bevorzugten Glykolyse Richtung oxidative Phosphorylierung verschoben werden.

Um den Einfluss von DCA auf die glykolytische Aktivität von Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurden im Medium von Kelly-Kurzzeitkulturen nach 48 h Behandlung mit verschiedenen DCA-Konzentrationen zwischen 0 und 2000 $\mu\text{mol/l}$ f.c. die Glukose- und Laktatwerte bestimmt (**Abb. 37.**). Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte war vor der DCA-Zugabe ein Mediumwechsel durchgeführt worden. Entsprechend lag vor DCA-Zugabe in allen *wells* ein Glukosegehalt von ca. 11 mmol/l vor (**siehe 3.2.1.**). Die Glukosebestimmung erfolgte mittels Blutzuckermessgerät, die Laktatbestimmung photometrisch.

Bei Verminderung der Glykolyserate durch Inkubation mit DCA wurden mit steigender DCA-Konzentration steigende Glukose- und sinkende Laktatwerte erwartet.

Nach Inkubation in Medium ohne DCA lagen ca. 9 mmol/l f.c. Glukose vor, in Anwesenheit von 2000 $\mu\text{mol/l}$ ca. 9,9 mmol/l f.c. Glukose. Der Anstieg der Glukosewerte erfolgte vor allem im Konzentrationsbereich zwischen 1000 und 2000 $\mu\text{mol/l}$ DCA.

Parallel zum Glukoseanstieg sank der Laktatgehalt von ca. 1,6 mmol/l f.c. bei Inkubation in unverändertem Medium (0 $\mu\text{mol/l}$ DCA) auf ca. 0,8 mmol/l f.c. bei Inkubation mit 2000 $\mu\text{mol/l}$ DCA.

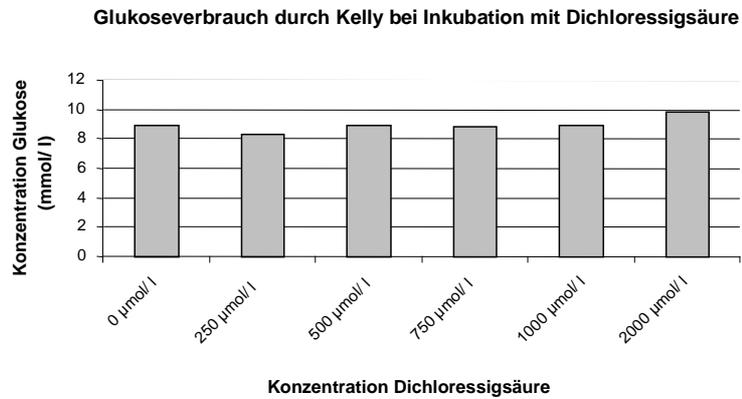
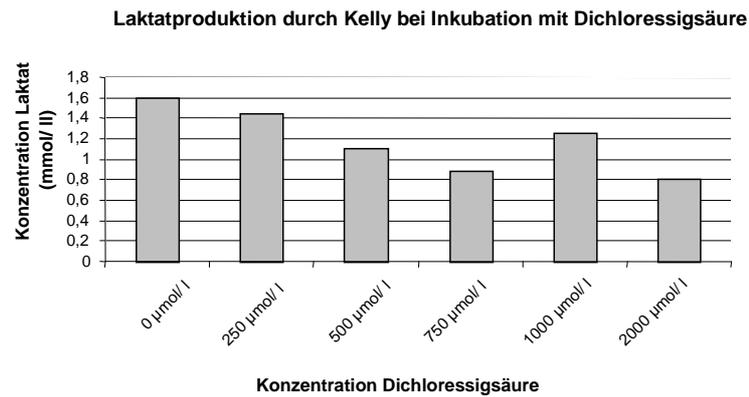
A**B**

Abb. 37.: Glukoseverbrauch (**A**) und Laktatproduktion (**B**) durch Kelly-Zellen bei Inkubation mit Dichloressigsäure (DCA). Kelly wurde für 48 h mit DCA in Konzentrationen von 250, 500, 750, 1000 und 2000 µmol/l f.c. behandelt. Vor Zugabe der DCA wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend wurden Glukose- und Laktatwerte bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Sechsfachbestimmungen (n = 2). Die Standardabweichungen wurden im Anhang aufgelistet und betragen 0,01 – 0,85.

3.3.5.2. Kurzzeitbehandlung mit Dichloressigsäure

Um die Wirkung von DCA auf Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurde Kelly für 48 h mit DCA in Konzentrationen zwischen 250 und 2000 $\mu\text{mol/l}$ f.c. behandelt (**Abb. 38.**). Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt.

Bei 250 $\mu\text{mol/l}$ sank die Zellvitalität unwesentlich um ca. 2 %. Zwischen 500 und 2000 $\mu\text{mol/l}$ wurde jeweils eine ähnliche Hemmung der Zellvitalität um ca. 15 – 20 % beobachtet.

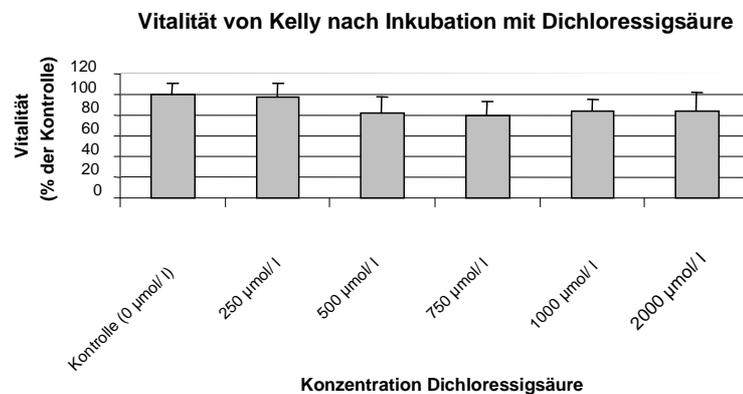


Abb. 38.: Einfluss von Dichloressigsäure (DCA) auf die Vitalität von Kelly. Kelly wurde für 48 h mit DCA in Konzentrationen zwischen 250 $\mu\text{mol/l}$ und 2000 $\mu\text{mol/l}$ behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt. Optische Dichte der unbehandelten Kontrollen = 100 %. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (+ SD) aus zwei unabhängigen Sechsfachbestimmungen ($n = 2$).

4. Diskussion

Aufgrund der Unzulänglichkeit vieler derzeit verfügbarer Therapieschemata wird ständig nach neuen Ansätzen zur Behandlung von Krebserkrankungen gesucht. Veröffentlichungen zur Zytotoxizität von hochdosiertem Ascorbat gegenüber Krebszellen (Chen et al. 2005; Chen et al. 2007; Chen et al. 2008) (**siehe 1.2.**) sowie verschiedene Arbeiten zu den molekularen Ursachen und der Bedeutung der gesteigerten Glykolyserate von Krebszellen (Warburg Effekt) (**siehe 1.3.**) haben die Diskussion um Ascorbat als Krebsmedikament erneut ins Leben gerufen.

Auf Grundlage oben genannter Publikationen wurden *in vitro*-Untersuchungen an Neuroblastomzellen durchgeführt. Es wurden die Wasserstoffperoxid-vermittelte Zytotoxizität von hochdosiertem Ascorbat sowie eine mögliche die Glykolyse hemmende Wirkung niedrigdosierten Ascorbats analysiert. Weiterhin wurden die Substanzen 2-Deoxy-D-Glukose sowie Dichloressigsäure bezüglich Vitalitäts- und Glykolyse-hemmender Eigenschaften an den beiden Neuroblastomzelllinien Kelly und SK-N-SH untersucht.

Das Neuroblastom ist ein neuroendokriner Tumor des sympathischen Nervensystems, der vorwiegend bei Kindern unter fünf Jahren auftritt (Cheung und Cohn 2005). Der Tumor zeichnet sich durch eine große histologische Heterogenität und Tumorzellen sehr unterschiedlichen Differenzierungsgrades aus.

Prognose und Therapie des Neuroblastoms hängen stark vom Stadium der Erkrankung ab. Im frühen Krankheitsstadium ist oftmals eine alleinige chirurgische Resektion curabel. Neuroblastome im fortgeschrittenen Stadium hingegen haben trotz Behandlung mit einer aggressiven Kombination aus Chemo- und Strahlentherapie, chirurgischer Resektion, Stammzelltransplantation und neueren Ansätzen wie zum Beispiel der Gabe von monoklonalen Antikörpern eine schlechte Langzeitprognose. Entsprechend wird ständig nach neuen Therapieoptionen gesucht.

Für die *in-vitro*-Versuche wurden mit den Zelllinien Kelly und SK-N-SH zwei Neuroblastomzelllinien gewählt, die sich hinsichtlich verschiedener Charakteristika deutlich unterscheiden.

Kelly verfügt im Gegensatz zu SK-N-SH über eine *MYCN*-Amplifikation und zeichnet sich entsprechend durch aggressiveres Wachstum aus (**siehe 2.2.1.**). SK-N-SH ist im Vergleich zu Kelly morphologisch höher differenziert und lässt sich aufgrund einer guten Aufnahme von [¹²³I]mIBG in die Zelle szintigraphisch darstellen (**siehe 2.2.1.**)

4.1. Ascorbat als „*prodrug*“ für die Bildung von zytotoxischem Wasserstoffperoxid

Extrazelluläres Ascorbat im millimolaren Konzentrationsbereich (bis 20 mmol/l) wirkt durch die Bildung von Wasserstoffperoxid *in vitro* zytotoxisch auf Krebszellen (Chen et al. 2005). Dies konnte für eine Vielzahl humaner und muriner Krebszelllinien sowie für einige Rattenkrebszelllinien gezeigt werden (Chen et al. 2005; Chen et al. 2008).

Die humanen Neuroblastomzelllinien Kelly und SK-N-SH reagierten in eigenen Untersuchungen ebenfalls sensibel auf eine Behandlung mit hochdosiertem Ascorbat. Während bei Inkubation mit micromolaren Konzentrationen lediglich ein leichter Rückgang der Zellvitalität beobachtet wurde, stieg die Zytotoxizität der Substanz im millimolaren Konzentrationsbereich zwischen 2 und 10 mmol/l sprunghaft an (**Abb. 18.**).

Unter Annahme der *in vitro* gezeigten, stark zytotoxischen Wirkung millimolarer Ascorbatkonzentrationen erscheint die strenge physiologische Kontrolle des Plasmaspiegels *in vivo* sinnvoll (**siehe 1.2.2.**). So beträgt die Ascorbatkonzentration im Plasma normalerweise ca. 60 µmol/l und steigt auch bei oraler Aufnahme großer Mengen an Ascorbat (0,5 mg pro Kilogramm Körpergewicht) nicht über ca. 220 µmol/l (Chen et al. 2005).

Bei intravenöser Gabe hingegen können die *in vitro* zytotoxischen, millimolaren Ascorbatkonzentrationen in Plasma und Extrazellulärflüssigkeit problemlos erreicht werden (Chen et al. 2007). So wurden bei Ratten nach i.v.-Verabreichung hochdosierten Ascorbats (0,5 mg pro Kilogramm Körpergewicht) maximale Ascorbatplasmaspiegel von über 8 mmol/l gemessen.

Die zytotoxische Wirkung von hochdosiertem Ascorbat gegenüber Krebszellen wird vermutlich durch die Bildung von zytotoxischen Wasserstoffperoxid vermittelt (Chen et al. 2005).

Ausgehend von dieser Annahme wurden neben den Versuchen zur Ascorbatwirkung verschiedene *in-vitro*-Untersuchungen an Kelly und SK-N-SH zur Zytotoxizität (**siehe 3.1.5.**) und Entgiftung (**siehe 3.1.4.**) von Wasserstoffperoxid durchgeführt.

Wasserstoffperoxid wirkt über verschiedene, konzentrationsabhängige intrazelluläre und extrazelluläre Mechanismen zytotoxisch (**siehe 1.2.4.**). Die Substanz diffundiert frei durch Zellmembranen. Entsprechend kann die Wasserstoffperoxidaufnahme von der Zelle nicht gesteuert werden und die Konzentration der Substanz im Intrazellulärraum hängt stark von derjenigen im Extrazellulärraum ab.

Bei Inkubation von Kelly und SK-N-SH mit Wasserstoffperoxid in Konzentrationen zwischen 25 $\mu\text{mol/l}$ und 200 $\mu\text{mol/l}$ zeigte sich eine mit der Substanzkonzentration kontinuierlich zunehmende zytotoxische Wirkung (**Abb. 26.**). Ein Großteil der zytotoxischen Wirkung trat innerhalb der ersten Stunde der Inkubation auf, was auf eine schnelle direkte oder indirekte oxidative Schädigung der Zelle (**siehe 1.2.4.**) durch die Substanz hinweist (**Abb. 28.**).

Bei mehrfacher Inkubation von Kelly und SK-N-SH mit unterschiedlichen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen und Inkubationszeiten fiel auf, dass die Toxizität identischer Substanzkonzentrationen mit steigender Anzahl der behandelten Zellen zu sinken schien (**siehe Anhang**). Dieser Zusammenhang wurde durch systematische Untersuchungen für Wasserstoffperoxid in Konzentrationen über 50 $\mu\text{mol/l}$ bestätigt (**Abb. 27.**).

Sowohl Kelly- als auch SK-N-SH-Zellen verfügten über gewisse Kapazitäten zur Entgiftung von zytotoxischem Wasserstoffperoxid. Die Effizienz der Wasserstoffperoxidentgiftung war bei Kelly-Zellen schneller und effizienter als bei SK-N-SH-Zellen. Dies wurde sowohl nach Zugabe eines auf die geringste eingesetzte Zellzahl leicht zytotoxisch wirkenden Wasserstoffperoxid-Bolus von 100 $\mu\text{mol/l}$ (**Abb. 24.**) beobachtet als auch bei kontinuierlicher Bildung der Substanz (ca. 200 $\mu\text{mol/l}$ Wasserstoffperoxid pro Stunde) (**Abb. 25.**). Die kontinuierliche

Bildung der Substanz wurde in Anwesenheit von Glukose durch Zugabe des Enzyms Glukose-Oxidase erreicht und sollte die allmähliche Bildung von Wasserstoffperoxid aus Ascorbat simulieren. Auch unter physiologischen Bedingungen sind Zellen einer gewissen Menge an kontinuierlich gebildetem Wasserstoffperoxid ausgesetzt.

Jede Zelle verfügt über einen gewissen Pool an Systemen zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid wie das Glutathion-System (**siehe Abb. 12.**) und das Enzym Katalase (**siehe 1.2.3.**). Entsprechend steigt mit der Zellzahl der Gesamtpool an Wasserstoffperoxid-entgiftenden Systemen. Vor diesem Hintergrund lässt sich die mit steigender Zellzahl sinkende Zytotoxizität sowie effizientere Entgiftung der Substanz durch Kelly und SK-N-SH plausibel erklären.

Auch bei Inkubation von Kelly und SK-N-SH mit Ascorbat wurde ab einer Konzentration von 2,5 mmol/l eine mit steigender Zellzahl sinkende Zytotoxizität der Substanz beobachtet. Diese Beobachtung traf sowohl für Zellen, die an physiologische Ascorbatkonzentrationen „adaptiert“ waren, als auch für Zellen aus ascorbatfreiem Milieu zu (**Abb. 20.1.** und **Abb. 20.2.**).

Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die zytotoxische Wirkung von Ascorbat – wie von Chen et al. postuliert – vor allem über die Bildung von freimembrangängigem Wasserstoffperoxid vermittelt wird.

Ob sich Zellen, die in Anwesenheit physiologischer Ascorbatkonzentrationen kultiviert worden waren, hinsichtlich ihrer Sensibilität gegenüber einer Ascorbat-Hochdosisbehandlung von Zellen aus Ascorbat-freiem Milieu unterscheiden, bleibt zu klären.

Ein gewisser Prozentsatz des bei einer Hochdosisbehandlung zugegebenen Ascorbat gelangt auch in den Intrazellulärraum. Es ist eine über die extrazelluläre, Wasserstoffperoxid-vermittelte Zytotoxizität hinausgehende intrazelluläre Wirkung der Substanz zu vermuten (**Abb. 39.**).

Die Ascorbataufnahme in die Zelle erfolgt zu einem kleinen Teil mittels spezifischer Ascorbattransporter, zum größten Teil jedoch in Form von Dehydroascorbat durch transmembranäre Glukosetransportmechanismen (**siehe 1.1.1.**)

(**Abb. 39.**). Nach Aufnahme in die Zelle wird Dehydroascorbat mit Hilfe des Glutathion-Systems wieder zu Ascorbat reduziert (**Abb. 39.**).

Vor diesem Hintergrund wurde die Wirkung von Dehydroascorbat im micro- und millimolaren Konzentrationsbereich auf Kelly- und SK-N-SH-Zellen untersucht und mit der Wirkung entsprechender Ascorbatkonzentrationen verglichen. Es wurde eine ähnliche – im Konzentrationsbereich um 10 mmol/ l starke – Zytotoxizität beider Substanzen festgestellt, wobei Dehydroascorbat im Vergleich zu Ascorbat geringfügig stärker zytotoxisch wirkte (**Abb. 21.**).

Dehydroascorbat wird – im Gegensatz zu Ascorbat – in unveränderter Form mittels Glukosetransporter in die Zelle aufgenommen und verfügt dementsprechend wahrscheinlich über einen besseren Zugang zur Zelle. Infolge ihrer erhöhten Glykolyserate exprimieren Krebszellen über einen ebenfalls durch HIF-1 gesteuerten Mechanismus eine erhöhte Anzahl an Glukosetransportern an der Zellmembran (Zelzer 1998). Über diese Transporter können neben Glukose große Mengen an Dehydroascorbat in die Zelle aufgenommen werden.

Bei einem massiven Einstrom von Dehydroascorbat wird die Zelle möglicherweise durch einen starken Verbrauch von GSH gegenüber anderen oxidierenden Substanzen sensibilisiert. Auch der durch eine erhöhte Notwendigkeit zur Regeneration von GSH gesteigerte ATP-Verbrauch trägt vermutlich zur „Labilisierung“ der Zelle bei. Diese beiden Aspekte tragen zu einem Erklärungsansatz für die stark zytotoxische Wirkung von Dehydroascorbat bei.

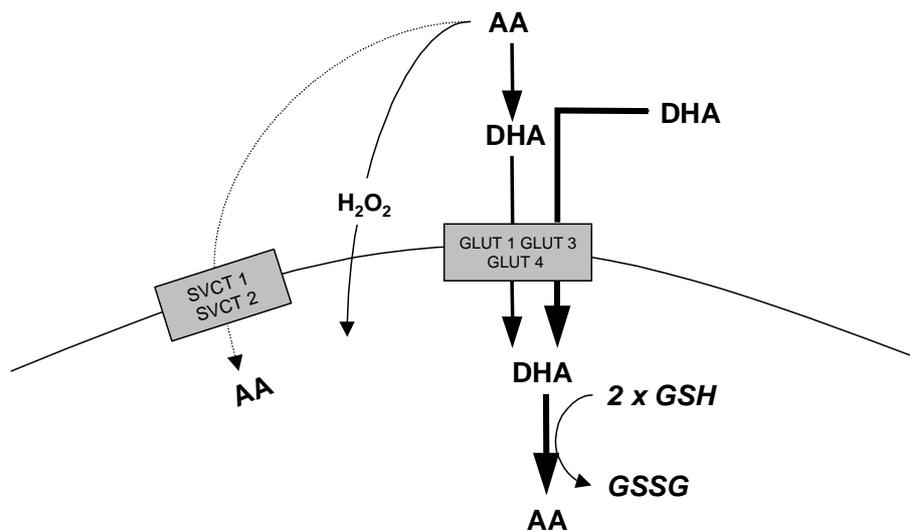


Abb. 39.: Zytotoxische Wirkungen von Ascorbat (AA) und Dehydroascorbat (DHA). Extrazelluläres AA ist vermutlich über die Bildung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zytotoxisch (Chen et al. 2005). Möglicherweise wirkt die Substanz darüber hinaus nach Aufnahme in die Zelle über intrazelluläre Mechanismen zellschädigend. AA gelangt vorwiegend als DHA über die Glukosetransporter GLUT 1, GLUT 3 und GLUT 4 in die Zelle und wird dort unter Oxidation von zwei Molekülen Glutathion (GSH) zu einem Molekül Glutathiondisulfid (GSSG) zu Ascorbat rückreduziert. DHA diffundiert unverändert durch GLUT 1, GLUT 3 und GLUT 4 in die Zelle und wird ebenfalls unter Verbrauch von GSH zu AA reduziert. Der Verbrauch an GSH nach gesteigertem Einstrom von AA oder DHA in die Zelle trägt möglicherweise zur Labilisierung der Zelle gegenüber anderen Noxen bei.

Unter einer Vielzahl an möglichen Wirkmechanismen besitzt Ascorbat in seiner Eigenschaft als Prooxidans anscheinend über mindestens zwei verschiedene Wege eine zytotoxische Wirkung auf Krebszellen. Beschrieben wurde die Wasserstoffperoxid-vermittelte Zytotoxizität von extrazellulärem Ascorbat sowie eine „Labilisierung“ der Zelle durch Schwächung der Glutathion- und ATP-Vorräte nach Aufnahme in die Zelle in Form von Dehydroascorbat.

Sowohl für hochdosiertes Ascorbat als auch für dessen „Produkt“ Wasserstoffperoxid und die oxidierte – in die Zelle aufgenommene – Form Dehydroascorbat konnte *in vitro* eine konzentrationsabhängige, zytotoxische

Wirkung gegenüber den humanen Neuroblastomzelllinien Kelly und SK-N-SH gezeigt werden.

Die Prognose des fortgeschrittenen Neuroblastoms ist bis heute trotz Behandlung mit einer aggressiven Kombinationstherapie schlecht (**siehe 4.**). Vor diesem Hintergrund sollten die *in vitro*-Ergebnisse Anlass zu weiteren Untersuchungen geben, ob Ascorbat möglicherweise – als alleiniges Agens gegeben oder in Kombination mit anderen Substanzen – einen positiven Effekt in der Therapie des Neuroblastoms haben könnte.

So konnten Ovarialkarzinom-, Pankreaskarzinom- und Gliblastom*xenografts* – ebenfalls aggressive Tumoren mit begrenzten Therapiemöglichkeiten – im Mausmodell bereits erfolgreich mit hochdosiertem Ascorbat behandelt werden (Chen et al. 2008).

Der Gedanke an hochdosiertes Ascorbat ist nicht zuletzt deswegen reizvoll, da die Substanz über verschiedene Vorzüge bezüglich eines potentiellen klinischen Einsatzes verfügt:

Die benötigten hohen Asorbatkonzentrationen im Plasma können bei intravenöser Gabe der Substanz problemlos erreicht werden (**siehe 1.2.2.**). Blut eignet sich hervorragend für den Transport der Substanz ins Extrazellulärmilieu, zumal dort eine Akkumulation von Wasserstoffperoxid aufgrund einer unmittelbaren Entgiftung durch verschiedene erythrozytäre Systeme nicht zu erwarten ist (**siehe 1.2.3.**).

Im klinischen Einsatz erwies sich eine intravenöse Behandlung mit hochdosiertem Ascorbat bisher nahezu frei von unerwünschten Nebenwirkungen (**siehe 1.2.6.**).

4.2. Der Warburg-Effekt und die Beeinflussung der Glykolyse

Viele Krebszellen zeichnen sich im Vergleich zu gesunden Zellen durch eine gesteigerte aerobe Glykolyserate aus (**siehe 1.3.3.**), was im Rahmen der PET mit [¹⁸F]-FDG zur radiologischen Darstellung von entartetem Gewebe genutzt wird (**siehe 1.4.**). Neben einer schnellen ATP-Gewinnung stellt eine Steigerung der Glykolyse vermutlich die für ein schnelles Wachstum benötigte gute Ver-

sorgung mit Substraten aus dem Pentosephosphatweg wie Ribulose-5-Phosphat zur DNA- und NADPH+H⁺ zur Fettsäuresynthese sicher.

Möglicherweise lässt sich die charakteristische Energiegewinnung von Krebszellen zur Therapie von Krebserkrankungen nutzen und durch eine Hemmung bzw. „Umlenkung“ der glykolytischen Energiegewinnung in Richtung oxidative Phosphorylierung gezielt Wachstum und Vitalität von Krebszellen vermindern.

Entsprechend werden Substanzen mit direkt Glykolyse-hemmenden Eigenschaften – zum Beispiel Inhibitoren verschiedener glykolytischer Enzyme – gesucht sowie Substanzen, die die oxidative Energiegewinnung zu Ungunsten der Glykolyse fördern.

Beispielweise könnten sich die Enzyme Laktatdehydrogenase-A und Pyruvatdehydrogenase, die für die weitere Verstoffwechslung des in der Glykolyse gebildeten Pyruvats verantwortlich sind, als Angriffspunkte für eine direkte, medikamentöse Glykolysehemmung eignen. Laktatdehydrogenase katalysiert unter anaeroben Bedingungen den Abbau von Pyruvat zu Laktat, während Pyruvatdehydrogenase unter aeroben Bedingungen Pyruvat durch Umwandlung zu Acetyl-CoA dem oxidativen Stoffwechsel zuführt (**siehe 1.3.2.**).

In dieser Arbeit wurde die Wirkung verschiedener Substanzen auf Kelly und SK-N-SH untersucht, von denen eine – direkte oder indirekte – Glykolysehemmung bekannt ist oder angenommen wird: niedrig dosiertes Ascorbat, 2-Deoxy-D-Glukose und Dichloressigsäure.

Ascorbat

Möglicherweise besitzt Ascorbat nicht nur in hoher Dosierung die bereits beschriebene zytotoxische Wirkung, sondern beeinflusst darüber hinaus in physiologischen Konzentrationen den Energiestoffwechsels von Tumorzellen (**siehe 1.4.2.**).

Ein Mechanismus ist vermutlich seine Funktion als Co-Faktor von Prollylhydroxylasen, die für den proteosomalen Abbau des Transkriptionsfaktors HIF-1 α verantwortlich sind (Knowles et al. 2003). HIF-1 führt in gesunden Zellen unter hypoxischen Bedingungen unter anderem zu einer gesteigerten Glykolyserate.

Von Krebszellen wird HIF-1 jedoch zum Teil auch unter normoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert und trägt vermutlich zu deren gesteigerter Glykolyserate bei.

Es konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit niedriger Ascorbatkonzentrationen (25 $\mu\text{mol/l}$) – wie sie auch physiologisch *in vivo* vorliegen – der HIF-1-Spiegel sowie die durch HIF-1 verstärkte glykolytische Aktivität in entarteten Zellen sinkt.

Die zur Kultivierung von Krebszellen verwendeten Zellkulturmedien enthalten allenfalls Spuren von Ascorbat (0,4 $\mu\text{mol/l}$ nach dreistündiger Lagerung bei 37 °C) (**siehe 3.2.2.1.**). Entsprechend ist ein möglicher Einfluss von Ascorbat auf den Energiestoffwechsel von Krebszellen bei der Arbeit mit Zellkulturen normalerweise ausgeblendet, da die meisten Zellkulturen in Ascorbat-freiem Zellkulturmedium geführt werden.

Vor diesem Hintergrund wurde in eigenen Versuchen der Energiestoffwechsel von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in Anwesenheit physiologischer Ascorbatkonzentrationen und unter Ascorbat-freien Bedingungen verglichen. Hierzu wurden Kulturen von Kelly und SK-N-SH alle 48 Stunden mit einem Ascorbatbolus versetzt (50 $\mu\text{mol/l}$) und bezüglich ihres Glukoseverbrauchs und ihrer Laktatproduktion mit unbehandelten Kontrollkulturen verglichen (**siehe 3.2.2.3.**).

Im Falle eines stärkeren Abbaus von HIF-1 und einer entsprechend sinkenden Glykolyserate sollten Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in den Kulturen unter Ascorbatbehandlung vergleichsweise langsamer erfolgen.

Bereits während der Versuchsdurchführung fiel eine deutlich schnellere Gelbfärbung des Zellkulturmediums der Ascorbat-freien Zellkulturen auf. Die Gelbfärbung ist ein Indikator für den Grad der Ansäuerung, die zum Beispiel durch eine starke Laktatproduktion hervorgerufen werden kann.

Bei Messung der Glukose- und Laktatwerte im Zellkulturmedium der korrespondierenden Kelly-Kulturen (N-myc-Amplifikation) wurden ein langsamerer Glukoseverbrauch und eine langsamere Laktatproduktion der mit Ascorbat behandelten Kulturen beobachtet (**Abb. 29.**). In den Kulturen von SK-N-SH-Zellen, die über keine N-myc-Amplifikation verfügen, entsprachen sich die

Glukose- und Laktatproduktion in Anwesenheit und in Abwesenheit von Ascorbat in etwa (**Abb. 29.**).

Die Ergebnisse aus den Kelly-Kulturen weisen auf eine antiglykolytische und damit möglicherweise Krebszell-hemmende Wirkung physiologischer Ascorbatkonzentrationen auf Neuroblastomzellen mit N-myc-Amplifikation hin. Diese Beobachtung könnte von klinischer Bedeutung sein, zumal Krebspatienten einen erniedrigten – jedoch zur Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen normalerweise noch ausreichenden – Serumascorbatspiegel aufweisen (**siehe 1.1.2.**).

Möglicherweise kann das Verhalten von *in vitro* kultivierten Krebszellen durch Versatz des Zellkulturmediums mit physiologischen Ascorbatkonzentrationen ein kleines Stück näher an die physiologische Verhaltensweise gebracht werden, da im Serum immer ca. 40 – 60 mmol/l Ascorbat enthalten sind. Es sollte jedoch bevorzugt das deutlich stabilere Ascorbat-Phosphat eingesetzt werden, aus dem kontinuierlich aktives Ascorbat abgespalten wird.

Gerade für Arbeiten bezüglich des Energiestoffwechsels von Krebszellen und zu HIF-1 könnte das Vorliegen physiologischer Ascorbatkonzentrationen von Bedeutung sein.

2-Deoxy-D-Glukose

2-Deoxy-D-Glukose wirkt – im Gegensatz zu Ascorbat und Wasserstoffperoxid – ausschließlich nach Aufnahme in die Zelle über intrazelluläre Mechanismen wachstumshemmend. Die wachstumshemmenden Eigenschaften der Substanz werden vermutlich vor allem durch eine Senkung der glykolytischen Energiegewinnung vermittelt.

So wirkt 2-Deoxy-D-Glukose kompetitiv hemmend auf die Hexokinase-Reaktion sowie nach Umsetzung zu 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat – über nicht kompetitive Mechanismen – hemmend auf die durch Hexokinase und Phosphohexoseisomerase vermittelten Reaktionen (Manuel y Keenoy et al. 1992) (**siehe 1.4.1.**).

2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat wird von der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, dem ersten Enzym des Pentosephosphatwegs, nicht als Substrat akzeptiert, wirkt sich aber auch nicht störend auf die Umsetzung von Glukose-6-Phosphat mittels Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus (**siehe 1.4.1.**).

In einigen Versuchen wurde der Glukosegehalt mittels enzymatischer Reaktionen bestimmt (**siehe 2.2.8.1.**). Die Bestimmung erfolgte mittels der durch die Enzyme Hexokinase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysierten Reaktionen und konnte auch in Anwesenheit von 2-Deoxy-D-Glukose korrekt durchgeführt werden (**Abb. 32.**).

Vermutlich setzte die Hexokinase parallel Glukose zu Glukose-6-Phosphat und 2-Deoxy-D-Glukose zu 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat um. Bei der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion hingegen wurde 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat wie von *Manuel y Keenoy et al.* beschrieben nicht als Substrat akzeptiert (Manuel y Keenoy et al. 1992).

Vermutlich fällt die kompetitive Hemmung der Hexokinase bei den eingesetzten Konzentrationen an Hexokinase, Glukose und 2-Deoxy-D-Glukose (je 1 mmol/ l) nicht ins Gewicht. Da das entstehende 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat in der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion nicht umgesetzt wird, ist das photometrisch zu messende NADPH+H⁺ der zu bestimmenden Menge an Glukose äquivalent.

Vor diesem Hintergrund kann die korrekte enzymatische Bestimmung von Glukose in Anwesenheit von 2-Deoxy-D-Glukose plausibel erklärt werden.

Eine Hemmung der Glykolyse durch 2-Deoxy-D-Glukose wirkt sich negativ auf Vitalität und Wachstum von Tumorzellen aus.

Bei Inkubation mit 2-Deoxy-D-Glukose (bis 2 mmol/ l) ging die Vitalität von Neuroblastomzellen der Linien Kelly und SK-N-SH kontinuierlich zurück (**Abb. 30.**). Bei Steigerung der Substanzdosis ließ sich ab 2 mmol/ l kein wesentlicher Wirkungszuwachs mehr erzielen (**siehe Anhang**).

Interessanterweise zeigten sich in Anwesenheit physiologischer Ascorbatkonzentrationen kultivierte Kelly-Zellen signifikant resistenter gegenüber einer

Behandlung mit 0,5 und 1 mmol/l 2-Deoxy-D-Glukose als in Ascorbat-freiem Medium gewachsene Kelly-Zellen (**Abb. 31.**). Die Sensibilität von SK-N-SH-Zellen aus Ascorbat-haltigen und Ascorbat-freien Kulturen gegenüber 2-Deoxy-D-Glukose unterschied sich dagegen nicht wesentlich (**Abb. 31.**).

Diese Beobachtung könnte ein weiterer Hinweis auf eine antiglykolytische Wirkung physiologischer Ascorbatkonzentrationen sein (**siehe oben**) sowie darauf, dass Neuroblastenzellen mit N-myc-Amplifikation (Kelly) ihre Energie bevorzugt über die glykolytische Energiegewinnung nutzen. Die geringere Sensibilität von Kelly-Zellen aus Ascorbat-haltigem Milieu könnte darauf hinweisen, dass die Zellen ihre Energie – möglicherweise aufgrund niedrigerer HIF-1-Spiegel – zu einem kleineren Teil über die Glykolyse gewinnen als Zellen aus ascorbatfreiem Milieu und entsprechend auf eine Inhibition der Glykolyse weniger sensibel reagieren.

Um die Glykolyse-hemmenden Eigenschaften von 2-Deoxy-D-Glukose zu zeigen, wurden Glukoseverbrauch und Laktatproduktion sowie Sauerstoffverbrauchsrate von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in Glukose- und 2-Deoxy-D-Glukose-haltigen Suspensionen und ausschließlich Glukose-haltigen Suspensionen verglichen. Unter der Annahme einer Glykolysehemmung durch 2-Deoxy-D-Glukose wurde in Anwesenheit der Substanz ein geringerer Glukoseverbrauch und eine geringere Laktatproduktion durch die Zellen erwartet. Ebenso wurden für die Zellsuspensionen mit 2-Deoxy-D-Glukose aufgrund einer Verschiebung des zellulären Energiestoffwechsels zur oxidativen Phosphorylierung höhere Sauerstoffverbrauchsrate angenommen.

Die erwarteten Unterschiede bezüglich Glukoseverbrauch und Laktatproduktion konnten unter den gewählten Inkubationsbedingungen nicht deutlich herausgearbeitet werden (**Abb. 33.1., Abb. 33.2., Abb. 34.**). Denkbar ist, dass eventuelle Unterschiede bezüglich Glukoseverbrauch und Laktatproduktion bei Erhöhung der verwendeten Zellzahl sowie des 2-Deoxy-D-Glukosegehalts deutlicher hervortreten.

Mit Ausnahme der Suspension von SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640 zeigten sich in Anwesenheit von 2-Deoxy-D-Glukose durchweg vergleichsweise niedri-

gere Sauerstoffverbrauchsrate. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass den Zellen in den Suspensionen von PBS⁺⁺ ausschließlich Glukose zur Energiegewinnung zur Verfügung steht und sie nicht auf die Verstoffwechslung von anderen energiereichen Substraten wie Fetten oder Proteinen über den Zitratzyklus zurückgreifen können. Entsprechend zeichnen sich die Zellen in Anwesenheit von 2-Deoxy-D-Glukose möglicherweise nicht durch eine stärkere oxidative Phosphorylierung und einen höheren Sauerstoffverbrauch aus.

Bei Inkubation von Kelly und SK-N-SH mit einer Kombination aus 2-Deoxy-D-Glukose und Wasserstoffperoxid wurde ein Großteil der zytotoxischen Wirkung durch 2-Deoxy-D-Glukose verursacht. Verdopplung der Wasserstoffperoxidkonzentration von 25 auf 50 $\mu\text{mol/l}$ zog nur einen unwesentlichen Wirkungszuwachs nach sich (**Abb. 35.**).

Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die verwendeten Wasserstoffperoxid-Konzentrationen von 25 und 50 $\mu\text{mol/l}$ (**Abb. 26.**) im Vergleich zu den eingesetzten 2-Deoxy-D-Glukose-Konzentrationen von 2, 4 und 6 mmol/l (**siehe Anhang**) lediglich leicht zytotoxisch wirkten.

Dichloressigsäure

Eine Förderung des oxidativen Stoffwechsels auf Kosten der glykolytischen Energiegewinnung kann durch den Einsatz der Substanz Dichloressigsäure erreicht werden.

Dichloressigsäure wurde bereits zur Behandlung von Lactataciden bei Kindern eingesetzt, jedoch traten wiederholt toxische Nebenwirkungen der Substanz gegenüber dem peripheren Nervensystem auf (Felitsyn et al. 2007). Für die Behandlung von Krebserkrankungen besitzt DCA bisher keine Zulassung.

Dichloressigsäure aktiviert über einen ebenfalls Enzym-vermittelten Mechanismus (Inaktivierung der PDH-Kinase) das Enzym Pyruvatdehydrogenase (PDH) und verschiebt dadurch den Energiestoffwechsel von Zellen von der Glykolyse in Richtung oxidative Phosphorylierung (**siehe 1.4.3.**). Die

Zytotoxizität der Substanz ist auf einen aufgrund der gesteigerten oxidativen Phosphorylierung vermehrten Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen.

Eine zytotoxische Wirkung der Substanz wurde *in vitro* für verschiedene Krebszellen bereits gezeigt (Bonnet et al. 2007) und könnte auch bezüglich der Behandlung des Neuroblastoms von Interesse sein.

Tatsächlich hemmte die Substanz in Konzentrationen im niedrigen millimolaren Bereich (bis 2000 $\mu\text{mol/l}$) die Vitalität von Kelly (**Abb. 38.**). In Kulturen von Kelly-Zellen sanken mit steigenden DCA-Konzentrationen (bis 2000 $\mu\text{mol/l}$) auch die Laktatproduktion und der Glukoseverbrauch (**Abb. 37.**). Dies deutet darauf hin, dass die wachstumshemmenden Eigenschaften der Substanz wie von *Bonnet et al. (2007)* beschrieben durch eine Hemmung der Glykolyse vermittelt werden.

Möglicherweise lässt sich durch eine Kombination von Dichloressigsäure mit anderen Glykolyse-hemmenden oder den oxidativen Stoffwechsel fördernden Substanzen die Wirksamkeit der Substanz weiter steigern.

Überlegenswert ist beispielsweise eine Kombination von Dichloressigsäure mit α -Liponsäure. α -Liponsäure ist ein Coenzym des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes und führt bei ausreichender Verfügbarkeit zu einer gesteigerten Enzymaktivität. Infolge des erhöhten Angebots an Acetyl-CoA steigt die Rate der oxidativen Phosphorylierung, was wiederum zu einem vermehrten Anfall an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt.

In vitro konnte bei humanen Colon-Ca-Zellen (HT-29) durch Behandlung mit α -Liponsäure die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gesteigert und über diesen Mechanismus die Apoptose ausgelöst werden (Wenzel et al. 2005).

Auch eine Kombination mit Thiamin, einem weiteren Coenzym des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, könnte sinnvoll sein.

Entsprechend erscheint es lohnenswert, die Untersuchungen zu Dichloressigsäure zu vertiefen und für andere Neuroblastomzelllinien durchzuführen sowie die Substanz mit Liponsäure und Thiamin zu kombinieren.

5. Zusammenfassung

Die Rolle von Ascorbat in der Krebstherapie wird seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Nachdem zuletzt etwas Ruhe um das Thema eingekehrt war, sorgen aktuell drei in PNAS in den Jahren 2005, 2007 und 2008 veröffentlichte Arbeiten für Aufsehen in der Fachwelt und in der nichtwissenschaftlichen Presse.

Forscher aus der Arbeitsgruppe von Mark Levine, einem renommierten Ascorbat-Spezialisten am *NIH* in *Bethesda*, USA, konnten *in vitro* eine Wasserstoffperoxid-vermittelte Zytotoxizität von hochdosiertem Ascorbat gegenüber humanen Lymphom- und Mamma-Karzinom-Zelllinien zeigen (Chen et al. 2005). In einer darauf folgenden Arbeit wurden nach intravenöser Gabe von hochdosiertem Ascorbat in der Extrazellulärflüssigkeit von Ratten *in vivo* Ascorbylradikal und Wasserstoffperoxid nachgewiesen (Chen et al. 2007). In der neuesten Publikation erwies sich hochdosiertes Ascorbat im Mausmodell als wirksam gegenüber Ovarialkarzinom-, Pankreaskarzinom- und Glioblastomxenografts (Chen et al. 2008).

Diese Zytotoxizität ist jedoch nur ein möglicher Aspekt der vielfältigen, stark konzentrationsabhängigen Wirkung von Ascorbat auf (Krebs-) zellen. Es ist davon auszugehen, dass Ascorbat zeitgleich in unterschiedlicher Funktion und an unterschiedlichen Stellen in den Stoffwechsel von Zellen eingreift und beispielsweise an der Steuerung des zellulären Energiestoffwechsels beteiligt ist.

So erfolgt in Anwesenheit niedriger (physiologischer) Ascorbatkonzentrationen in malignen Zellen *in vitro* ein gesteigerter Abbau des Transkriptionsfaktors HIF-1 α (Knowles et al. 2003). Dies führt zu einer Umlenkung der glykolytischen Energiegewinnung in Richtung oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), was einen vermehrten Anfall von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) nach sich zieht. Krebszellen zeichnen sich häufig durch eine gesteigerte aerobe Glykolyserate aus und werden darüber hinaus üblicherweise in AA-freiem Milieu kultiviert. Entsprechend ist dieser Befund gerade für Untersuchungen an Krebszellen von Bedeutung

In der eigenen Arbeit wurde überprüft, ob sich Mark Levines These einer zytotoxischen Wirkung von hochdosiertem Ascorbat bei Behandlung der Neuroblastomzelllinien Kelly (N-myc-Amplifikation) und SK-N-SH (keine N-myc-Amplifikation) mit Ascorbat und Wasserstoffperoxid bestätigen lässt (1).

Weiterhin wurde analysiert, wie sich eine Inkubation mit niedrig dosiertem AA oder 2-Deoxy-D-Glukose (dG) auf Vitalität und Wachstum der Zellen auswirkt (2). [^{18}F]-FDG wird bereits klinisch als radioaktiver Tracer zur Darstellung von entartetem Gewebe mittels Positronen-Emissions-Tomographie eingesetzt.

Zuletzt wurde untersucht, wie sich eine Umlenkung des zellulären Energiestoffwechsels von der Glykolyse Richtung oxidative Phosphorylierung auf Wachstum und Glykolyserate von Kelly-Zellen auswirkt (3). Hierzu wurden die Zellen mit Dichloressigsäure inkubiert. Dichloressigsäure wurde bereits in der Klinik zur Behandlung von Lactacidosen bei Kindern eingesetzt und fördert den oxidativen Stoffwechsel durch Aktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes.

Ad 1.: Übereinstimmend mit Mark Levines' Publikationen wirkten steigende Konzentrationen Ascorbat (bis 10 mmol/l) oder Wasserstoffperoxid (bis 200 $\mu\text{mol/l}$) zunehmend zytotoxisch auf Kelly- und SK-N-SH-Zellen. Die Wasserstoffperoxid-Wirkung trat größtenteils innerhalb der ersten Stunde nach Substanzzugabe ein. Dehydroascorbat (bis 10 mmol/l) besaß einer der AA-Wirkung vergleichbare Zytotoxizität.

Sowohl Kelly- als auch SK-N-SH-Zellen konnten kontinuierlich gebildetes (Glukose/Glukose-Oxidase) sowie als Bolus zugegebenes Wasserstoffperoxid mit steigender Zellzahl und Inkubationszeit besser entgiften. Kelly-Zellen arbeiteten vergleichsweise etwas schneller und effektiver.

Ad 2.: Bei Kelly-Zellen wurde ein reduziertes Wachstum in AA-haltigem Medium (50 $\mu\text{mol/l}$) beobachtet, was auf eine verminderte Glykolyserate zurückzuführen sein könnte: Diese Zellen zeigten im Vergleich zu Zellen aus AA-freier Kultur eine etwas geringere Glukoseutilisation und Laktatproduktion. Für SK-N-SH-Zellen konnte dies nicht gezeigt werden.

dG wirkte mit steigender Konzentration (bis 2 mmol/ l) zunehmend zytotoxisch auf beide Zelllinien. Bei Kelly-Zellen fiel eine höhere Resistenz von Zellen in AA-haltigem Milieu (50 μ mol/l) gegenüber dG auf, was ebenfalls auf eine in Anwesenheit physiologischer Ascorbatspiegel verminderte Glykolyserate zurückzuführen sein könnte.

Die glykolysehemmende Wirkung von dG konnte anhand des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion durch die Zellen jedoch nicht demonstriert werden.

Ad 3.: Eine Umlenkung der Glykolyse in Richtung oxidative Phosphorylierung mittels Dichloressigsäure bewirkte eine ca. 80%ige Wachstumshemmung bei Kelly-Zellen. Mit zunehmender Substanzkonzentration (bis 2 mmol/ l) konnte parallel zur Wachstumshemmung ein sinkender Glukoseverbrauch und eine sinkende Laktatproduktion durch die Zellen gezeigt werden. Dies steht in Einklang mit dem bekannten Wirkmechanismus der Substanz, einer Aktivierung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes.

In der vorliegenden Arbeit wurden Hinweise gefunden, dass gerade Neuroblastomzellen mit N-myc Amplifikation zur Energiegewinnung bevorzugt die aerobe Glykolyse nutzen. Eine Umlenkung des Stoffwechsels von der Glykolyse in Richtung OXPHOS zieht eine vermehrte Bildung zytotoxischer ROS nach sich und könnte einen Ansatzpunkt für neuartige Therapiestrategien darstellen. Als Glykolyse-hemmende bzw. den oxidativen Stoffwechsel fördernde Substanzen sind unter anderen DCA bzw. dG – eventuell in Kombination mit α -Liponsäure oder Thiamin – von Interesse.

Als vielversprechender Ansatzpunkt erscheint auch der potentielle Einsatz von hochdosiertem, pro-oxidativ wirksamen AA. In den vorliegenden Untersuchungen zeigten sich Neuroblastomzellen unabhängig von der N-myc-Amplifikation sensibel gegenüber einer Behandlung mit hochdosiertem AA. Nach der erfolgreichen Behandlung von Tumorexografts im Mausmodell sind klinische Studien zum Einsatz von hochdosiertem AA am NIH bereits in Vorbereitung.

6. Abkürzungen

AA	Ascorbinsäure
AAO	Ascorbat-Oxidase
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>ATTC</i>	<i>American Type Culture Collection</i>
C	Celsius
c	Konzentration
Ca ²⁺	Calcium
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DCA	Dichloressigsäure
dG	2-Deoxy-D-Glukose
DHA	Dehydroascorbinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E ₁ / E ₂	Extinktion 1/ Extinktion 2
<i>ELISA</i>	<i>Enzym Linked Immunostaining Assay</i>
<i>f.c.</i>	Endkonzentration (<i>final concentration</i>)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduziert)

FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FeSO ₄	Eisen-II-Sulfat
FH	Fumarat-Hydratase
g	Gramm
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G6P-DH	Glukose-6-Phosphat- Dehydrogenase
GO	Glukose-Oxidase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
<i>HIF</i>	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
Hk	Hexokinase
IGF 1	Insulin-like Growth Factor 1
KSCN	Kaliumthiocyanat
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
Mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	Mol
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5- diphenyltetrazoliumbromid

μg	Microgramm
μl	Microliter
μmol	Micromol
n	Fallzahl
Na^+	Natrium
NAD^+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
$\text{NADH}+\text{H}^+$	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat
$\text{NADPH}+\text{H}^+$	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat (reduziert)
NaOH	Natronlauge
<i>NIH</i>	<i>National Institute of Health</i>
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
O_2	Sauerstoff
O_2^-	Superoxid
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
<i>PBS⁻</i>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<i>PBS⁺⁺</i>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> mit Calciumchlorid und Magnesiumchlorid
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PDH-Kinase	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase
PET	Positronenemissionstomo- graphie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

PHD	Prolylhydroxylasen
pK _s	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K _s
PMS	5-Methylphenaziniummethosulfat
PNAS	<i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i>
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Sekunde
SCO2	Cytochrom-C-Oxidase 2
SD	Standardabweichung
SDH	Succinat-Dehydrogenase
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UTC	<i>Universal Coordinated Time</i>
VHL	Von Hippel Lindau-Protein
[¹²³ I]mIBG	¹²³ Jod-Metajodobenzylguanidin
[¹⁸ F]-FDG	¹⁸ F-Fluor-2-Deoxy-D-Glukose

7. Abbildungen

	Seite
Abb. 1.: Ascorbat (C ₆ H ₈ O ₆) Artikel <i>Ascorbinsäure</i> . In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 30. Mai 2008, 09:47 UTC. http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Ascorbins%C3%A4ure&oldid=46671312 (Abgerufen: 3. Juni 2008, 10:21 UTC).....	2
Abb. 2.: Oxidation vom Endiol zum Diketon Artikel <i>Ascorbinsäure</i> . In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 30. Mai 2008, 09:47 UTC. http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Ascorbins%C3%A4ure&oldid=46671312 (Abgerufen: 3. Juni 2008, 10:21 UTC).....	2
Abb. 3.: Reaktion von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure unter Freisetzung von zwei Wasserstoffradikalen Artikel <i>Ascorbinsäure</i> . In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 30. Mai 2008, 09:47 UTC. http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Ascorbins%C3%A4ure&oldid=46671312 (Abgerufen: 3. Juni 2008, 10:21 UTC).....	3
Abb. 4.: Umsetzung von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure unter formaler Freisetzung eines Hydridanions Artikel <i>Ascorbinsäure</i> . In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 30. Mai 2008, 09:47 UTC. http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Ascorbins%C3%A4ure&oldid=46671312 (Abgerufen: 3. Juni 2008, 10:21 UTC).....	3
Abb. 5.: Linus Pauling um 1954 Artikel <i>Linus Carl Pauling</i> . In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 19. Mai 2008, 07:55 UTC. http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Linus_Carl_Pauling&oldid=46221819 (Abgerufen: 3. Juni 2008, 10:23 UTC).....	10
Abb. 6.: Vorstellung zur Bildung von H ₂ O ₂ aus Ascorbat nach intravenöser Applikation Bruchelt, G., Kuci, Z. (2007) Vitamin C als Prodrug von H ₂ O ₂ : Möglichkeiten zur intravenösen Hochdosistherapie bei Krebserkrankungen? Deutsche Zeitschrift für Onkologie, <u>39</u> , 52 – 57.....	14

Abb. 7.:	Otto Heinrich Warburg um 1931 http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1931/warburg-bio.html (Abgerufen: 21. März 2008, 16.37 UTC).....	17
Abb. 8.:	Glykolyse http://www.humboldt.edu/~rap1/C431.F01/PathwayDiagrams/GlycolPath.gif (Abgerufen: 30. Mai 2008, 14:40 UTC).....	18
Abb. 9.:	Zitratzyklus (Krebs cycle) http://www.biomatrixone.com/images/page_graphics/min_krebs.jpg (Abgerufen: 3. Juni 2008, 12:54 UTC)	19
Abb. 10	Molekulare Grundlagen des Warburg-Effekts Kim, J. W., Dang, C. V. (2006) Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect Cancer Res, <u>66</u> , 8927 – 8930.....	21
Abb. 11.:	Der Pentosephosphatweg: Bereitstellung von NADPH+H ⁺ für die Fettsäuresynthese und die Regeneration von Glutathion sowie Produktion von Pentosephosphaten für die Nukleotidsynthese http://biochemie.web.med.uni-uenchen.de/biotutor_2004/pentoseweg.htm (Abgerufen: 29. Mai 2008, 17:15 UTC)	27
Abb. 12.:	Das Glutathion-System und dessen Regeneration mittels NADPH+H ⁺ aus dem Pentosephosphatweg http://bcn.boulder.co.us/health/rmeha/glut11.gif (Abgerufen: 29. Mai 2008, 17:23 UTC)	28
Abb. 13.:	Glukose und 2-Deoxy-D-Glukose.....	30
Abb. 14.:	Glykolysehemmung durch 2-Deoxy-D-Glukose.....	31
Abb. 15.:	Dichloressigsäure Artikel <i>Dichloressigsäure</i> . In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 11. Februar 2008, 21:56 UTC. http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Dichloressigs%C3%A4ure&oldid=42397272 (Abgerufen: 3. Juni 2008, 10:28 UTC).....	34
Abb. 16.:	Wirkmechanismus von Dichloressigsäure.....	35
Abb. 17.:	MTT-Färbung von Kelly- und SK-N-SH-Zellen	64
Abb. 18.:	Einfluss von Ascorbat auf die Vitalität von Kelly- und SK-N-SH-Zellen.....	66

Abb. 19.:	Zellzahlen in den Kontrollwells von Kelly(-)-Zellen und Kelly(+)-Zellen bzw. SK-N-SH(-)-Zellen und SK-N-SH(+)-Zellen im Vergleich	68
Abb. 20.1.:	Einfluss von Ascorbat auf die Vitalität von Kelly(-)-Zellen und Kelly(+)-Zellen. Vergleich verschiedener Zellzahlen	70
Abb. 20.2.:	Einfluss von Ascorbat auf die Vitalität von SK-N-SH(-)-Zellen und SK-N-SH(+)-Zellen. Vergleich verschiedener Zellzahlen	71
Abb. 21.:	Einfluss von Ascorbat oder Dehydroascorbat auf die Vitalität von Kelly	72
Abb. 22.:	Eichkurve für die photometrische Bestimmung von Wasserstoffperoxid nach Thurman in PBS ⁺⁺ mit 10 mmol/ l f.c. Glukose sowie in RPMI 1640	74
Abb. 23.:	Produktion von Wasserstoffperoxid durch Glukose-Oxidase in PBS ⁺⁺ mit 10 mmol/ l f.c. Glukose und RPMI 1640 mit ca. 11 mmol/ l Glukose f.c	76
Abb. 24.:	Entgiftung von Wasserstoffperoxid durch Kelly- und SK-N-SH-Zellen nach Zugabe eines Bolus	79
Abb. 25.:	Entgiftung von Wasserstoffperoxid durch Kelly- und SK-N-SH-Zellen bei allmählicher Anflutung	81
Abb. 26.:	Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Vitalität von Kelly und SK-N-SH	83
Abb. 27.:	Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Vitalität von Kelly und SK-N-SH. Vergleich verschiedener Zellzahlen	86
Abb. 28.:	Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Vitalität von Kelly und SK-N-SH bei einstündiger und 24-stündiger Behandlung	88
Abb. 29.1.:	Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in der Lösungsmittel- und Ascorbatdauerkultur von Kelly	93
Abb. 29.2.:	Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in der Lösungsmittel- und Ascorbatdauerkultur von SK-N-SH	94
Abb. 30.:	Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose auf die Vitalität von Kelly und SK-N-SH	95

Abb. 31.:	Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose auf die Vitalität von Kelly und SK-N-SH. Vergleich von Kelly (-) und Kelly (+) sowie SK-N-SH (-) und SK-N-SH(+)	97
Abb. 32.:	Photometrische Bestimmung von Glukose in Anwesenheit von 2-Deoxy-D-Glukose	99
Abb. 33.1.:	Energiestoffwechsel von Kelly-Zellen in Anwesenheit von 1 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l 2-Deoxy-D-Glukose bzw. 1 mmol/ l Glukose und 5 mmol/ l 2-Deoxy-D-Glukose	102
Abb. 33.2.:	Energiestoffwechsel von SK-N-SH-Zellen in Anwesenheit von 1 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l 2-Deoxy-D-Glukose bzw. 1 mmol/ l Glukose und 5 mmol/ l 2-Deoxy-D-Glukose	106
Abb. 34.:	Energiestoffwechsel von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in RMPi 1640 mit 1 mmol/ l 2-Deoxy-D-Glukose f.c	110
Abb. 35.:	Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose und Wasserstoffperoxid im micromolaren Konzentrationsbereich auf die Vitalität von Kelly und SK-N-SH	113
Abb. 36.:	Einfluss von 2-Deoxy-D-Glukose und Wasserstoffperoxid im millimolaren Konzentrationsbereich auf die Vitalität von Kelly	114
Abb. 37.:	Glukoseverbrauch und Laktatproduktion durch Kelly-Zellen bei Inkubation mit Dichloressigsäure	116
Abb. 38.:	Einfluss von Dichloressigsäure auf die Vitalität von Kelly	117
Abb. 39.:	Zytotoxische Wirkungen von Ascorbat und Dehydroascorbat	123

8. Tabellen

	Seite
Tab. 1.: Behandlung von Neuroblastomzelldauerkulturen mit Ascorbat	42
Tab. 2.: Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Konzentration	52
Tab. 3.: Suspensionen von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in PBS ⁺⁺ (3.1.) und RPMI 1640 (3.2.) zur Bestimmung des Einflusses von 2- Deoxy-D-Glukose auf den zellulären Energiestoffwechsel	54
Tab. 4.: Pipettierschema für die photometrische Bestimmung von Glukose	56
Tab. 5.: Pipettierschema für die photometrische Bestimmung von Laktat	59
Tab. 6.: Pipettierschema für die photometrische Bestimmung von Ascorbat	61
Tab. 7.: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion sowie Sauerstoffver- brauchsraten bei Inkubation von Kelly-Zellen in PBS ⁺⁺ mit Glukose	101
Tab. 8.: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion sowie Sauerstoffver- brauchsraten bei Inkubation von SK-N-SH-Zellen in PBS ⁺⁺ mit Glukose	105
Tab. 9.: Glukoseverbrauch und Laktatproduktion sowie Sauerstoffver- brauchsraten bei Inkubation von Kelly- und SK-N-SH-Zellen in RPMI 1640.....	109

9. Literatur

Andringa, K. K., Coleman, M. C., Aykin-Burns, N., Hitchler, M. J., Walsh, S. A., Domann, F. E., Spitz, D. R. (2006)

Inhibition of glutamate cysteine ligase activity sensitizes human breast cancer cells to the toxicity of 2-deoxy-D-glucose
Cancer Res, 66, 1605 – 1610

Baader, S. L., Bruchelt, G., Trautner, M. C., Boschert, H., Niethammer, D. (1994)

Uptake and cytotoxicity of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in neuroblastoma (SK-N-SH) and neuroectodermal (SK-N-LO) cells
Anticancer Res, 14, 221 – 228

Ballweg, D. H. (2007)

Aufnahme von [123I]mIBG und [3H]Noradrenalin in Neuroblastomzellen: Einfluss der Vorbehandlung der Zellen mit Zytostatika
Med. Diss., Tübingen

Barinaga, M. (1991)

Vitamin C gets a little respect
Science, 254, 374 – 376

Biedler, J. L., Helson, L., Spengler, B. A. (1973)

Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture
Cancer Res, 33, 2643 – 2652

Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C. T., Lopaschuk, G. D., Puttagunta, L., Bonnet, S., Harry, G., Hashimoto, K., Porter, C. J., Andrade, M. A., Thebaud, B., Michelakis, E. D. (2007)

A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth
Cancer Cell, 11, 37 – 51

Bruchelt, G., Kuci, Z. (2007)

Vitamin C als Prodrug von H₂O₂: Möglichkeiten zur intravenösen Hochdosistherapie bei Krebserkrankungen?
Deutsche Zeitschrift für Onkologie, 39, 52 – 57

Bui, T., Thompson, C. B. (2006)

Cancer's sweet tooth
Cancer Cell, 9, 419 – 420

- Cameron, E., Pauling, L. (1976)
Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer
Proc Natl Acad Sci U S A, 73, 3685 – 3689
- Cameron, E., Pauling, L. (1978)
Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer
Pro Natl Acad Sci U S A, 75, 4538 – 4542
- Cameron, E. (1982)
Vitamin C and cancer: an overview
Int J Vitam Nutr Res suppl, 23, 115 – 127
- Cameron, E. (1991)
Protocol for the use of vitamin C in the treatment of cancer
Med Hypotheses, 36, 190 – 194
- Cameron, E., Campbell, A. (1991)
Innovation vs. quality control: an 'unpublishable' clinical trial of supplemental ascorbate in incurable cancer
Med Hypotheses, 36, 185 – 189
- Chen, Q., Espey, M. G., Krishna, M. C., Mitchell, J. B., Corpe, C. P., Buettner, G. R., Shacter, E., Levine, M. (2005)
Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues
Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 13604 – 13609
- Chen, Q., Espey, M. G., Sun, A. Y., Lee, J. H., Krishna, M. C., Shacter, E., Choyke, P. L., Pooput, C., Kirk, K. L., Buettner, G. R., Levine, M. (2007)
Ascorbate in pharmacological concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo
Proc Natl Acad Sci U S A, 104, 8749 – 8754
- Chen, Q., Espey, M. G., Sun, A. Y., Pooput, C., Kirk, K. L., Krishna, M. C., Khosh, B. D., Drisko, J., Levine, M. (2008)
Pharmacologic doses of ascorbate act as prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice
Proc Natl Acad Sci U S A, 105, 11105 – 11109
- Cheung, N.-K. V., Cohn, S. L. (2005)
Neuroblastoma
1. Auflage, Springer Verlag, Berlin

Creagan, E. T., Moertel, C. G., O'Fallon, J. R., Schutt, A. J., O'Connell, M. J., Rubin, J., Frytak, S. (1979)
Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial
N Engl J Med, 301, 687 – 690

Daruwala, R., Song, J., Koh, W. S., Rumsey, S. C., Levine, M. (1999)
Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2
FEBS Lett, 460, 480 – 484

Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H., Cinalli, R. M., Alavi, A., Rudin, C. M., Thompson, C. B. (2004)
Akt stimulates aerobic glykolyosis in cancer cells
Cancer Res, 64, 3892 – 3899

Fantin, V. R., St-Pierre, J., Leder, P. (2006)
Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance
Cancer Cell, 9, 425 – 434

Felitsyn, N., Stacpoole, P. W., Notterpek, L. (2007)
Dichloroacetate causes reversible demyelination in vitro: potential mechanism for its neuropathic effect
J Neurochem, 100, 429 – 436

Garber, K. (2004)
Energy boost: the Warburg effect returns in a new theory of cancer
J Natl Cancer Inst, 96, 1805 – 1806

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2007)
Free radicals in biology and medicine
4. Auflage, Oxford Univ. Press, Oxford

Henson, D. E., Block, G., Levine, M. (1991)
Ascorbic Acid: biologic functions and relation to cancer
J Natl Cancer Inst, 83, 547 – 550

Kim, J. W., Dang, C. V. (2006)
Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect
Cancer Res, 66, 8927 – 8930

Kim, J. W., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., Dang, C. V. (2006)
HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch requires for cellular adaptation to hypoxia
Cell Metab, 3, 177 – 185

- Knowles, H. J., Raval, R. R., Harris, A. L., Ratcliffe, P. J. (2003)
Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells
Cancer Res, 63, 1764 – 1768
- Kurtoglu, M., Gao, N., Shang, J., Maher, J. C., Lehrman, M. A., Wangpaichitr, M., Savaraj, N., Lane, A. N., Lampidis, T. J. (2007)
Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycolysation
Mol Cancer Ther, 6, 3049 – 3058
- Liu, H., Hu, Y. P., Savaraj, N., Priebe, W., Lampidis, T. J. (2001)
Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors
Biochemistry, 40, 5542 – 5547
- Liu, H., Savaraj, N., Priebe, W., Lampidis, T. J. (2002)
Hypoxia increases tumor cell sensitivity to glycolytic inhibitors: a strategy for solid tumor therapy (Model C)
Biochem Pharmacol, 64, 1745 – 1751
- Maher, J. C., Wangpaichitr, M., Savaraj, N., Kurtoglu, M., Lampidis, T. J. (2007)
Hypoxia-inducible factor-1 confers resistance to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose
Mol Cancer Ther, 6, 732 – 741
- Manuel y Keenoy, B., Zähler, D., Malaisse, W. J. (1992)
Dissociated effects of 2-deoxy-D-glucose on D-(2-3H)glucose and D-(5-3H)glucose conversion into 3HOH in rat erythrocytes
Biochem J, 288, 433 – 438
- Matoba, S., Kang, J. G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P. J., Bunz, F., Hwang, P. M. (2006)
p53 regulates mitochondrial respiration
Science, 312, 1650 – 1653
- Moertel, C. G., Fleming, T. R., Creagan, E. T., Rubin, J., O'Connell, M. J., Ames, M. M. (1985)
High dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison
N Engl J Med, 312, 137 – 141
- Mosmann, T. (1983)
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays
J Immunol Methods, 65, 55 – 63

- Nath, K. A., Ngo, E. O., Hebbel, R. P., Croatt, A. J., Zhou, B., Nutter, L. M. (1995)
Alpha-Ketoacids scavenge H₂O₂ in vitro and in vivo and reduce menadione-induced DNA injury and cytotoxicity
Am J Physiol, 268, C 227 – 236
- Rumsey, S. C., Kwon, O., Xu, G. W., Burant, C. F., Simpson, I., Levine, M. (1997)
Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid
J Biol Chem, 272, 18982 – 18989
- Rumsey, S. C., Daruwala, R., Al-Hasani, H., Zarnowski, M. J., Simpson, I. A., Levine, M. (2000)
Dehydroascorbic acid transport by GLUT 4 in Xenopus oocytes and isolated rat adipocytes
J Biol Chem, 275, 28246 – 28253
- Schwab, M., Alitalo, K., Klemmner, K. H., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., Trent, J. (1983)
Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor
Nature, 305, 245 – 248
- Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R., Dang, C. V. (1997)
c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth
Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 6658 – 6663
- Shim, H., Chun, Y. S., Lewis, B. C., Dang, C. V. (1998)
A unique glucose-dependent apoptotic pathway induced by c-Myc
Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 1511 – 1516
- Shrivastava, V., Mishra, A. K., Dwarakanath, B. S., Ravindranath, T. (2006)
Enhancement of radionuclide induced cytotoxicity by 2-deoxy-D-glucose in human tumor cell lines
J Cancer Res Ther, 2, 57 – 64
- Thurman, R. G., Ley, H. G. Scholz, R. (1972)
Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen peroxide formation and the role of catalase
Eur J Biochem, 25, 420 – 430
- Treuner, J., Niethammer, D., Dannecker, G., Hagmann, R., Neef, V., Hofschneider, P. H. (1980)
Successful treatment of nasopharyngeal carcinoma with interferon
Lancet, 1, 817 – 818

Warburg, O., Posener, K., Negelein, E. (1924)
Über den Stoffwechsel von Tumoren
Biochem Z, 152, 319 – 344

Warburg, O. (1956)
On the origin of cancer cells
Science, 123, 309 – 314

Wenzel, U., Nickel, A., Daniel, A. (2005)
alpha-Lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing
mitochondrial respiration with a concomitant O₂^{-*}-generation.
Apoptosis, 10, 359 – 368

Wittes, R. E. (1985)
Vitamin C and cancer
N Engl J Med, 312, 178 – 179

Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B. Z., Rubinstein, M., Cohen, B. (1998)
Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor
HIF-1alpha/ ARNT
Embo J, 17, 5058 – 5094

Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D.,
Buechler, P., Isaacs, W. B., Semenza, G. L., Simons, J. W. (1999)
Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers
and their metastases
Cancer Res, 59, 5830 – 5835

Zhou, J. Brühne, B. (2004)
Hypoxie auch unter Normoxie?
BIOforum, 10, 28 – 30

Webpages

<http://www.atcc.com> (Abgerufen: 12. Juni 2007, 14:45 UTC)

<http://www.biochrom.de> (Abgerufen: 03. Februar 2008, 11:52 UTC)

<http://www.dsmz.de> (Abgerufen: 12. Juni 2007, 15:02 UTC)

Artikel *Linus Carl Pauling*. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 19. Mai 2008, 07:55 UTC.

http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Linus_Carl_Pauling&oldid=46221819
(Abgerufen: 3. Juni 2008, 10:04 UTC)

Artikel *Otto Heinrich Warburg*. In: Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Bearbeitungsstand: 27. Mai 2008, 07:25 UTC.

http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Otto_Heinrich_Warburg&oldid=46546261
(Abgerufen: 3. Juni 2008, 10:05 UTC)

10. Anhang

zu Abb. 20.1.

A Kelly(-)-Zellen

Bestimmung	Konzentration Ascorbat in mmol/l	Kontrolle (0 mmol/l)	0,156	0,313
1	Extinktion	0,157	0,119	0,131
	Prozent von Kontrolle	100	75,8	83,4
	Std.Abw.	0,006	0,012	0,004
	Std.Abw. in %	3,8	7,6	2,5
	CV%	4,106	9,728	2,972
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625
		0,004	0,123	0,025
2	Extinktion	0,312	0,223	0,219
	Prozent von Kontrolle	100	71,5	70,2
	Std.Abw.	0,009	0,004	0,006
	Std.Abw. in %	2,9	1,3	2
	CV%	2,728	1,676	2,87
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625
		1,124E-10	0,4	0,498
3	Extinktion	0,673	0,553	0,529
	Prozent von Kontrolle	100	82,2	78,6
	Std.Abw.	0,017	0,023	0,014
	Std.Abw. in %	2,5	3,4	2,1
	CV%	2,506	4,146	2,73
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625
		2,671E-05	0,106	5,610E-05
4	Extinktion	0,774	0,57	0,626
	Prozent von Kontrolle	100	73,6	80,9
	Std.Abw.	0,038	0,017	0,007
	Std.Abw. in %	4,9	2,2	0,9
	CV%	4,864	3,018	1,13
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625
		7,352E-08	7,796E-04	8,826E-04
5	Extinktion	0,767	0,68	0,64
	Prozent von Kontrolle	100	88,7	83,4
	Std.Abw.	0,022	0,015	0,025
	Std.Abw. in %	2,9	2	3,3
	CV%	2,819	2,211	3,381
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625
		8,832E-06	0,035	0,025

Bestimmung	Konzentration Ascorbat in mmol/ l	0,625	1,25	2,5	5
1	Extinktion	0,118	0,113	0,013	0,004
	Prozent von Kontrolle	75,2	72	8,3	2,5
	Std.Abw.	0,009	0,005	0,005	0,001
	Std.Abw. in %	5,7	3,2	3,2	0,6
	CV%	7,361	4,598	42,583	22,361
	p-Value	0,625/ 1,25	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		0,259	4,810E-09	0,048	
2	Extinktion	0,215	0,193	0,153	0,012
	Prozent von Kontrolle	68,9	61,9	49	3,8
	Std.Abw.	0,005	0,006	0,002	0,004
	Std.Abw. in %	1,6	2	0,6	1,3
	CV%	2,479	3,265	1,601	32,489
	p-Value	0,625/ 1,25	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		0,046	2,559E-06	1,888E-12	
3	Extinktion	0,474	0,45	53,9	0,16
	Prozent von Kontrolle	70,4	66,8	54	23,8
	Std.Abw.	0,014	0,019	0,024	0,016
	Std.Abw. in %	2,1	2,8	3,6	2,4
	CV%	2,987	4,134	6,513	9,889
	p-Value	0,625/ 1,25	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		0,034	4,591E-05	4,233E-08	
4	Extinktion	0,554	0,533	0,423	0,34
	Prozent von Kontrolle	71,6	68,7	54,7	43,9
	Std.Abw.	0,027	0,008	0,009	0,025
	Std.Abw. in %	3,5	1	1,2	3,2
	CV%	4,933	1,486	2,219	7,382
	p-Value	0,625/ 1,25	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		0,117	5,846E-06	1,777E-04	
5	Extinktion	0,706	0,679	0,625	0,548
	Prozent von Kontrolle	92	88,5	81,5	70,8
	Std.Abw.	0,05	0,018	0,04	0,032
	Std.Abw. in %	6,5	2,3	5,2	4,2
	CV%	7,042	2,578	6,472	5,849
	p-Value	0,625/ 1,25	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		0,267	0,039	0,011	

p-Values	2,5/ 2,5	5/ 5
0,157/ 0,312	6,213E-07	0,003
0,312/ 0,767	1,194E-05	2,439E-06
0,157/ 0,767	3,120E-06	2,846E-06

B Kelly (+)-Zellen

Bestimmung	Konzentration Ascorbat in mmol/ l	Kontrolle (0 mmol/ l)	0,156	0,313	0,625
1	Extinktion	0,125	0,139	0,132	0,12
	Prozent von Kontrolle	100	111,2	105,6	96
	Std.Abw.	0,007	0,006	0,004	0,004
	Std.Abw. in %	5,6	4,8	3,2	3,2
	CV%	5,26	4,543	3,243	3,613
p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25	
		0,003	0,086	0,002	1,353E-06
2	Extinktion	0,222	0,207	0,22	0,206
	Prozent von Kontrolle	100	93,2	99,1	92,8
	Std.Abw.	0,008	0,003	0,003	0,007
	Std.Abw. in %	3,6	1,4	1,4	3,2
	CV%	3,554	1,386	1,23	3,244
p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25	
		7,32E-05	0,0005	0,02	0,006
3	Extinktion	0,227	0,259	0,261	0,246
	Prozent von Kontrolle	100	114,1	115	108,4
	Std.Abw.	0,012	0,012	0,018	0,006
	Std.Abw. in %	5,3	5,3	6,9	2,6
	CV%	5,329	4,569	6,843	2,453
p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25	
		0,0003	0,796	0,095	0,052
4	Extinktion	0,559	0,544	0,57	0,478
	Prozent von Kontrolle	100	97,3	102	85,5
	Std.Abw.	0,035	0,02	0,019	0,006
	Std.Abw. in %	6,3	3,6	3,4	1,1
	CV%	6,254	3,646	3,377	1,268
p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25	
		0,34	0,065	0,0002	0,033
5	Extinktion	0,652	0,615	0,654	0,629
	Prozent von Kontrolle	100	94,3	100,3	96,5
	Std.Abw.	0,022	0,03	0,019	0,012
	Std.Abw. in %	3,4	4,6	2,9	1,8
	CV%	3,422	4,811	2,943	1,913
p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25	
		0,05	0,04	0,03	3,68E-05

Bestimmung	Konzentration Ascorbat in mmol/ l			
		1,25	2,5	5
1	Extinktion	0,078	0,007	0,008
	Prozent von Kontrolle	62,4	5,6	6,4
	Std.Abw.	0,005	0,001	0,001
	Std.Abw. in %	4	0,8	0,8
	CV%	16,35	16,35	10,08
	p-Value	1,25/ 2,5 4,900E-06	2,5/ 5 0,027	
2	Extinktion	0,184	0,093	0,047
	Prozent von Kontrolle	82,9	41,9	21,2
	Std.Abw.	0,001	0,01	0,004
	Std.Abw. in %	0,5	4,5	1,8
	CV%	0,769	10,719	7,818
	p-Value	1,25/ 2,5 1,96E-06	2,5/ 5 2,53E-05	
3	Extinktion	0,234	0,18	0,054
	Prozent von Kontrolle	103,1	79,3	23,8
	Std.Abw.	0,011	0,004	0,013
	Std.Abw. in %	4,8	1,8	5,7
	CV%	4,709	2,1	23,305
	p-Value	1,25/ 2,5 1,71E-05	2,5/ 5 0,0001	
4	Extinktion	0,453	0,374	0,272
	Prozent von Kontrolle	81	66,9	48,7
	Std.Abw.	0,021	0,017	0,012
	Std.Abw. in %	3,8	3	2,1
	CV%	4,705	4,484	4,43
	p-Value	1,25/ 2,5 0,0002	2,5/ 5 0,0001	
5	Extinktion	0,573	0,501	0,411
	Prozent von Kontrolle	87,9	76,8	63
	Std.Abw.	0,01	0,007	0,01
	Std.Abw. in %	1,5	1,1	1,5
	CV%	1,778	1,329	2,443
	p-Value	1,25/ 2,5 2,52E-07	2,5/ 5 2,73E-05	

p-Value	2,5/ 2,5	5/ 5
0,222/ 0,559	2,70E-06	8,20E-09
0,222/ 0,652	5,349E-14	8,158E-07

zu **Abb. 20.2.****A SK-N-SH(-)-Zellen**

Bestimmung	Konzentration Ascorbat in mmol/l	Kontrolle (0 mmol/l)	0,156	0,312	0,625
1	Extinktion	0,108	0,101	0,084	0,054
	Prozent von Kontrolle	100	93,5	77,8	50
	Std.Abw.	0,005	0,006	0,006	0,004
	Std.Abw. in %	4,6	5,9	5,9	3,7
	CV%	4,833	6,182	6,888	6,452
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25
		0,085	0,002	3,902E-05	2,158E-05
2	Extinktion	0,163	0,159	0,161	0,135
	Prozent von Kontrolle	100	97,5	98,8	82,8
	Std.Abw.	0,003	0,004	0,006	0,009
	Std.Abw. in %	1,8	2,5	3,7	5,5
	CV%	1,998	2,455	3,829	6,804
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25
		0,105	0,562	6,580E-04	2,844E-04
3	Extinktion	0,207	0,196	0,17	0,133
	Prozent von Kontrolle	100	94,7	82,1	64,3
	Std.Abw.	0,004	0,004	0,006	0,006
	Std.Abw. in %	1,9	1,9	2,9	2,9
	CV%	1,884	2,083	3,554	4,578
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25
		0,006	1,293E-04	1,219E-05	2,86E-04
4	Extinktion	0,318	0,299	0,294	0,257
	Prozent von Kontrolle	100	94	92,5	80,8
	Std.Abw.	0,013	0,005	0,009	0,006
	Std.Abw. in %	4,1	1,6	2,8	1,9
	CV%	4,238	1,825	2,995	2,286
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25
		0,003	0,837	0,011	8,701E-04
5	Extinktion	0,36	0,286	0,265	0,267
	Prozent von Kontrolle	100	79,4	73,6	74,2
	Std.Abw.	0,009	0,013	0,007	0,012
	Std.Abw. in %	2,5	3,6	1,9	3,3
	CV%	2,573	4,549	2,608	4,438
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25
		2,943E-04	0,043	0,732	0,004
6	Extinktion	0,467	0,385	0,312	0,328
	Prozent von Kontrolle	100	82,4	66,8	70,2
	Std.Abw.	0,014	0,008	0,006	0,012

	Std.Abw. in %	3	1,7	1,3	2,6
	CV%	2,921	1,765	1,765	3,544
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25
		2,878E-07	2,159E-05	0,017	1,408E-06
7	Extinktion	0,55	0,493	0,488	0,46
	Prozent von Kontrolle	100	89,6	88,7	83,6
	Std.Abw.	0,015	0,011	0,007	0,018
	Std.Abw. in %	2,7	2	1,3	3,9
	CV%	2,665	2,29	1,449	4,02
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25
		1,067E-04	0,466	0,048	0,003

	Konzentration Ascorbat in mmol/ l	1,25	2,5	5
1	Extinktion	0,023	0,006	0,009
	Prozent von Kontrolle	21,3	5,6	8,3
	Std.Abw.	0,002	0,002	0,001
	Std.Abw. in %	1,9	1,9	0,9
	CV%	9,537	27,082	16,664
	p-Value	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		3,243E-05	0,007	
2	Extinktion	0,107	0,074	0,08
	Prozent von Kontrolle	65,6	45,4	49,1
	Std.Abw.	0,004	0,003	0,006
	Std.Abw. in %	2,5	1,8	3,7
	CV%	3,759	3,488	7,027
	p-Value	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		3,561E-05	0,057	
3	Extinktion	0,085	0,031	0,079
	Prozent von Kontrolle	41,1	15	3,8
	Std.Abw.	0,009	0,002	0,025
	Std.Abw. in %	4,3	1	12,1
	CV%	10,91	7,096	31,12
	p-Value	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		8,96E-04	0,03	
4	Extinktion	0,216	0,139	0,016
	Prozent von Kontrolle	67,9	43,7	5
	Std.Abw.	0,013	0,005	0,009
	Std.Abw. in %	4,1	1,6	2,8
	CV%	5,869	3,642	56,305
	p-Value	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		4,005E-05	1,196E-07	
5	Extinktion	0,221	0,166	0,042
	Prozent von	61,4	46,1	11,7

	Kontrolle			
	Std.Abw.	0,02	0,01	0,004
	Std.Abw. in %	5,6	2,8	1,1
	CV%	9,062	6,056	9,014
	p-Value	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		0,002	9,193E-07	
6	Extinktion	0,259	0,177	0,079
	Prozent von			
	Kontrolle	55,5	37,9	16,9
	Std.Abw.	0,007	0,006	0,004
	Std.Abw. in %	1,5	1,3	0,9
	CV%	2,566	3,397	4,535
	p-Value	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		3,370E-07	1,366E-06	
7	Extinktion	0,404	0,351	0,282
	Prozent von			
	Kontrolle	73,5	63,8	51,3
	Std.Abw.	0,014	0,007	0,016
	Std.Abw. in %	2,5	1,3	2,9
	CV%	3,349	1,851	5,743
	p-Value	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		2,550E-04	2,092E-04	

p-Values	0,625/ 0,625	1,25/ 1,25	2,5/ 2,5	5/5
0,108/ 0,36	3,397E-07	1,989E-05	7,457E-05	1,419E-04
0,108/ 0,55	1,494E-05	1,822E-07	7,380E-07	2,602E-06

B SK-N-SH(+)-Zellen

Bestimmung	Konzentration Ascorbat in mmol/ l	Kontrolle (0 mmol/ l)	0,156	0,313	0,625
1	Extinktion	0,049	0,038	0,027	0,025
	Prozent von				
	Kontrolle	100	77,6	55,1	51
	Std.Abw.	0,004	0,001	0,003	0,003
	Std.Abw. in %	8,2	2	6,1	6,1
	CV%	7,143	2,969	10,903	10,196
	p-Value	0/ 0,156	0,156/ 0,313	0,313/ 0,625	0,625/ 1,25
		5,774E-06	0,002	0,324	1,099E-04
2	Extinktion	0,071	0,055	0,055	0,036
	Prozent von				
	Kontrolle	100	77,5	77,5	50,7
	Std.Abw.	0,004	0,002	0,006	0,002
	Std.Abw. in %	5,6	2,8	8,5	2,8
	CV%	5,024	2,931	10,755	5,488

	p-Value	0/ 0,156 4,441E-08	0,156/ 0,313 0,188	0,313/ 0,625 4,463E-06	0,625/ 1,25 6,531E-04
3	Extinktion Prozent von Kontrolle	0,079 100	0,056 70,9	0,055 69,6	0,037 46,8
	Std.Abw.	0,004	0,004	0,002	0,001
	Std.Abw. in %	5,1	5,1	2,5	1,3
	CV%	4,963	6,413	3,004	1,476
	p-Value	0/ 0,156 5,049E-05	0,156/ 0,313 0,699	0,313/ 0,625 3,882E-06	0,625/ 1,25 0,013
4	Extinktion Prozent von Kontrolle	0,195 100	0,178 91,3	0,158 81	0,155 79,5
	Std.Abw.	0,014	0,01	0,013	0,01
	Std.Abw. in %	7,2	5,1	6,7	5,1
	CV%	7,052	5,628	8,197	6,441
	p-Value	0/ 0,156 0,022	0,156/ 0,313 0,047	0,313/ 0,625 0,706	0,625/ 1,25 7,205E-04
5	Extinktion Prozent von Kontrolle	0,26 100	0,249 95,8	0,242 93,1	0,24 92,3
	Std.Abw.	0,011	0,007	0,006	0,017
	Std.Abw. in %	4,2	2,7	2,3	7,1
	CV%	4,291	2,926	2,276	7,196
	p-Value	0/ 0,156 0,058	0,156/ 0,313 0,131	0,313/ 0,625 0,897	0,625/ 1,25 0,002
6	Extinktion Prozent von Kontrolle	0,28 100	0,256 91,4	0,23 82,1	0,213 76,1
	Std.Abw.	0,011	0,016	0,004	0,028
	Std.Abw. in %	3,9	5,7	1,4	10
	CV%	3,868	6,143	1,889	13,244
	p-Value	0/ 0,156 0,023	0,156/ 0,313 0,021	0,313/ 0,625 0,173	0,625/ 1,25 0,04
7	Extinktion Prozent von Kontrolle	0,804 100	0,67 83,3	0,657 81,7	0,635 79
	Std.Abw.	0,014	0,014	0,008	0,009
	Std.Abw. in %	1,7	1,7	1	1,1
	CV%	1,797	2,057	1,271	1,34
	p-Value	0/ 0,156 5,261E-08	0,156/ 0,313 0,122	0,313/ 0,625 0,006	0,625/ 1,25 0,004

		0,002	3,005E-07	
7	Extinktion	0,566	0,509	0,368
	Prozent von Kontrolle	70,4	63,3	45,8
	Std.Abw.	0,021	0,019	0,01
	Std.Abw. in %	2,6	2,4	1,2
	CV%	3,75	3,809	2,649
	p-Value	1,25/ 2,5	2,5/ 5	
		0,005	6,610E-06	

p-Value	1,25/ 1,25	2,5/ 2,5	5/ 5
0,195/ 0,26	0,128	0,011	0,002
0,195/ 0,84	2,650E-06	6,027E-07	1,823E-08

zu 3.1.5.1.

A Kelly-Zellen

2 h Inkubationszeit				
Konzentration Wasserstoffperoxid (µmol/ l)	Kontrolle (0 µmol/ l)	25	50	100
Extinktion	0,145	-0,002	-0,006	-0,005
Prozent von Kontrolle	100	0	0	0
Std.Abw.	0,015	0,001	0,002	0,002
Std.Abw. in %	10,3	0,7	1,4	1,4
CV%	10,471	64,702	33,483	39,781

24 h Inkubationszeit				
Konzentration Wasserstoffperoxid (µmol/ l)	Kontrolle (0 µmol/ l)	25	50	100
Extinktion	0,269	0,011	0,014	0,012
Prozent von Kontrolle	100	4,1	5,2	4,5
Std.Abw.	0,019	0,002	0,001	0
Std.Abw. in %	7,1	0,7	0,4	0
CV%	7,208	16,046	10,476	3,336

96 h Inkubationszeit				
Konzentration Wasserstoffperoxid (µmol/ l)	Kontrolle (0 µmol/ l)	25	50	100
Extinktion	0,352	0,204	0,056	0,016
Prozent von Kontrolle	100	58	15,9	4,5

Std.Abw.	0,023	0,027	0,01	0,002
Std.Abw. in %	6,5	7,7	2,8	0,6
CV%	6,469	13,328	18,605	10,825
96 h Inkubationszeit				
Konzentration Wasserstoffperoxid ($\mu\text{mol/l}$)	150	200	300	
Extinktion	0,032	0,036	0,04	
Prozent von Kontrolle	9,1	10,2	11,4	
Std.Abw.	0,001	0,001	0,002	
Std.Abw. in %	0,3	0,3	0,6	
CV%	4,576	3,333	4,677	

B SK-N-SH-Zellen

2 h Inkubationszeit				
Konzentration Wasserstoffperoxid ($\mu\text{mol/l}$)	Kontrolle (0 $\mu\text{mol/l}$)	25	50	100
Extinktion	0,079	0,005	0,005	0,003
Prozent von Kontrolle	100	6,3	6,3	3,8
Std.Abw.	0,015	0	0	0,001
Std.Abw. in %	19	0	0	1,3
CV%	15,518	9,232	9,521	29,702

72 h Inkubationszeit				
Konzentration Wasserstoffperoxid ($\mu\text{mol/l}$)	Kontrolle (0 $\mu\text{mol/l}$)	25	50	100
Extinktion	0,462	0,403	0,371	0,231
Prozent von Kontrolle	100	87,2	80,3	50
Std.Abw.	0,017	0,031	0,031	0,02
Std.Abw. in %	3,7	7,7	7,7	4,3
CV%	3,595	7,596	8,245	8,764

72 h Inkubationszeit			
Konzentration Wasserstoffperoxid ($\mu\text{mol/l}$)	150	200	300
Extinktion	0,101	0,04	0,001
Prozent von Kontrolle	21,9	8,7	0,2
Std.Abw.	0,023	0,003	0,001
Std.Abw. in %	5	0,6	0,2
CV%	22,477	7,905	100,2

96 h Inkubationszeit						
Konzentration Wasserstoffperoxid ($\mu\text{mol/l}$)	Kontrolle (0 $\mu\text{mol/l}$)	25	50	100	150	200
Extinktion	0,093	0,012	0,004	0,004	0,004	-0,003
Prozent von Kontrolle	100	12,9	4,3	4,3	4,3	0
Std. Abw.	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001	0,008
Std. Abw. in %	2,2	2,2	1,1	1,1	1,1	8,6
CV%	2,287	15,608	13,856	12,61	22,713	237,02

zu **Abb. 27.**

A Kelly-Zellen

angesetzte Zellzahl/ 200 μl Medium	Konzentration Wasserstoffperoxid in $\mu\text{mol/l}$	Kontrolle (0 $\mu\text{mol/l}$)	25	50	100
5.000	Extinktion	0,139	0,099	0,052	0,001
	Prozent von Kontrolle	100	71,2	37,4	0,7
	Std. Abw.	0,005	0,01	0,003	0,001
	Std. Abw. in %	3,6	7,2	2,2	0,7
	CV%	3,864	9,572	5,769	40
	p-Value	0/ 25	25/ 50	50/ 100	
		0,001	0,001	3,846E-05	
10.000	Extinktion	0,163	0,162	0,107	0,003
	Prozent von Kontrolle	100	99,4	65,6	1,8
	Std. Abw.	0,008	0,013	0,003	0,002
	Std. Abw. in %	4,9	8	1,8	1,2
	CV%	4,83	8,174	2,543	48,922
	p-Value	0/ 25	25/ 50	50/ 100	
		0,823	5,037E-04	6,154E-08	
20.000	Extinktion	0,534	0,546	0,49	0,21
	Prozent von Kontrolle	100	102,2	91,8	39,3
	Std. Abw.	0,027	0,041	0,002	0,013
	Std. Abw. in %	5,1	7,7	0,4	2,4
	CV%	5,057	7,507	1,775	5,972
	p-Value	0/ 25	25/ 50	50/ 100	
		0,596	0,036	1,231E-07	
30.000	Extinktion	0,78	0,768	0,741	0,502
	Prozent von Kontrolle	100	98,5	95	64,4
	Std. Abw.	0,015	0,011	0,02	0,023
	Std. Abw. in %	1,9	1,4	2,6	2,9
	CV%	1,859	1,452	2,66	4,497
	p-Value	0/ 25	25/ 50	50/ 100	
		0,73	0,019	2,790E-06	

p-Values	Konzentration H ₂ O ₂ in µmol/ l	50/ 50		100/ 100	
		Zellzahl/ 200 µl Medium	5.000/ 10.000		1,941E-07
	10.000/ 20.000		5,007E-07		5,194E-05
	20.000/ 30.000		1,227E-08		5,714E-06

B SK-N-SH-Zellen

angesetzte Zellzahl/ 200 µl Medium	Konzentration Wasserstoffperoxid in µmol/ l	Kontrolle (0 µmol/ l)			
		25	50	100	
7.500	Extinktion	0,412	0,392	0,115	0,026
	Prozent von Kontrolle	100	95,1	27,9	6,3
	Std.Abw.	0,015	0,064	0,011	0,008
	Std.Abw. in %	3,6	15,5	2,7	1,9
	CV%	3,742	16,258	9,274	29,207
	p-Value	0/ 25	25/ 50	50/ 100	
		0,568	0,003	3,068E-05	
12.000	Extinktion	0,622	0,623	0,612	0,423
	Prozent von Kontrolle	100	100,2	98,4	68
	Std.Abw.	0,025	0,007	0,032	0,03
	Std.Abw. in %	4	1,1	5,1	7,1
	CV%	3,95	1,143	5,29	7,055
	p-Value	0/ 25	25/ 50	50/ 100	
		0,961	0,513	4,874E-05	
24.000	Extinktion	0,657	0,555	0,545	0,552
	Prozent von Kontrolle	100	84,5	83	84
	Std.Abw.	0,017	0,018	0,017	0,008
	Std.Abw. in %	2,6	2,7	2,6	1,2
	CV%	8,399	3,309	3,154	1,43
	p-Value	0/ 25	25/ 50	50/ 100	
		6,013E-05	0,391	0,418	
40.000	Extinktion	0,442	0,357	0,117	0,048
	Prozent von Kontrolle	100	80,8	26,5	10,9
	Std.Abw.	0,017	0,023	0,018	0,01
	Std.Abw. in %	3,8	6,4	4,1	2,3
	CV%	3,753	6,523	15,087	20,163
	p-Value	0/ 25	25/ 50	50/ 100	
		0,001	6,043E-06	0,001	

p-Values	Konzentration	Wasserstoffperoxid (µmol/ l)	
		50/ 50	100/ 100
Zellzahl/ 200 µl Medium	7.500/ 40.000	0,856	0,013
	40.000/ 12.000	5,188E-08	4,041E-05
	12.000/ 24.000	0,006	0,002

zu **3.2.1.**

Glukosegehalt

Bestimmung	c in g/ l	c in mmol/ l
1	1,94	10,77
2	1,99	11,04
3	2	11,1
Durchschnitt aus 1 bis 3	1,98	10,97
Std.Abw.	0,03	0,18

Laktatgehalt

Bestimmung	c in g/ l	c in mmol/ l
1	0	0
2	0	0
3	0	0
Durchschnitt aus 1 bis 3	0	0

zu **3.2.2.1.**

	Lagerung bei 3 °C		Lagerung bei 37 °C	
	c in g/ l	c in mmol/ l	c in g/ l	c in mmol/ l
1	0,0056	0,03	0	0
2	0,0017	0,01	0,0014	0,008
Durchschnitt aus 1 und 2	0,0037	0,02	0,0007	0,004
Std.Abw.	0,0028	0,0141	0,001	0,0057

zu **3.2.2.2.**

Konzentration Ascorbat	0 h	30 h
c in mg/ l	0,011	0
c in µmol/ l	64	0

zu **3.2.3.1.****A** Kelly-Zellen

Konzentration 2-Deoxy-D-Glukose (mmol/ l)	Kontrolle (0 mmol/ l)			
		2	4	6
Extinktion	0,6	0,201	0,162	0,151
Prozent von Kontrolle	100	33,5	27	25,2
Std.Abw.	0,025	0,006	0,005	0,004
Std.Abw. in %	4,2	1	0,8	0,7
CV%	4,12	3,093	3,174	2,39
p-Values	0/ 2 1,074E-28	2/ 4 1,212E-09	4/ 6 1,000E-04	

B SK-N-SH-Zellen

Konzentration 2-Deoxy-D-Glukose (mmol/ l)	Kontrolle (0 mmol/ l)			
		2	4	6
Extinktion	0,113	0,054	0,045	0,037
Prozent von Kontrolle	100	47,8	40	32,7
Std.Abw.	0,006	0,002	39,8	0,002
Std.Abw. in %	5,3	1,8	1,8	1,8
CV%	4,904	4,129	3,892	4,813
p-Value	0/ 2 3,984E-26	2/ 4 3,712E-09	4/ 6 3,152E-09	

zu **Abb. 31.****A** Kelly(-)- und Kelly(+)-Zellen

Kelly (-)					
	Konzentration 2-Deoxy-D-Glukose (mmol/ l)	Kontrolle (0 mmol/ l)			
		0,5	1	2	
1	Extinktion	0,157	0,063	0,023	0,011
	Prozent von Kontrolle	100	40,1	14,6	7
	Std.Abw.	0,006	0,006	0,002	0,002
	Std.Abw. in %	3,8	3,8	1,3	1,3
	CV%	4,106	9,392	8,899	21,264
2	Extinktion	0,211	0,148	0,106	0,056
	Prozent von Kontrolle	100	70,1	50,2	26,5

	Std.Abw.	0,017	0,006	0,003	0,008
	Std.Abw. in %	8,1	4,1	1,4	3,8
	CV%	8,071	4,003	2,808	13,832
3	Extinktion	0,312	0,114	0,04	0,027
	Prozent von Kontrolle	100	36,5	12,8	8,7
	Std.Abw.	0,009	0,006	0,012	0,006
	Std.Abw. in %	2,9	1,9	3,8	1,9
	CV%	2,728	5,541	30,452	20,246
4	Extinktion	0,673	0,235	0,12	0,022
	Prozent von Kontrolle	100	34,9	17,8	3,3
	Std.Abw.	0,017	0,014	0,012	0,01
	Std.Abw. in %	2,5	2,1	1,8	1,5
	CV%	2,506	5,817	9,616	44,3341
aus 1-4	Durchschnittliche Extinktion	0,338	0,14	0,072	0,029
	Prozent von Kontrolle	100	41,4	21,3	8,6
	p-Values	0/ 0,5	0,5/ 1	1/ 1	
		5,148E-07	2,578E-07	3,095E-01	

Kelly (+)					
	Konzentration 2-Deoxy-D-Glukose in mmol/ l	Kontrolle (0 mmol/ l)	0,5	1	2
1	Extinktion	0,125	0,108	0,074	0,04
	Prozent von Kontrolle	100	86,4	59,2	32
	Std.Abw.	0,007	0,012	0,002	0,003
	Std.Abw. in %	5,6	9,6	1,6	2,4
	CV%	5,26	11,473	3,376	8,412
2	Extinktion	0,158	0,104	0,07	0,033
	Prozent von Kontrolle	100	65,8	44,3	20,9
	Std.Abw.	0,008	0,004	0,005	0,003
	Std.Abw. in %	5,1	2,5	3,2	1,9
	CV%	4,892	3,755	6,427	8,428
3	Extinktion	0,222	0,159	0,1	0,053
	Prozent von Kontrolle	100	71,6	45	23,9
	Std.Abw.	0,008	0,006	0,006	0,004
	Std.Abw. in %	3,6	2,7	2,7	1,8
	CV%	3,554	3,602	5,714	7,844
4	Extinktion	0,652	0,463	0,332	0,109
	Prozent von Kontrolle	100	71	50,9	16,7
	Std.Abw.	0,022	0,013	0,009	0,006
	Std.Abw. in %	3,4	2	1,4	0,9
	CV%	3,422	2,886	2,64	5,089
aus 1-4	Durchschnittliche Extinktion	0,289	0,208	0,144	0,078
	Prozent von Kontrolle	100	72	49,8	27
	p-Values	0/ 0,5	0,5/ 1	1/ 2	
		0,084	0,200	1,381E-05	

p-Values Kelly(-)/ Kelly (+)	0/ 0	0,5/ 0,5	1/ 1	2/ 2
	0,711	0,002	1,811E-04	0,680

B SK-N-SH(-)- und SK-N-SH(+)-Zellen

SK-N-SH (-)					
	Konzentration 2-Deoxy-D-Glukose (mmol/ l)	Kontrolle (0 mmol/ l)	0,5	1	2
1	Extinktion	0,071	0,061	0,058	0,045
	Prozent von Kontrolle	100	85,9	81,7	63,4
	Std.Abw.	0,007	0,005	0,005	0,005
	Std.Abw. in %	9,6	7	7	7
	CV%	9,308	8,576	8,011	19,58
2	Extinktion	0,108	0,079	0,065	0,04
	Prozent von Kontrolle	100	73,1	60,2	37
	Std.Abw.	0,005	0,004	0,007	0,005
	Std.Abw. in %	4,6	3,7	6,5	4,6
	CV%	4,833	4,943	10,565	11,718
3	Extinktion	0,163	0,169	0,158	0,132
	Prozent von Kontrolle	100	103,7	96,9	81
	Std.Abw.	0,003	0,004	0,005	0,004
	Std.Abw. in %	1,8	2,5	3,1	2,5
	CV%	1,998	2,628	3,007	2,703
4	Extinktion	0,207	0,163	0,147	0,118
	Prozent von Kontrolle	100	78,7	71	57
	Std.Abw.	0,004	0,01	0,005	0,004
	Std.Abw. in %	1,9	4,8	2,4	1,9
	CV%	1,884	5,87	3,14	2,985
5	Extinktion	0,318	0,287	0,256	0,239
	Prozent von Kontrolle	100	90,3	80,5	75,2
	Std.Abw.	0,013	0,021	0,012	0,004
	Std.Abw. in %	4,1	6,6	3,8	1,3
	CV%	4,238	7,244	4,561	1,537
6	Extinktion	0,36	0,221	0,227	0,196
	Prozent von Kontrolle	100	61,4	63,1	54,4
	Std.Abw.	0,009	0,014	0,008	0,008
	Std.Abw. in %	2,5	3,9	2,2	2,2
	CV%	2,573	6,51	3,523	4,306
7	Extinktion	0,467	0,425	0,434	0,396
	Prozent von Kontrolle	100	91	92,9	84,8
	Std.Abw.	0,014	0,009	0,008	0,015
	Std.Abw. in %	3	1,9	1,7	3,2
	CV%	2,921	2,023	1,83	3,712
8	Extinktion	0,55	0,545	0,546	0,52
	Prozent von Kontrolle	100	99,1	99,3	94,5
	Std.Abw.	0,015	0,019	0,011	0,016

	Std.Abw. in %	2,7	3,5	2	2,9
	CV%	2,665	3,398	1,93	3,17
aus 1 – 8	durchschnittliche Extinktion	0,281	0,244	0,236	0,211
	Prozent von Kontrolle	100	86,8	84	75,1
	p-Value	0/ 0,5	0,5/ 1	1/ 2	
		0,585	0,948	0,341	

SK-N-SH (+)					
	Konzentration 2-Deoxy-D-Glukose (mmol/ l)	Kontrolle (0 mmol/ l)			
		0,5	1	2	
1	Extinktion	0,049	0,041	0,036	0,036
	Prozent von Kontrolle	100	83,7	73,5	73,5
	Std.Abw.	0,004	0,004	0,002	0,002
	Std.Abw. in %	8,2	8,2	4,1	4,1
	CV%	7,143	9,252	6,866	5,283
2	Extinktion	0,071	0,064	0,059	0,048
	Prozent von Kontrolle	100	90,1	83,1	67,6
	Std.Abw.	0,004	0,002	0,005	0,003
	Std.Abw. in %	5,6	2,8	7	4,2
	CV%	5,024	3,103	8,19	5,791
3	Extinktion	0,079	0,068	0,054	0,05
	Prozent von Kontrolle	100	86,1	68,4	63,3
	Std.Abw.	0,004	0,006	0,003	0,004
	Std.Abw. in %	5,1	8,5	3,8	5,1
	CV%	4,963	8,568	5,764	7,705
4	Extinktion	0,195	0,192	0,123	0,106
	Prozent von Kontrolle	100	98,5	63,1	54,4
	Std.Abw.	0,014	0,018	0,003	0,006
	Std.Abw. in %	7,2	9,2	1,5	3,1
	CV%	7,052	9,346	2,19	5,947
5	Extinktion	0,26	0,205	0,2	0,167
	Prozent von Kontrolle	100	78,8	76,9	64,2
	Std.Abw.	0,011	0,016	0,007	0,01
	Std.Abw. in %	4,2	6,2	2,7	3,8
	CV%	4,291	7,963	3,264	6,168
6	Extinktion	0,28	0,215	0,204	0,183
	Prozent von Kontrolle	100	76,8	72,9	65,4
	Std.Abw.	0,011	0,013	0,01	0,009
	Std.Abw. in %	3,9	4,6	3,6	3,2
	CV%	3,868	5,895	4,669	4,948
7	Extinktion	0,804	0,687	0,702	0,716
	Prozent von Kontrolle	100	85,4	87,3	89,1
	Std.Abw.	0,014	0,118	0,033	0,023
	Std.Abw. in %	1,7	14,7	4,1	2,9
	CV%	1,797	17,171	4,707	3,21

aus 1 – 7	durchschnittliche Extinktion	0,248	0,21	0,197	0,187
	Prozent von Kontrolle	100	84,7	79,4	75,4
	p-Value	0/ 0,5	0,5/ 1	1/ 2	
		0,317	0,527	0,553	

p-Values SK-N-SH (-)/ SK-N-SH (+)	0/ 0	0,5/ 0,5	1/ 1	2/ 2
	0,594	0,199	0,555	0,578

zu 3.3.3.2.1.

A Kelly-Zellen

Kelly in PBS ⁺⁺ mit 0 mmol/ l Glukose				
	Glukose		Laktat	
Inkubationszeit (min)	c in g/ l	c in mmol/ l	c in g/ l	c in mmol/ l
0	0	0	0,006	0,07
240	0	0	0,011	0,12

Kelly in PBS ⁺⁺ mit 0 mmol/ l Glukose und 1 mmol/ l 2-Deoxy-D-Glukose				
	Glukose		Laktat	
Inkubationszeit (min)	c in g/ l	c in mmol/ l	c in g/ l	c in mmol/ l
0	0,003	0,017	0,006	0,07
240	0,003	0,017	0,003	0,03

	0 mmol/ l f. c. Glukose	0 mmol/ l f. c. Glukose und 1 mmol/ l 2-Deoxy-D-Glukose
Sauerstoffverbrauchsrate (-0,001 μ mol/ min)	t = 0 min bis t = 10 min: 4,7	t = 10 min bis t = 45 min: 2,2

B SK-N-SH-Zellen

SK-N-SH in PBS ⁺⁺ mit 0 mmol/ l Glukose				
	Glukose		Laktat	
Inkubationszeit (min)	c in g/ l	c in mmol/ l	c in g/ l	c in mmol/ l
0	0,003	0,017	0,007	0,08
240	0	0	0,011	0,12

SK-N-SH in PBS ⁺⁺ mit 0 mmol/l Glukose und 1 mmol/l 2-Deoxy-D-Glukose				
Inkubationszeit (min)	Glukose		Laktat	
	c in g/l	c in mmol/l	c in g/l	c in mmol/l
0	0,028	0,16	0,002	0,02
240	0	0	0,006	0,07

	0 mmol/l f. c. Glukose	0 mmol/l f. c. Glukose und 1 mmol/l 2-Deoxy-D-Glukose
Sauerstoffverbrauchsrate (- 0,001 µmol/min)	t = 15 min bis t = 40 min: 1,8	t = 10 min bis t = 45 min: 1,05

zu **Abb. 37.**

A Glukoseverbrauch

Bestimmung	1		2		aus 1 – 2	
	c in mg/dl	c in mmol/l	c in mg/dl	c in mmol/l	c in mmol/l	Std.Abw.
Kontrolle (0 µmol/l)	154	8,55	170	9,44	9	0,629
250	157	8,71	144	7,99	8,35	0,509
500	162	8,99	159	8,82	8,91	0,12
750	162	8,99	155	8,6	8,8	0,276
1000	144	7,99	179	9,93	8,96	1,372
2000	170	9,44	185	10,3	9,87	0,608

p-Value	0/ 2000 µmol/l DCA	0,293
---------	--------------------	-------

B Laktatproduktion

Bestimmung	1		2		aus 1 – 2	
	c in g/l	c in mmol/l	c in g/l	c in mmol/l	c in mmol/l	Std.Abw.
Kontrolle (0 µmol/l)	0,112	1,24	0,174	1,93	1,59	0,488
250	0,136	1,51	0,125	1,39	1,45	0,085
500	0,095	1,05	0,106	1,17	1,11	0,085
750	0,095	1,05	0,064	0,71	0,88	0,24
1000	0,106	1,18	0,12	1,32	1,25	0,099
2000	0,094	1,05	0,076	0,85	0,8	0,141

11. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat Gernot Bruchelt für die exzellente Auswahl des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Die respektvolle Zusammenarbeit und seine Zuverlässigkeit sind beispielhaft. Sein Verständnis für meine Studienverpflichtungen, seine umfassende Unterstützung und zahlreiche inspirierende Diskussionen sind von großem Wert für mich. Herr Prof. Bruchelt mir einen wertvollen Einblick in naturwissenschaftliches Arbeiten und die onkologische Forschung ermöglicht.

Herzlich danken möchte ich den Mitarbeitern der AG Bruchelt für die angenehme und inspirierende Zusammenarbeit. Frau Dr. med. Zyrafete Kuçi hat ihre langjährige Erfahrung in der Arbeit mit Neuroblastomzellkulturen mit mir geteilt und mit ihren durchdachten Anleitungen und Lösungsvorschlägen die Durchführung der Versuche ermöglicht. Auch die fachlichen Ratschläge von Frau Dipl. Biologin Nadine Kemmler und Frau Gisela Merkel sowie viele inspirierende Gespräche haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Herzlicher Dank gilt auch meiner Mitdotorandin Rifka Niewisch für die Bereitstellung verschiedener Daten sowie die angenehme und produktive Zusammenarbeit.

Ohne meine Familie und Freunde wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen. Ich danke meinen Studienfreunden Bijoy und Birgit, Fabian und Miriam, meiner Schulfreundin Monika sowie Stefanie für ihre Unterstützung und langjährige Freundschaft.

Meiner Großtante und Tante danke ich ebenfalls herzlich.

Mein größter und am tiefsten empfundener Dank gilt jedoch meinen Eltern und meiner Schwester, dir mir durch ihre unbedingte Liebe und Hilfe die nötige Kraft und das erforderliche Durchhaltevermögen zur Durchführung dieser Promotion gegeben haben. Ihr Verständnis für mein Studium und die Promotion sowie die Trennungen und Belastungen, die diese zeitweise mit sich gebracht haben, sind beispielhaft. Sie geben mir stets die Freiheit und die Möglichkeiten, meinen eigenen Weg zu gehen, auf dem diese Promotion eine wichtige Station ist.

12. Curriculum Vitae

Personalien

Name und Vornamen: Deubzer Beate Johanna Eleonore
Geburtsdatum: 23. Oktober 1982
Geburtsort: München
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. rer. nat. Bernward Deubzer
Frau Annette Deubzer, geb. Mueller-Graaf

Schulischer Werdegang

1989 – 1993 Hans-Kammerer-Grundschule, Burghausen
1993 – 2002 Kurfürst-Maximilian-Gymnasium, Burghausen
28. Juni 2002 Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife

Propädeutikum und Studium Generale

10/ 2002 – 07/ 2003 Leibniz Kolleg Tübingen

Universitärer Werdegang

Seit 10/ 2003 Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls
Universität Tübingen
13. 09. 2005 Ärztliche Vorprüfung
11. 06. 2010 Ärztliche Prüfung

Pflegepraktika

08/ 2002 – 09/ 2002	Kreisklinik Burghausen, Internistisches Zentrum
02/ 2004 – 04/ 2004	Universitätsklinikum für Kinderheilkunde und Jugend- medizin der Eberhard Karls Universität Tübingen, Abteilung für Kinderchirurgie

Laborpraktika

09/ 2004	Universitätsklinikum für Kinderheilkunde und Jugend- medizin der Eberhard Karls Universität Tübingen, Neurometabolisches Zentrum und hämatologisches Routinelabor
----------	--

Famulaturen

08/ 2006 – 09/ 2006	Kreisklinik Altötting, Abteilung für Kardiologie
08/ 2007 – 10/ 2007	<i>Centro Medico Parroquial Aleman Espiritu Santo,</i> Arequipa, Peru
08/ 2008	Kinderklinik der Technischen Universität München Schwabing, Frühgeborenenstation und Abteilung für Hämatologie/Onkologie