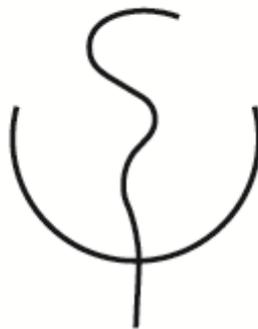


*Untersuchungen zur Interaktion von Glukose-  
stoffwechsel und DNA damage  
response in Myelomzellen*

Technische Universität München



**Promotionsschrift zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin**

**Vorgelegt**

**von**

**Hans-Richard Demel**

**München 2014**

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**  
**Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik**

**Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

# **Untersuchungen zur Interaktion von Glukosestoffwechsel und DNA damage response in Myelomzellen**

**Hans- Richard Demel**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation

**Vorsitzender:** Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

**Prüfer der Dissertation:**

1. Univ.-Prof. Dr. M. Essler,  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
2. Univ.-Prof. Dr. A. Krackhardt

Die Dissertation wurde am **02.10.2014** bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am **17.06.2015** angenommen.

*Für meine liebe Familie*

# Inhaltsverzeichnis

Abküzungsverzeichnis .....	
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das multiple Myelom .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologie des multiplen Myeloms .....	1
1.1.2 Therapeutische Ansätze beim multiplen Myelom .....	1
<b>1.2 Die Positronenemissionstomographie beim multiplen Myelom .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Die DNA damage response .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Der Tumorglukosemetabolismus .....</b>	<b>7</b>
1.4.1 Übersicht zur regulären Glykolyse .....	7
1.4.2 Der Warburg-Effekt (aerobe Glykolyse).....	8
1.4.3 Transporter und Enzyme des Tumorglukosemetabolismus.....	9
1.4.4 Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg in Tumorzellen.....	11
<b>2. Problemstellung und Zielsetzung .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>14</b>
3.1.1 Zelllinie.....	14
3.1.2 Radioaktive Substanz .....	14
3.1.3 Zytostatika .....	14
3.1.4 Chemikalien.....	14
3.1.5 Geräte.....	14
3.1.6 Software.....	15
3.1.7 Verbrauchsmaterial.....	15
<b>3.2 Methoden.....</b>	<b>15</b>
3.2.1 Zellkultur .....	15
3.2.2 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstestung .....	15
3.2.3 Herstellung der Verdünnungsreihen .....	16
3.2.4 <sup>18</sup> F-FDG-Aufnahmeversuche.....	16
3.2.5 Vitalitätsmessung.....	17
3.2.6 Western Blotting (Wet-Transfer der Proteine) .....	19

<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod</b> <b>für DNA-schädigende Substanzen</b> .....	<b>23</b>
4.1.1 Doxorubicin .....	23
4.1.2 Etoposid .....	27
4.1.3 Topotecan .....	31
<b>4.2 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod</b> <b>für Nicht-DNA-schädigende Substanzen</b> .....	<b>35</b>
4.2.1 Bortezomib .....	35
4.2.2 Vincristin .....	39
<b>4.3 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod unter</b> <b>DNA-schädigenden Substanzen mit Inhibitoren der DDR und</b> <b>PI3K/Akt/mTOR</b> .....	<b>43</b>
4.3.1 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod unter Doxorubicin und Inhibitoren der DDR und PI3K/Akt/mTOR .....	44
4.3.2 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod unter Etoposid und Inhibitoren der DDR und PI3K/Akt/mTOR .....	47
4.3.3 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod unter Topotecan und Inhibitoren der DDR und PI3K/Akt/mTOR .....	50
<b>4.4 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod bei Kombination von</b> <b>Zytostatika</b> .....	<b>53</b>
4.4.1 Vitalitätstestung und <sup>18</sup> F-FDG -Aufnahmeversuch bei Kombination von Vincristin und Etoposid .....	53
4.4.2 Vitalitätstestung und <sup>18</sup> F-FDG -Aufnahmeversuch bei Kombination von Bortezomib und Doxorubicin .....	54
<b>4.5 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus für Zytostatika in verändertem</b> <b>Nährmedium</b> .....	<b>56</b>
4.5.1 Untersuchung des Glukosemetabolismus mittels <sup>18</sup> F-FDG -Aufnahmeversuch in Medium mit erhöhter Glukosekonzentration.....	56
4.5.2 Untersuchung des Glukosemetabolismus mittels <sup>18</sup> F-FDG -Aufnahmeversuch in glukosefreiem Medium.....	58
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>60</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>70</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>72</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>76</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>79</b>
<b>10.Danksagung</b> .....	<b>87</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP binding cassette
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adeninmonophosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATM	Ataxia telangiectasia mutated protein
ATP	Adenosintri-phosphat
ATR	ATM-Rad3-related
BCA	Bicinchoninsäure
BER	Basenexzisionsreparatur
Bq	Becquerel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
Ca	Kalzium
ca.	circa
CC3	Cleaved Caspase-3
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cpm	Counts per minute (Zählrate pro Minute)
CT	Computertomographie
DDR	DNA damage response
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
Doxo	Doxorubicin
DSB	DNA double strand break (DNA- Doppelstrangbruch)
DTT	Dithiotreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
etc.	et cetera
Etop	Etoposid
f.c.	fold control (Vielfaches der Kontrolle)
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid

---

FDG	2'-Fluoro-2'-Desoxyglukose
FKS	Fetales Kälberserum
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
H	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HK	Hexokinase
HR	Homologe Rekombination
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
kBq	Kilobecquerel
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
LDH	Laktatdehydrogenase
mA	Milliampere
min	Minuten
mM	Millimol
MM	multiples Myelom
MRT	Magnetresonanztomographie
mSv	Millisievert
mTOR	mammalian target of rapamycin
n	Fallzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHEJ	Nicht-homologe Rekombination
nm	nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PET	Positronenemissionstomographie
PI3K	Phosphoinositid 3-kinase

PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pyr	Pyruvat
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
SMC	Structural maintenance of chromosome
sog.	sogenannt
SSB	DNA single strand break (DNA- Einzelstrangbruch)
SUV	Standardized uptake value
TBST	Tris buffered saline with Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Topo	Topotecan
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
u.a.	unter anderem
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WF	Wachstumsfaktor
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

## 1.1 Das multiple Myelom

### 1.1.1 Epidemiologie des multiplen Myeloms

Das multiple Myelom (Synonym: Plasmozytom, Morbus Kahler) ist eine maligne, hämatologische Tumorerkrankung, die durch eine Infiltration des Knochenmarks durch monoklonale, Immunglobulin-bildende Plasmazellen charakterisiert ist. Aktuell erkranken in Deutschland jährlich etwas mehr als 6000 Menschen neu an einem multiplen Myelom, wobei das männliche Geschlecht etwas häufiger betroffen ist (♂: 8,1:100.000; ♀: 6,7:100.000) (Robert Koch Institut 2010). Weltweit macht das multiple Myelom etwa 13% aller hämatologischen Erkrankungen aus (zweithäufigste Erkrankung dieser Gruppe nach den Lymphomen) und ist für ca. 20% der Todesfälle an Erkrankungen des blutbildenden Systems verantwortlich (Jemal, Siegel et al. 2008). Häufige Beschwerden sind Anämie, Infektanfälligkeit, Osteolysen mit Knochenschmerzen und Niereninsuffizienz durch Paraproteinablagerungen.

Das multiple Myelom ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters (nur etwa 2% der Erkrankten sind unter 45 Jahre alt) mit einem medianen Alter von etwa 65 Jahren bei Diagnosestellung (Caers, Vande broek et al. 2008). Die Erkrankung gilt als noch nicht dauerhaft heilbar und hat eine hohe Rezidivquote. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 40%, was die immer noch ungünstige Prognose dieser Knochenmarkserkrankung verdeutlicht (Robert Koch Institut 2010). Ein häufiger Grund für das Versagen der langfristigen Therapie ist die Ausbildung einer Resistenzentwicklung gegenüber gängig eingesetzten Wirkstoffen (Multiple Drug Resistance).

### 1.1.2 Therapeutische Ansätze beim multiplen Myelom

Das multiple Myelom wird therapeutisch meist erst angegangen, wenn es Symptome verursacht. Gängige Behandlungsstrategien des multiplen Myeloms umfassen bei jüngeren Patienten in gutem Allgemeinzustand eine Hochdosis- Chemotherapie, gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation (Lokhorst, Einsele et al. 2010). Im Anschluss sollte stets eine Erhaltungstherapie erfolgen.

Alternative Erstlinientherapeutika haben dazu beigetragen, das progressionsfreie Überleben und auch das Gesamtüberleben der Patienten maßgeblich zu verbessern (Kumar, Rajkumar et al. 2008). Dazu zählen u.a. die Immunmodulatoren Thalidomid/Lenalidomid und der Proteasom-Inhibitor Bortezomib. Diverse Kombinationsschemata mit Melphalan, Dexamethason und Thalidomid/Lenalidomid oder Bortezomib gehören zum Therapiestandard und sind vor allem auch für Hochrisikopatienten (z.B. fortgeschrittenes Stadium, bestimmte zytogenetische Aberrationen etc.) geeignet (Rajkumar 2013).

Trotz der hohen Ansprechrate bei Applikation von Bortezomib (z.B. in Kombination mit Dexamethason) (Harousseau, Attal et al. 2010) bleiben die häufige Resistenzentwicklung und die Entstehung einer peripheren Neuropathie limitierende Faktoren der Chemotherapie (Delforge, Blade et al. 2010). Nebenwirkungsärmere bzw. effektivere Weiterentwicklungen von Proteasom-Inhibitoren (z.B. Carfilzomib, Marizomib), immunmodulatorischer Substanzen (Pomalidomid), Inhibitoren der Histondeacetylase und Inhibitoren des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalwegs (PI3K) sind Gegenstand aktueller Forschung (Mahindra, Laubach et al. 2012, Moreau, Richardson et al. 2012).

Aufgrund der höheren Nebenwirkungsrate ist der Einsatz von Therapieschemata mit älteren Zytostatika wie etwa Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason (VAD-Schema) und anderer Topoisomerase-Hemmstoffe eher rückläufig. Trotzdem können diese Medikamente bei Neuerkrankten helfen, die Tumormasse initial zu reduzieren. Zudem ist beispielsweise durch den Wirksamkeitsnachweis von liposomalem Doxorubicin (eine Form des „drug delivery system“) in Kombination mit Bortezomib das Interesse an konventionellen Zytostatika in der Therapie des multiplen Myeloms wieder gewachsen (Plosker 2008).

## 1.2 Die Positronenemissionstomographie beim multiplen Myelom

Das Staging des multiplen Myeloms erfolgt nach der Klassifikation von Durie und Salmon, die im Jahr 2006 um das Attribut „Plus“ ergänzt wurde. Neben den weiterhin relevanten klassischen Blut- und Urinmarkern (z.B. monoklonale Immunglobuline, Hämoglobin, Serumkalzium, beta-2-Mikroglobulin) und der konventionellen Röntgenaufnahme wurde der radiologischen Entwicklung durch die Hinzunahme von Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Rechnung getragen.

Ein häufig bei der PET eingesetzter Tracer ist das Glukoseanalogon  $^{18}\text{F}$ -FDG, bei dem eine Hydroxygruppe des Glukosemoleküls durch das Radionuklid  $^{18}\text{F}$ Fluor ersetzt wird.

$^{18}\text{F}$ -FDG wird von Körperzellen wie normale Glukose passiv aufgenommen. Die Aufnahme erfolgt über transmembranäre Glukosetransporter (GLUT). Im Inneren der Zelle wird die Glukose durch ein Schlüsselenzym der Glykolyse (Hexokinase) zu  $^{18}\text{F}$ -FDG-6-Phosphat phosphoryliert. Dieses Substrat kann nicht weiter verstoffwechselt werden und reichert sich somit intrazellulär an (sog. metabolic trapping). Besonders stark erfolgt die Aufnahme des Tracers in Tumorzellen, da diese gegenüber dem Normalgewebe eine bis zu 10-fach erhöhte Glykolyserate aufweisen können (Czech, Brenner et al. 2000)

Ein wesentlicher Unterschied des  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET im Vergleich zu CT oder MRT ist die Möglichkeit zur Quantifizierung der metabolischen Aktivität des Gewebes und weniger seiner anatomischen Parameter. Oft lässt sich zu Beginn der Behandlung im CT oder MRT kaum eine Größenänderung des Tumorgewebes nachweisen. Eine Abnahme der Glukoseversorgung und damit des SUV (standardized uptake value) in der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET geht häufig dieser morphologischen Entwicklung voraus und eignet sich so eher als früher Marker für die Beurteilung des Therapieresponsivität des Tumors (Delorme and Baur-Melnyk 2009).

Beim multiplen Myelom korrelieren erhöhte SUV-Werte mit einer signifikant schlechteren Prognose (Zamagni, Patriarca et al. 2011). Es hat sich auch gezeigt, dass die Bestätigung einer kompletten Remission im  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET vor einer autologen Stammzelltransplantation das Outcome der am multiplen Myelom erkrankten Patienten verbessert (Bartel, Haessler et al. 2009). Ein weiterer Vorzug des  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET ist, dass es fokale Knochenmarksläsionen sensitiv erfassen kann. Dies ist insofern wichtig, als die Anzahl und nicht etwa die Größe der Knochenmarksaffektionen invers mit dem Überleben der Patienten korreliert (Walker, Brown et al. 2012).

Die Kombination aus  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET und CT brachte einen weiteren Fortschritt in der Bildgebung, da hierbei durch Überlagerung der Bilder eine gute anatomische Korrelation der Aktivitätsmuster des Tumorgewebes erstellt werden kann. Zudem ist mit dem  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET-CT eine

Ganzkörperuntersuchung möglich, die in einer Studie eine Sensitivität von über 89% in der Erkennung lokaler Läsionen zeigte (Winterbottom and Shaw 2009) und damit jeder vergleichbaren Aufnahmetechnik mindestens gleichwertig (PET, MRT) bis deutlich überlegen war (CT, konventionelles Röntgen). In einer der größten prospektiven Studie konnte festgestellt werden, dass der Nachweis von mehr als drei  $^{18}\text{F}$ -FDG-affinen Läsionen im  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET-CT den maßgeblichen Faktor für das progressionsfreie Überleben von Myelom-Patienten darstellt (Bartel, Haessler et al. 2009).

Nachteile dieser Technik sind neben den höheren Kosten die relativ hohe Strahlenbelastung für den Patienten (etwa 15-20 mSv pro Untersuchung). Außerdem scheint das MRT für gewisse Fragestellungen, beispielsweise zur Detektion eines diffusen Knochenmarkbefalls mit niedrigem Infiltrationsgrad (z.B. des Beckens und der Wirbelsäule) das geeignetere Nachweisverfahren zu sein (Dimopoulos, Terpos et al. 2009). Eine größere, systematische Analyse deutet an, dass die Weiterentwicklung des Ganzkörper-MRT eine höhere Sensitivität als das  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET-CT erreichen dürfte (van Lammeren-Venema, Regelink et al. 2012).

Als weiteres, grundsätzliches Problem der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET-Diagnostik muss beachtet werden, dass das eingesetzte  $^{18}\text{F}$ -FDG nicht tumorspezifisch ist. Es reichert sich beispielsweise auch in metabolisch aktiven Entzündungen, Abszessen, Granulomen, Heilungsprozessen etc. an. Ein erhöhter Blutzuckerspiegel kann ebenfalls mit der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme interferieren und verfälschte Ergebnisse liefern (Shreve, Anzai et al. 1999).

Auch in der Chemotherapie eingesetzte Zytostatika können auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG -Aufnahme von Tumorzellen Einfluss nehmen, wie im Verlauf dieser Arbeit anhand von in-vitro Zellversuchen an Myelomzellen gezeigt werden wird.

### 1.3 Die DNA damage response

Die DNA damage response (DDR) ist ein essentielles Instrument der Zelle, um ihre genomische Integrität zu bewahren. Die DDR umfasst eine Vielzahl an Signalwegen und Enzymen, um zielgerichtet auf Schädigungen der DNA-Struktur reagieren zu können. Defekte in diesem DNA-Reparatursystem sind oftmals ursächlich für die Karzinogenese und für das deregulierte Wachstum der Tumorzelle (Ciccio and Elledge 2010).

Während kleinere Schäden an der DNA meist durch die Basenexzisionsreparatur (BER) behoben werden können, induzieren schwere Schäden wie etwa Doppelstrangbrüche zwei wesentliche Mechanismen der DDR: die homologe Rekombination (HR= homologous recombination) und die nicht-homologe, sequenzspezifische Rekombination (NHEJ= nonhomologous end-joining) (Finlay and Griffin 2012).

Bei der homologen Rekombination versucht die Zelle, die ursprüngliche DNA-Sequenz an der Schadstelle zu bewahren. Dazu wird ein Teil der DNA um den Doppelstrangbruch reseziert und das intakte, homologe Schwesterchromatid als Vorlage für die Synthese der neuen DNA verwendet.

Im Gegensatz dazu werden bei der sequenzspezifischen Rekombination (NHEJ) mithilfe der Integrase die nicht-homologen Enden der Doppelstrangbrüche zunächst gespalten und dann miteinander ligiert. Dieser Prozess ist zwar einfacher, aber auch fehleranfälliger und verursacht dadurch häufiger mutagene Läsionen (Lord and Ashworth 2012).

Diese Reparaturvorgänge werden durch sog. phosphatidylinositol 3-kinase related kinases (PIKKs) initiiert, zu denen die Enzyme ATM (ataxia telangiectasia mutated protein); ATM-Rad3-related (ATR) und DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) gehören. Diese PIKKs reagieren auf schädigende Einflüsse mit der Phosphorylierung einer Vielzahl nachgelagerter Kinasen und Proteine wie etwa p53, H2AX, Chk1/Chk2 etc. (Woods and Turchi 2013).

Es wurde gezeigt, dass Topoisomerase-Inhibitoren wie Etoposid und Doxorubicin die Aktivierung der DNA damage response über eine Stimulation der Serin-Proteinkinase ATM induzieren können (Bakkenist and Kastan 2003). Die Topoisomerase mit den Subklassen I und II ist ein Enzym, das für die räumliche Anordnung der DNA-Moleküle verantwortlich ist und essentielle Bedeutung für die Transkription und Replikation der Zell-DNA hat. Sie sorgt dafür, dass die während replikativer Vorgänge entstehenden Torsionskräfte des DNA-Strangs abgeschwächt werden. Dies geschieht, indem die Topoisomerase an den Enden des Ablesevorgangs der DNA-Helix gezielt Einzel- (Topoisomerase I) bzw. Doppelstrangbrüche (Topoisomerase II) setzt und so einer „Überspiralisierung“ des DNA-Strangs entgegenwirkt. Am Ende der Umbauvorgänge

verschließt die Topoisomerase die Strangbrüche wieder und fällt von der DNA ab. Topoisomerase-Hemmstoffe stabilisieren die entstandenen Strangbrüche durch kovalente Bindung der Topoisomerase an die Nukleotide der DNA. Diese so entstandenen Spaltungskomplexe können zu irreparablen Doppelstrangbrüchen führen, die Apoptose induzieren oder auch am Anfang der Tumorentwicklung stehen können (Nitiss 2009).

Veränderungen im Reparaturmechanismus von Doppelstrangbrüchen in Tumorzellen können wichtige Auswirkungen auf die effektive Wirkweise von DNA-schädigenden Substanzen haben. NHEJ-defiziente Tumorzellen reagierten beispielsweise sensitiver auf eine Behandlung mit Topoisomerase-II-Hemmern (Caldecott, Banks et al. 1990), wohingegen eine hohe Aktivität der DNA-PKcs zu einer erhöhten Resistenzbildung in malignen Zellen gegenüber Doxorubicin und Etoposid beitrug (Shen, Schultz et al. 1998, Hansen, Lundin et al. 2003).

Topoisomerase-Hemmstoffe des Typs I (z.B. Topotecan) können auch Einzelstrangbrüche (SSB= single-strand breaks) induzieren. Diese werden vornehmlich durch den Vorgang der Basenexzisionsreparatur reguliert. Dabei werden die beschädigten Basen entfernt und ihr zugehöriges Zucker-Phosphat-Rückgrat ausgeschnitten. Anhand der komplementären Basen des Schwesterstrangs werden die neuen Nukleotide synthetisiert. Ein Schlüsselenzym bei der Initiation und Regulierung dieser Basenexzisionsreparatur ist die Poly(ADP-ribose)-Polymerase. Eine Inhibition von PARP hat zur Folge, dass Einzelstrangbrüche nur noch mit Hilfe der homologen Rekombination behoben werden können, welche aber in malignen Zellen häufig fehlerhaft ist (Furgason and Bahassi el 2013).

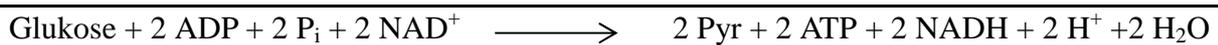
Man hat bereits einige Vorgänge während der DNA damage response identifizieren können, die energieverbrauchende Prozesse darstellen. So wurden einige ATP-abhängige Umbauprozesse des Chromatins während der DNA-Reparatur entdeckt, deren vollständige Bedeutung noch nicht ganz geklärt ist (Lans, Marteiijn et al. 2012). Außerdem konnte für die Proteinfamilie der SMC (structural maintenance of chromosome, wichtig in der strukturellen Organisation der DNA) gezeigt werden, dass diese über eine ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse DNA-Doppelstrangbrüche prozessieren können (Kinoshita, van der Linden et al. 2009).

## 1.4 Der Tumorglukosemetabolismus

### 1.4.1 Übersicht zur regulären Glykolyse

Die Glykolyse ist der bedeutsamste Abbauweg von Kohlenhydraten im Organismus zur Energiegewinnung. Sie läuft sowohl unter oxidischen als auch unter anoxischen Bedingungen zunächst gleichartig ab. In zehn enzymatischen Zwischenschritten wird ein Glukosemolekül zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut. In der ersten Phase des Abbaus wird zunächst der Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) eingesetzt, um aus der aufgenommenen Glukose (eine Hexose) zwei Triosen zu bilden. Die dabei entstehenden zwei Moleküle Glycerinaldehyd-3-phosphat werden unter Gewinnung von ATP und der Reduktionsäquivalente NADH (Nicotinamidadenindinukleotid) weiter zum Endprodukt Pyruvat verstoffwechselt (Harris 2013).

Somit ergibt sich für die zelluläre Glykolyse zusammengefasst:



Falls die Körperzelle über ein ausreichendes Angebot an Sauerstoff verfügt, wird das Pyruvat in das Mitochondrium importiert und dem Zitratzyklus zugeführt. Dabei kommt es zum Abbau des „Universalbrennstoffs“ Acetyl-CoA zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  und Übertragung der bei der Oxidation freigesetzten Elektronen mittels NADH bzw.  $\text{FADH}_2$  in die Atmungskette. Am Ende des Prozesses der Zellatmung steht eine Energieausbeute von etwa 36 mol ATP/mol Glukose.

Unter Sauerstoffdeprivation wird die mitochondriale Atmungskette weitestgehend umgangen und Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase (LDH) unter Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$  zu Laktat umgesetzt („Milchsäuregärung“). Die Regeneration des Coenzym  $\text{NAD}^+$  ist essentiell für die Zelle, da es sofort wieder in die Glykolyse eingespeist werden kann. Bei diesem Abbauweg werden durchschnittlich nur 2 mol ATP/mol Glukose generiert (Harris 2013)

Somit ergibt sich für die Milchsäuregärung zusammengefasst:



### 1.4.2 Der Warburg-Effekt (aerobe Glykolyse)

Es ist hinlänglich bekannt, dass viele Tumorzellen den Großteil ihrer Glukose im Rahmen der Energiegewinnung zu Laktat abbauen, selbst wenn oxische Bedingungen vorherrschen. Die Mitochondrien der Tumorzellen verbleiben zwar oft funktionell aktiv, es wird aber nur ein relativ geringer Bruchteil des Zuckers in Tumorzellen oxidativ metabolisiert. Auf diese Weise generiert die Tumorzelle etwa 4 mol ATP/mol Glukose (Vander Heiden, Cantley et al. 2009).

Dieses Phänomen der „aeroben Glykolyse“ entdeckte Otto Warburg schon vor vielen Jahrzehnten und wird seitdem unter dem Begriff „Warburg-Effekt“ geführt (Warburg, Wind et al. 1927). Otto Warburg vermutete als Ursache der Transformation der Tumormetabolismus einen Defekt in der mitochondrialen Atmungskette und glaubte hier den Schritt zur Entstehung maligner Zellen zu erkennen (Warburg 1956). Obwohl dieser Kausalitätszusammenhang seitdem kontrovers diskutiert wird (Zu and Guppy 2004), ist der aberrant gesteigerte Glukosemetabolismus von Tumorzellen mittlerweile von großem wissenschaftlichem Interesse und als eines der Hauptmerkmale von malignen Zellen akzeptiert (Hanahan and Weinberg 2011).

Es besteht eine Vielzahl an Hypothesen darüber, warum maligne Zellen zur aeroben Glykolyse und damit (im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung) zu einem scheinbar ineffektiveren, da mit einer deutlich geringeren ATP-Ausbeute verbundenen Metabolismus wechseln. Brandon et al. postulierten beispielsweise, dass Tumorzellen ihre Atmungskette umgehen, um mehr reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu erzeugen. Diese freien Radikale können durch Einzelstrangbrüche Mutationen in Protoonkogenen der DNA verursachen (Brandon, Baldi et al. 2006). Des Weiteren kann der hohe und schnelle Bedarf an Energiebausteinen in proliferierenden Tumorzellen nur gedeckt werden, wenn die entscheidenden enzymatischen Abläufe der Glykolyse nicht durch einen Mangel an Coenzymen gebremst werden. Die Gewinnung des Coenzym NAD<sup>+</sup> aus der Konversion von Pyruvat in Laktat ist wesentlich schneller als es in der oxidativen Phosphorylierung geschieht (Gatenby and Gillies 2004).

Diesbezüglich wurden in Tumorzellen unterschiedliche Isoformen des Enzyms Laktatdehydrogenase (mit Induktion des Subtyps LDH-A und Suppression von LDH-B) entdeckt, die diese „Hochgeschwindigkeits-Glykolyse“ in onkogenen Zellen noch effektiver ablaufen lassen können (Koukourakis, Giatromanolaki et al. 2006). Die LDH-A vermittelte Umleitung von NADH in die aerobe Glykolyse entzieht dieses Coenzym dem mitochondrialen Elektronenshuttle-System und könnte miterklären, weshalb in Tumorzellen die mitochondriale Atmungskette eine eher untergeordnete Rolle spielt.

Auf molekularer Ebene erfolgt die Induktion dieses Enzymwechsels u.a. durch den hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Dieser Transkriptionsfaktor zählt zu den Schlüsselenzymen in der Steuerung der glykolytischen Antwort der Zelle auf Veränderungen der Umgebungsbedingungen (Semenza 1998). Auf hypoxischen Stress hin, wie er häufig in schnell wachsendem Tumorgewebe entsteht, induziert HIF-1 angiogenetische Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF), hämatopoetische Faktoren (z.B. Transferrin, Erythropoetin), aber vor allem auch Glukosetransporter und Enzyme der Glykolyse wie Hexokinase II, Pyruvatkinase 2 oder Laktatdehydrogenase-A (Koppenol, Bounds et al. 2011).

Insgesamt betrachtet vermag die Tumorzelle über den Warburg-Effekt aufgrund des Geschwindigkeitsvorteils relativ mehr ATP zu generieren als es im trägeren oxidativen Abbau möglich wäre (Pfeiffer, Schuster et al. 2001). Außerdem dienen Zwischenprodukte des Glukoseabbaus als Metabolite des Pentosephosphatwegs, dessen Ribose für die Herstellung von Nukleotiden, Aminosäuren, NADPH etc. benötigt wird. Neben bioenergetischen Vorteilen beschleunigt die ATP-Gewinnung über die aerobe Glykolyse somit auch biosynthetische Prozesse, die essentiell sind, um beispielsweise exogen induzierte Schäden der DNA zu reparieren (DeBerardinis, Lum et al. 2008).

### 1.4.3 Transporter und Enzyme des Tumorglukosemetabolismus

Der erste limitierende Schritt des Glukosemetabolismus ist der Transport der Glukose über die Zellmembran. Bisher konnten 14 unterschiedliche Glukosetransporter identifiziert werden, die aufgrund ähnlicher Aminosäurezusammensetzungen in drei Klassen unterteilt worden sind (Mueckler and Thorens 2013). Den wichtigsten Transporter für Zellen des zentralen Nervensystems, der Blutzellen und auch von diversen Tumorzellentitäten stellt GLUT-1 dar (Ganapathy, Thangaraju et al. 2009). Es handelt sich um einen insulinunabhängigen Transporter, der unter physiologischen Bedingungen annähernd gesättigt ist und eine hohe Affinität für Glukose besitzt.

Bereits frühe Studien konnten die Überexpression der Glukosetransporter-1 und 3 mit der onkogenen Transformation von Zellen in Verbindung bringen (Yamamoto, Seino et al. 1990). Nachfolgend konnten für das Lungenkarzinom, Brustkrebs und Pankreastumoren die Überexpression des GLUT-1 mit einem gesteigerten  $^{18}\text{F}$ -FDG-Uptake im PET assoziiert werden (Brown and Wahl 1993, Reske, Grillenberger et al. 1997).

Es wurde festgestellt, dass Tumoren mit starker GLUT-1-Expression eine schlechtere Prognose haben, da dies mit Invasivität, einem höheren Proliferationsindex und der Neigung zur Metastasierung verbunden war (Airley and Mobasher 2007). Obwohl z.B. für gynäkologische Krebserkrankungen mit GLUT-1-Expression ein besseres Ansprechen auf eine nachfolgende Chemotherapie gezeigt wurde (Cantuaria, Fagotti et al. 2001), konnte für viele andere Tumorarten mit GLUT-1-Expression (z.B. HNO, Gastroenterologie) eine erhöhte Letalität bei Patienten festgestellt werden (Kawamura, Kusakabe et al. 2001, Tohma, Okazumi et al. 2005, Mori, Tsukinoki et al. 2007).

Die Hexokinase gilt als das Schlüsselenzym der Glykolyse, da es zu Beginn des Zuckerstoffwechsels steht und wichtige Verbindungen zur Glykogensynthese und zum Pentosephosphatweg hat. Gewebespezifisch kommen 4 Subtypen der Hexokinase vor, die Expression der Hexokinase II (HKII) spielt dabei für die aerobe Glykolyse in Tumoren eine prädominante Rolle (Pelicano, Martin et al. 2006). Besonders die Bindung der Hexokinase II an einen spannungsabhängigen Anionen-Kanal an der Außenseite des Mitochondriums trägt zur Resistenzbildung bei und ist ein Kennzeichen einiger hochmaligner, schlecht differenzierter Tumore. Hierbei wird die Glykolyse mit der oxidativen Phosphorylierung gekoppelt, da die Hexokinase II auf im Mitochondrium produziertes ATP direkt als Substrat zugreifen kann, um die rasante Phosphorylierung neuer Glukosemoleküle am Laufen zu halten (Pedersen, Mathupala et al. 2002). Die zentrale Bedeutung der Hexokinase II für die Aufrechterhaltung des Warburg-Effekts konnte z.B. in Glioblastomzellen gezeigt werden, wo unter Ausschaltung dieses Enzyms ein deutlicher Anstieg des normalen oxidativen Glukosemetabolismus bei gleichzeitigem Abfall der Laktatproduktion erreicht wurde (Wolf, Agnihotri et al. 2011). Eine Arbeit an Myelomzellen konnte demonstrieren, dass durch die Inhibition der Hexokinase II eine Medikamentenresistenz rückgängig gemacht werden konnte und der zytotoxische Effekt einer Behandlung mit Doxorubicin wiederhergestellt wurde (Nakano, Tsuji et al. 2011).

#### 1.4.4 Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg in Tumorzellen

Die Expression der erwähnten glykolytischen Enzyme und Transporter des Glukosemetabolismus werden auf molekularer Ebene gesteuert. Hierbei spielt in vielen Tumorarten der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg eine eminente Rolle in Überleben, Wachstum und Progression der Tumorzelle (Liu, Cheng et al. 2009). Es sind drei Klassen von PI3K bekannt, von denen besonders der Klasse I eine Bedeutung in der Onkogenese attribuiert wird.

Nach der Bindung eines Wachstumsfaktors an der Zellmembran stimuliert PI3K über die Bildung des second messengers Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphat (PIP3) die Aktivität der Serin/Threonin-Kinase Akt (Liu, Cheng et al. 2009).

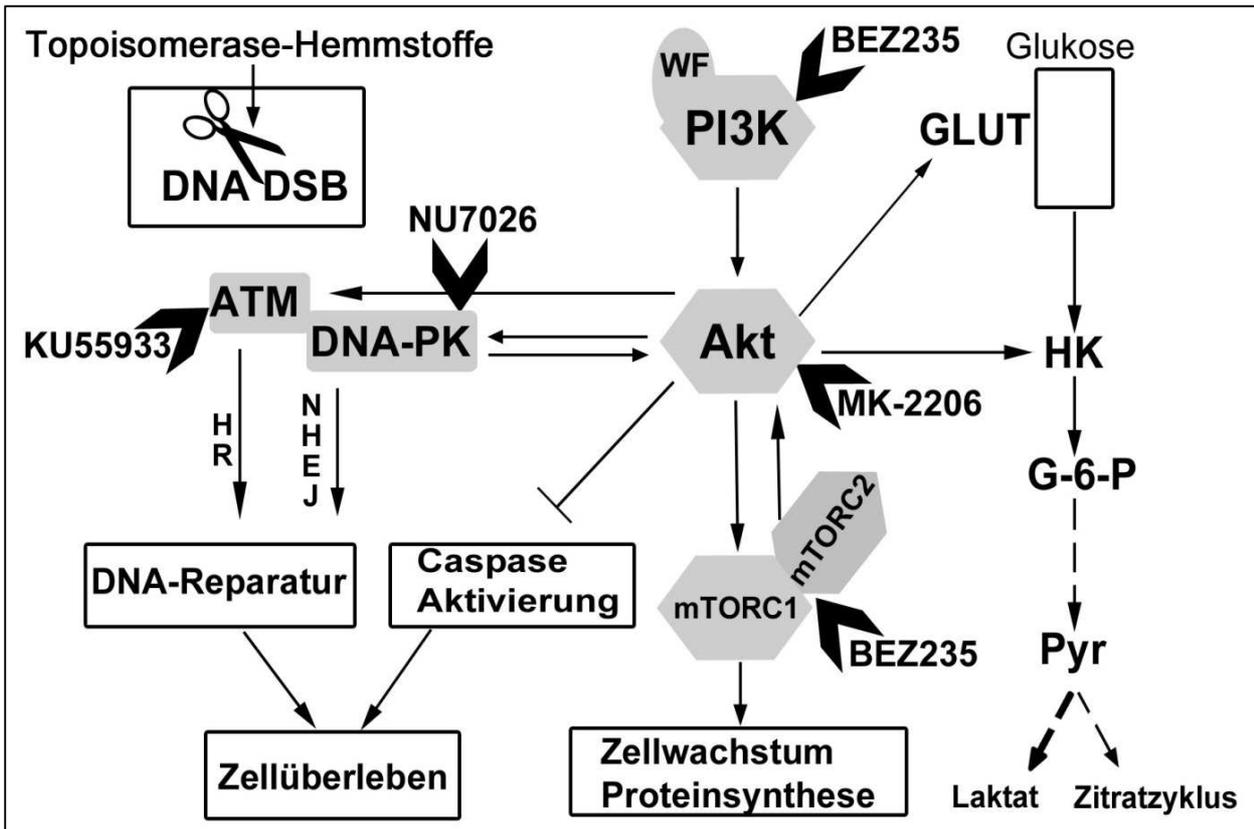
Bezüglich des Glukosemetabolismus konnte gezeigt werden, dass Akt die Expression von Glukosetransportern und glykolytischer Enzyme reguliert und so das Tumorzellüberleben verbessert (Rathmell, Fox et al. 2003, Wieman, Wofford et al. 2007). Außerdem fördert Akt direkt auf Ebene der Genexpression die aerobe Glykolyse und Laktatproduktion und kann in normalen wie auch malignen Zellen den Wechsel hin zum Warburg-Effekt induzieren (Elstrom, Bauer et al. 2004). Auch die oben bereits erwähnte anti-apoptotisch wirkende Bindung der Hexokinase II an die mitochondriale Membran ist eine Folge erhöhter Akt-Aktivität (Majewski, Nogueira et al. 2004).

Akt übt seine Wirkung maßgeblich über das Zusammenspiel mit dem mTOR-Komplex aus, der aus den Enzymen mTORC1 und mTORC2 besteht. mTORC1 misst über die AMP-aktivierte Kinase (AMPK) den Energiestatus der Zelle (AMP/ATP-Ratio) und kann so bei Mangelzuständen energieverbrauchende Synthesevorgänge stoppen. Eine Deregulation von Akt in Tumorzellen kann helfen, hohe ATP-Level in der Zelle zu generieren und eine mTOR-Inhibition zu umgehen, wodurch eine hohe Nährstoffzufuhr für anabole Prozesse aufrechterhalten werden kann (Edinger and Thompson 2002). Allerdings macht dies Akt-überexprimierende Zellen abhängig von konstanter Glukosezufuhr, da sie z.B. keine Energie mehr aus anderen katabolen Vorgängen wie der Fettsäureoxidation gewinnen können (Buzzai, Bauer et al. 2005).

Auch für diverse Zelllinien des multiplen Myeloms (besonders für OPM-2) wurde eine erhöhte Aktivität des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs gezeigt (Hsu, Shi et al. 2001, Pene, Claessens et al. 2002) und nachgewiesen, dass molekulare Inhibitoren dieser Kaskade (z.B. BEZ235) bei der Behandlung des Myeloms effektiv sein können (Baumann, Mandl-Weber et al. 2009).

Neuere Studienergebnisse deuten an, dass Akt auch zusätzlich einen Einfluss auf die DNA damage response ausüben kann. Es wurde gezeigt, dass Akt im Zuge von DNA-Doppelstrangbrüchen in DNA-PKcs oder ATM/ATR-abhängiger Weise aktiviert wurde und die

Reparatur dieser DNA-Schäden über eine Stimulation der nichthomologen, sequenzspezifischen Rekombination (NHEJ) unterstützte (Xu, Lao et al. 2012). Akt vermittelt dadurch möglicherweise die Interaktion der DNA damage response mit wichtigen Faktoren des Glukosestoffwechsels und Warburg-Effekts, was neue therapeutische Optionen eröffnen könnte (siehe Abb. 1).



**Abbildung 1** Schematische Darstellung wichtiger Bestandteile der Glykolyse (rechts), des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs (mittig), der DNA damage response (links) und verwendeter molekularer Inhibitoren. Es soll verdeutlicht werden, wie diese Signalfade untereinander verknüpft sind und wie Tumorzellen ihren Glukosemetabolismus in Reaktion auf genotoxischen Stress regulieren könnten. (→) steht für Aktivierung, (⊥) steht für Hemmung des entsprechenden Vorgangs. Es sind auch die im Verlauf eingesetzten Inhibitoren mit ihren Zielenzymen eingetragen (BEZ235, KU55933, MK-2206, NU7026).

## 2. Problemstellung und Zielsetzung

Viele Patienten, die an einem multiplen Myelom erkranken, erhalten entsprechend der Leitlinien eine Hochdosischemotherapie. Um das Therapieansprechen zu beurteilen oder auch metastatische Herde zu entdecken, werden moderne Bildgebungsverfahren wie das  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET eingesetzt. Dabei ist die Interferenz vieler Zytostatika mit dem Glukosemetabolismus der Tumorzellen weitestgehend unbekannt. Gerade bei potentiell DNA-schädigenden Medikamenten liegt die Vermutung nahe, dass Tumorzellen über eine vermehrte glykolytische Aktivität und daraus resultierender ATP-Produktion versuchen, DNA-Strangschäden zu reparieren und dadurch einen Überlebensvorteil zu erzielen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich deshalb mit folgenden Fragestellungen:

- Wie ist der Glukosestoffwechsel in Myelomzellen des Typs OPM-2 reguliert?
- Gibt es einen Unterschied in der Modulation des Glukosemetabolismus zwischen DNA-schädigenden Topoisomerase-Hemmern (1) und Medikamenten mit anderer Wirkweise (2)?
- Welche Dosis-Wirkungs-Beziehung haben die beiden unterschiedlichen Zytostatika-Gruppen (1+2) auf das Zellüberleben von OPM-2?
- Welche Auswirkung hat eine Zytostatika-Kombination aus (1) und (2) auf Glukoseaufnahme und Zellvitalität?
- Hängt der Zelltod mit Veränderungen in der Expression von Glukosetransportern und glykolytischer Enzyme zusammen?
- Welche Bedeutung hat eine Hemmung von Enzymen der DNA damage response auf die Zellvitalität und den Glukosestoffwechsel in OPM-2?
- Lassen sich durch Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR- Signalwegs Veränderungen im Glukosestoffwechsel und Zellüberleben der OPM-2 induzieren?
- Hat eine Kombination dieser Inhibitoren mit Topoisomerase-Hemmern synergistische Effekte auf Zelltod und Glukosestoffwechsel in OPM-2?

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Zelllinie**

Bei der eingesetzten Zelllinie (OPM-2) handelte es sich um humane, maligne Myelom-Suspensionszellen (aus dem Bestand von T. Dechow, Technische Universität München).

#### **3.1.2 Radioaktive Substanz**

Die Produktion der mit  $^{18}\text{F}$  Fluor versehenen, radioaktiven Fluordesoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) erfolgte im Zyklotron der Nuklearmedizinischen Klinik, Technische Universität München (Halbwertszeit  $^{18}\text{F}$ -FDG: 109,71min). Für die Versuche wurde stets die Aktivitätskontrolle der täglichen Zyklotron-Produktion bestellt, in einer Größenordnung von 1-1,5 GBq (etwa 27-40mCi). Die letztendlich benötigte Konzentration für die einzelnen Proben in den  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahmeversuchen betrug jeweils 370kBq (10 $\mu$ Ci).

#### **3.1.3 Zytostatika**

Die verwendeten Zytostatika wurden von der Apotheke des Klinikums rechts der Isar bereitgestellt. Es handelte sich dabei um gebrauchsfertige Lösungen von Bortezomib, Topotecan, Vincristin (Ausgangskonzentration je 1 mg/ml), Doxorubicin (Ausgangskonzentration 2 mg/ml) und Etoposid (Ausgangskonzentration 10 mg/ml). Die in den diversen Versuchsreihen eingesetzten Konzentrationsmessbereiche betragen maximal für Bortezomib: 1,953125 ng/ml - 2000 ng/ml, für Doxorubicin: 0,03125  $\mu$ g/ml - 32  $\mu$ g/ml, für Etoposid: 0,3125  $\mu$ g/ml - 640  $\mu$ g/ml, für Topotecan: 0,0125  $\mu$ g/ml - 12,8  $\mu$ g/ml und für Vincristin: 0,4882815 ng/ml - 1000 ng/ml.

#### **3.1.4 Chemikalien**

s. Kapitel 7, Tab.7.1

#### **3.1.5 Geräte**

s. Kapitel 7, Tab.7.2

### **3.1.6 Software**

s. Kapitel 7, Tab.7.3

### **3.1.7 Verbrauchsmaterial**

s. Kapitel 7, Tab.7.4

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur**

Zur Versuchsvorbereitung wurden die OPM-2 Zellen unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Arbeitsbank behandelt. Die Kulturflaschen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5,0% CO<sub>2</sub> gelagert.

Als Kulturmedium für die Zellzucht der OPM-2-Zellen wurde RPMI-1640 verwendet und mit fetalem Kälberserum (FKS) 10%, Penicillin/Streptomycin 1% und L-Glutamin 1% versetzt. Das Medium wurde stets im Wasserbad auf 37° erwärmt. Ein Wechsel des Mediums in den Kulturflaschen erfolgte, wenn sich ein Farbumschlag des roten Mediums ins Gelbliche einstellte. Bei einer Verdopplungszeit der OPM-2 Zellen von etwa 50-60 Stunden war dies ca. alle drei Tage nötig.

### **3.2.2 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstestung**

Die Zellzahl und die Zellvitalität wurden mithilfe des digitalen Countess® Automated Cell Counter bestimmt. Hierfür wurden 10 µl der jeweiligen Probe mit 10 µl Trypanblau 0,4% gemischt und je 10 µl dieser Zellsuspension in eine vorgefertigte Zählkammer pipettiert. Das digitale Gerät lieferte Angaben über die Anzahl der lebenden (Membran intakt, helles Zentrum) und toten Zellen (starke, dunkle Anfärbung) und ermittelte deren prozentuale Verteilung, wobei für die <sup>18</sup>F-FDG-Versuche nur die Anzahl der lebenden Zellen relevant war. Das Gerät lieferte die genauesten Ergebnisse für Zelldurchmesser von 5-60 µm in einem Bereich von 1x10<sup>4</sup>- 1x10<sup>7</sup> Zellen/ml. Es wurden für jede Versuchsanordnung stets mindestens drei Proben einer Konzentrationsstufe ausgezählt und daraus der Mittelwert berechnet. Die Präzision des Gerätes wurde durch stichprobenartige Gegenkontrollen der Proben mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestätigt.

### 3.2.3 Herstellung der Verdünnungsreihen

Zur Herstellung der Verdünnungsreihen wurden die unter 3.1.3 genannten Zytostatika verwendet. Die Verdünnungsreihen wurden durch fortgesetztes Verdünnen erstellt (geometrische Verdünnung). Dazu wurde eine Stammlösung mit der höchsten Ausgangskonzentration erstellt. In alle anderen Gefäße wurde je eine gleichdefinierte Menge an Medium RPMI1640 vorgelegt. Das exakt gleiche Volumen wurde nun aus der Ausgangslösung in das erste Gefäß überführt (1:1 Verdünnung), so dass dieses nur noch die halbe Konzentration der vorhergehenden Stammlösung aufwies. Die zweite Verdünnungsstufe besaß dann nur noch ein Viertel der Ausgangskonzentration usw. Dieses Vorgehen wurde unter stetigem Suspendieren der einzelnen Proben durchgeführt.

### 3.2.4 $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahmeversuche

Zur Durchführung der Aufnahmeversuche wurde zunächst gemäß 3.2.3 eine Verdünnungsreihe des jeweiligen Zytostatikums inklusive unbehandelter Kontrolle hergestellt. Es wurden pro Verdünnung je 250  $\mu\text{l}$  Zytostatikalösung in eine 24-Wellplatte vorgelegt (Vierfachwerte).

Im nächsten Schritt wurden etwa 25-30 ml Zellsuspension einer Zellkulturflasche entnommen und die Zellzahl lebender Zellen gemäß 3.2.2 bestimmt. Nach Zentrifugation bei 1300 U/min wurde durch Hinzugabe frischen Mediums eine Suspension mit einer Zellkonzentration von  $8 \times 10^5/\text{ml}$  OPM-2 Zellen erstellt. Aus dieser Stammlösung wurden je 250  $\mu\text{l}$  in alle Wells pipettiert, so dass jedes Well letztendlich ein Gesamtvolumen von 500  $\mu\text{l}$  à  $2 \times 10^5$  OPM-2 Zellen enthielt. Die Konzentrationen der Zytostatika wurden durch den Verdünnungseffekt jeweils auf die gewünschten Endkonzentrationen halbiert. Anschließend wurden die Platten für 24 Stunden im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Aus diesen wurden dann je 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension für die spätere Zellzahlbestimmung entnommen. Die restlichen Zellsuspensionen wurden bei 3000 U/min für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die so gewonnenen Zellpellets wurden mit 500  $\mu\text{l}$  PBS einmal gewaschen und einer erneuten Zentrifugation zugeführt. Nun wurden den Pellets je 100  $\mu\text{l}$  PBS zugefügt und die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Lösung hergestellt.

Dazu wurde hinter Bleischutz die Grundaktivität aus dem Zyklotron in PBS verdünnt und die neue Aktivität gemessen. Aus dieser Größe wurde dann das benötigte Volumen an  $^{18}\text{F}$ -FDG für circa 50-60 Proben à 370 kBq (10  $\mu\text{Ci}$ ) berechnet und in PBS verdünnt. Aus diesem Gemisch wurden mit einer Multipipette je 100  $\mu\text{l}$   $^{18}\text{F}$ -FDG-Lösung auf alle Zellsuspensionen verteilt, so

dass jede Zellprobe (200  $\mu$ l) eine  $^{18}\text{F}$ -FDG-Konzentration von je 185 kBq (5  $\mu$ Ci) enthielt. Die Proben wurden gevortext und für 30 Minuten in den Inkubator (37°C) gestellt. Es wurden für jeden Versuch vier Standards (Aktivität ohne Zellen) angesetzt. Diese bestanden aus einer 1:10-Verdünnung der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Stammlösung. Außerdem wurden je vier Leerwerte angesetzt (Behandlung wie Zellproben), die als Hintergrundaktivität von den späteren Messergebnissen der Zellproben subtrahiert wurden.

Nach Inkubation wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme durch Hinzugabe von 1 ml eiskaltem PBS weitestgehend zu beenden. Es schlossen sich drei „Waschvorgänge“ an: diese bestanden aus der Zentrifugation der Proben bei 3000 U/min bei 4°C, anschließendem Absaugen des Überstands und einem Resuspendieren in eiskaltem PBS. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt, um den radioaktiven Zerfall zu verlangsamen. Das Absaugen des Überstands geschah hinter Bleischutz mittels einer speziellen Absaugpipettenspitze, die ein sicheres Absaugen ohne Affektion der Zellpellets gewährleistete. Die behandelten Pellets wurden schließlich dem  $\gamma$ -Counter zugeführt und so die von den OPM-2 aufgenommene Menge an  $^{18}\text{F}$ -FDG als counts per minute (cpm) gemessen.

Währenddessen wurde die Anzahl der lebenden Myelomzellen je Zytostatika-Konzentrationsstufe bestimmt. Aus den Vierfachwerten wurde der Mittelwert mit Standardfehler (SEM) gebildet. Die Messwerte des  $\gamma$ -Counters wurden durch diesen Mittelwert geteilt und stellten die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme je vitaler Zelle dar. Es fand eine Normierung auf den  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake der unbehandelten Kontrolle statt. Die Aufnahme der Kontrolle erhielt so den Wert eins und die Aufnahmen der Konzentrationsstufen bezogen sich auf diese als Bruchteil bzw. Vielfaches davon (f.c. = fold control).

### 3.2.5 Vitalitätsmessung

Zur Etablierung eines Konzentrationsmessbereichs der verwendeten Zytostatika führten wir den CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay durch. Es wurde ein weitgefaster Konzentrationsverlauf gewählt, um einen möglichst sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Bereich mit Plateaus gen 100% bzw. 0% Vitalität abzubilden.

Beim CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay wird nach Zelllyse die Menge an freigesetztem ATP durch das katalysierende Enzym Luciferase als Luminiszenzsignal photometrisch messbar. Die Intensität des Signals ist direkt proportional zur Menge des vorhandenen ATP und damit zur Anzahl der lebenden Zellen.

Es wurden Vierfachwerte einer Zytostatika-Verdünnungsreihe plus Kontrolle mittels Multichannel-Pipette ausgesät und für 24 Stunden in 96-Wellplatten inkubiert. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 180µl und setzte sich aus 90µl Zytostatika-Lösung und 90 µl OPM-2-Suspension zusammen. Die Zellzahl pro Well betrug  $2 \times 10^5$  Zellen ( $2,2 \times 10^5$  Zellen/ml).

Am nächsten Tag wurden der CellTiter-Glo® Buffer und das CellTiter-Glo® Substrat (-20°C) zwei Stunden vor Anwendung bei Raumtemperatur erwärmt. Danach wurden beide Reagenzien zusammengeführt und mittels Multichannel-Pipette je 50 µl in eine lichtundurchlässige (zur Verminderung der Streuluminiszenz) 96-Wellplatte vorgelegt. Im Verhältnis 1:1 wurden die inkubierten Proben hinzugegeben und auf einem Shaker für 10 Minuten lysiert.

Die photometrische Messung des ATP-Gehalts erfolgte in einem Mikroplatten Reader. Die Berechnung und Auswertung der Überlebenskurve erfolgte unter Ermittlung der Mittelwerte des Luminiszenzsignals der einzelnen Konzentrationen in Bezug auf die Kontrolle, die als Vitalität mit 100% definiert wurde. Die Berechnung des IC<sub>50</sub>- Wertes (mittlere Hemmkonzentration) erfolgte mittels nicht-linearer Regression in Graphpad Prism 5.

### 3.2.6 Western Blotting (Wet-Transfer der Proteine)

#### 3.2.6.1 Vorbereitung der Zellen

Zunächst wurde gemäß 3.2.3 eine Zytostatika-Verdünnungsreihe inklusive Kontrolle hergestellt. Es wurden den Kulturflaschen für jede Probe 25-30 ml OPM-2 Suspensionslösung entnommen, diese bei 1300 U/min für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die vorhandenen Zellpellets wurden in 2-3 ml RPMI1640-Medium suspendiert und in einem Gefäß vereint. Aus dieser Stammlösung wurde gemäß 3.2.2. der Mittelwert der lebenden Zellen pro Milliliter bestimmt. Die Stammlösung wurde erneut bei obigen Bedingungen zentrifugiert und mit dem errechneten Volumen an Medium aufgefüllt (Zielkonzentration:  $1 \times 10^7$  Zellen/ml). Nachfolgend wurde je 1 ml dieser Zellsuspension in die vorbereiteten Zytostatika-Lösungen à 9 ml überführt (1:10-Verdünnung). Dieses Gemisch wurde in Zellkulturflaschen der Größe  $75\text{cm}^2$  überführt und für 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  über Nacht inkubiert.

#### 3.2.6.2 Proteinextraktion

Nach der 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen in 15 ml Falcons überführt und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dann in einer auf  $4^\circ\text{C}$  vorgekühlte Zentrifuge bei 1300 U/min zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets wurden nachfolgend dreimal mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach letztmaliger Zentrifugation wurde der PBS-Überstand sorgfältig abgesaugt und das Zellpellet mit dem Lysepuffer versehen. Es handelte sich um gebrauchsfertigen 10x RIPA Zell-Lysepuffer (0,5M Tris-HCl, 1,5M NaCl, 2.5% Deoxycholsäure, 10% NP-40, 10mM EDTA), der zuvor 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und mit einer Proteaseinhibitor-Tablette versetzt wurde. Pro Zellpellet wurden etwa 100 - 200  $\mu\text{l}$  Lysepuffer ( $4^\circ\text{C}$ ) hinzugegeben und die Suspension stark gevortext. Die Proben wurden zur Lyse für 30-40 Minuten auf Eis gelagert (unter regelmäßigem vortexen), bis es zu einer sichtbaren Trennung von DNA und Plasmabestandteilen kam. Anschließend wurden die Proben in 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt und bei maximal 14800 U/min für 20 Minuten ( $4^\circ\text{C}$ ) zentrifugiert. Der klare, proteinreiche Überstand wurde in neue 1,5 ml Eppendorf-Cups pipettiert und der Proteinbestimmung zugeführt.

### 3.2.6.3 Quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung der Lysate erfolgte kolorimetrisch mittels eines BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Kit auf einer 96-Well-Plate. Zur Ermittlung der Eichkurve wurde eine BSA (Bovines Serum Albumin) Standardreihe erstellt (mit 0 [Leerwert]; 25; 125; 250; 500; 750; 1000; 1500; 2000  $\mu\text{g/ml}$ ; Volumen: je 10  $\mu\text{l}$ ). Ebenso wurden je 10  $\mu\text{l}$  der Lysate vorgelegt und alle Proben in 200  $\mu\text{l}$  der beiden beigefügten Reagenzsubstrate suspendiert. Es schloss sich eine halbstündige Inkubation der Platte bei 37°C an. Anschließend wurde die Platte auf Raumtemperatur gekühlt

Die Extinktionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 570 nm im Mikroplatten Reader. Mit den ermittelten Werten für die BSA-Konzentrationen wurde in Excel eine Kalibrationskurve erstellt und eine polynomische Gleichung errechnet. In diese wurden (nach Subtraktion des Leerwerts) die Extinktionswerte der Lysatproben eingefügt. So ermittelte sich die je Probe vorhandene Proteinkonzentration in  $\mu\text{g/ml}$ . Die letztendlich zu ladende Proteinmenge in der Gelelektrophorese wurde auf 15- 20  $\mu\text{g}$  festgelegt. Es wurde dann ein Vielfaches der jeweiligen Einzelprobe entnommen und mit der entsprechenden Menge 5x SDS-Sample-Buffer (312,5mM Tris, 250mM DTT, 10% SDS 0,05% Bromphenol Blau, 50% Glycerol, pH 6,8) ergänzt. Diese Proben wurden dann für 5-10 Minuten bei 95° erhitzt. Hierauf erfolgte entweder eine sofortige SDS-Gelelektrophorese oder die Lagerung der Lysate bei -20°C.

### 3.2.6.4 SDS-Gelelektrophorese

Die für die Gelelektrophorese benötigten Gele wurden meist tags zuvor gegossen und zur Aushärtung in den Kühlschrank gelegt (Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8%, 1 M TrisCl mit pH 8,8, 1 M TrisCl mit pH 6,8, SDS 10 %, APS, TEMED). Die Gele (meist 10-12,5 % Acrylamid-Gele) wurden in die Elektrophoresekammern eingeklemmt und die innere und äußere Kammer mit kaltem SDS-Laufpuffer (250 mM Tris, 1,96 M Glycin, 1% SDS) bis zur Markierung gefüllt. Nach Freispülen der Geltaschen wurden die Gele mit den berechneten Volumina der Lysate beladen. Es wurden stets 5  $\mu\text{l}$  eines Größenstandards für Proteine (Page Ruler) geladen, so dass die Auftrennung der Proteine nach Molekülgröße farblich kenntlich gemacht wurde. Die iontophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte für etwa 10 Minuten bei 80-100 Volt, bevor für die restliche Laufzeit eine Spannung von ca. 150V angelegt wurde. Die Laufzeit betrug meist etwa 120-150 Minuten. Danach wurden die beiden Gelkammern vorsichtig eröffnet und direkt in den Transferpuffer (48 mM TRIS, 39 mM Glycin, 20% Methanol) überführt.

### 3.2.6.5 Transferblot

Der Transfer der aufgetrennten Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte im „Wet-Blot“-Verfahren. Die PVDF-Membran wurde nach Maßgabe der Gelgröße zurechtgeschnitten und 1 Minute in Methanol inkubiert. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser erfolgte eine etwa 10-minütige Inkubation der Membran im Transferpuffer. In der Zwischenzeit wurden Schwämme und Blot-Papier im Transferpuffer getränkt. Es erfolgte das Zusammensetzen des „Blot-Sandwichs“ in folgender Reihenfolge (von Kathode zur Anode): Schwamm – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier – Schwamm. Um eine Luftblasenbildung zwischen den Schichten zu vermeiden, wurde das „Sandwich“ mit einem Falcon-Gefäß ausgerollt. Der fertig zusammengesetzte Blot wurde in die Blotkammer unter Achtung der elektrischen Orientierung gesetzt und die Kammer mit eiskaltem Transferpuffer aufgefüllt. Um eine übermäßige Hitzeentwicklung zu verhindern, wurde die Kammer mit einer Kühleinheit und einem Rührfisch versehen. Es wurde eine konstante Stromstärke von ca. 150-200 mA für etwa 1 Stunde angelegt. Der Erfolg des Transfers konnte anhand des auf die Membran übertragenen, farbigen Größenmarkers abgeschätzt werden. Bei Bedarf wurden die Gele mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt oder eine Ponceau S-Färbung der Membran vorgenommen.

### 3.2.6.6 Inkubation mit Antikörpern und Entwicklung

Zunächst wurde der Waschpuffer TBST (1x TBS, 0,1% Tween-20) aus 10x TBS (20 mM Tris, 80g NaCl, pH 7,6) hergestellt. Die geblottete Membran wurde für 5x5 Minuten in TBST gewaschen. Danach erfolgte das „Blocken“ der Membran in 5% Magermilchpulver bzw. BSA 3-5%, um unspezifische Bindungen zu vermeiden und den Hintergrund bei der späteren Entwicklung zu verringern. Nach einem kurzen Waschvorgang in TBST, wurde die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert. In den meisten Fällen geschah dies in 5-10 ml-Magermilch-Lösung bei 4°C über Nacht im Rollentaumelmischer.

Am nächsten Tag wurde die inkubierte Membran auf dem Rüttler in TBST für 5x5 Minuten gewaschen. Nun wurde der sekundäre Antikörper (polyklonaler, peroxidase-konjugierter Antikörper gegen Maus oder Kaninchen) im Verhältnis 1:10000 appliziert und die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten mehrstufigen Waschvorgang in TBST wurde die Membran entwickelt. Dazu wurde die Membran in einer ECL (enhanced chemiluminescence)-Lösung für 1 min inkubiert. Die durch das ECL katalysierte Farbreaktion

wurde mithilfe einer CCD-Kamera (ChemiDoc™ XRS+ System) digital dargestellt. Die Intensität der dargestellten Banden entsprach der Konzentration an exprimiertem Protein. Als Ladekontrolle wurde  $\alpha$ -Tubulin eingesetzt (für Spezifität und Verdünnung der primären Antikörper s. Tab 1)

**Tab. 1:** Liste der verwendeten primären Antikörper

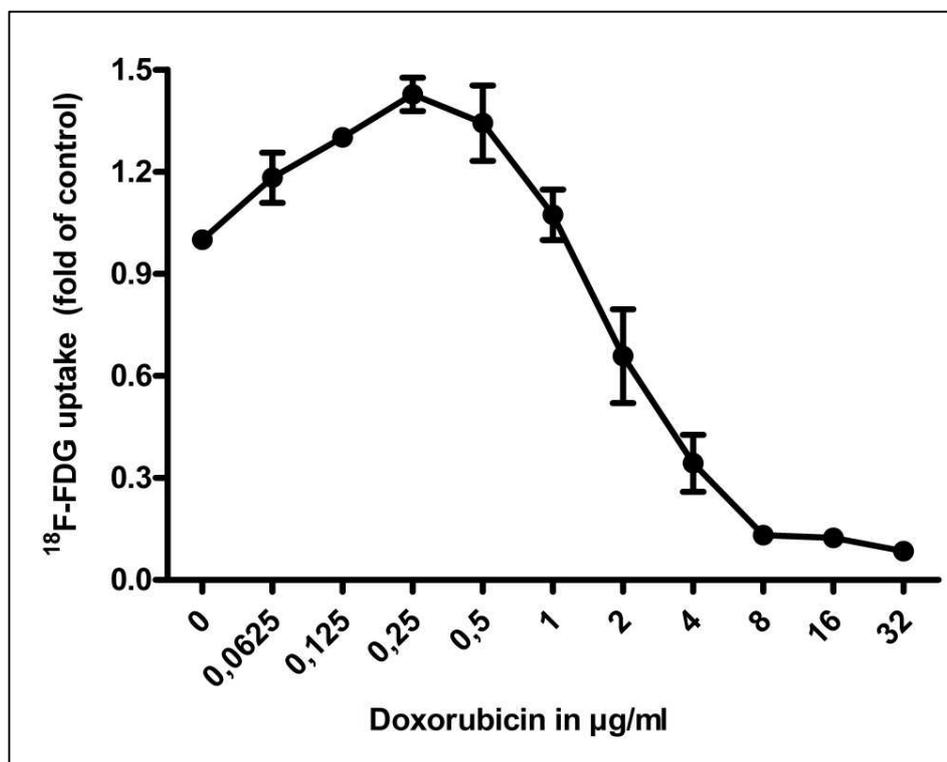
<b>Primäre Antikörper gegen</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Molekulargewicht</b>
Kaninchen –anti Mensch, monoklonal <b>GLUT-1</b>	<b>1 : 200</b>	<b>50 kDa</b>
Kaninchen –anti Mensch, polyklonal <b>Hexokinase II</b>	<b>1 : 5000</b>	<b>102 kDa</b>
Kaninchen –anti Mensch, polyklonal <b>(Cleaved) PARP-1</b>	<b>1 : 1000</b>	<b>116 kDa; 89kDa</b>
Kaninchen –anti Mensch, monoklonal <b>(Cleaved) Caspase-3</b>	<b>1 : 1000</b>	<b>19 kDa; 17kDa</b>
Maus –anti Mensch, monoklonal <b><math>\alpha</math>-Tubulin</b>	<b>1 : 2000</b>	<b>50kDa</b>

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod für DNA-schädigende Substanzen

#### 4.1.1 Doxorubicin

##### 4.1.1.1 Untersuchung des Glukosestoffwechsels anhand der $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme



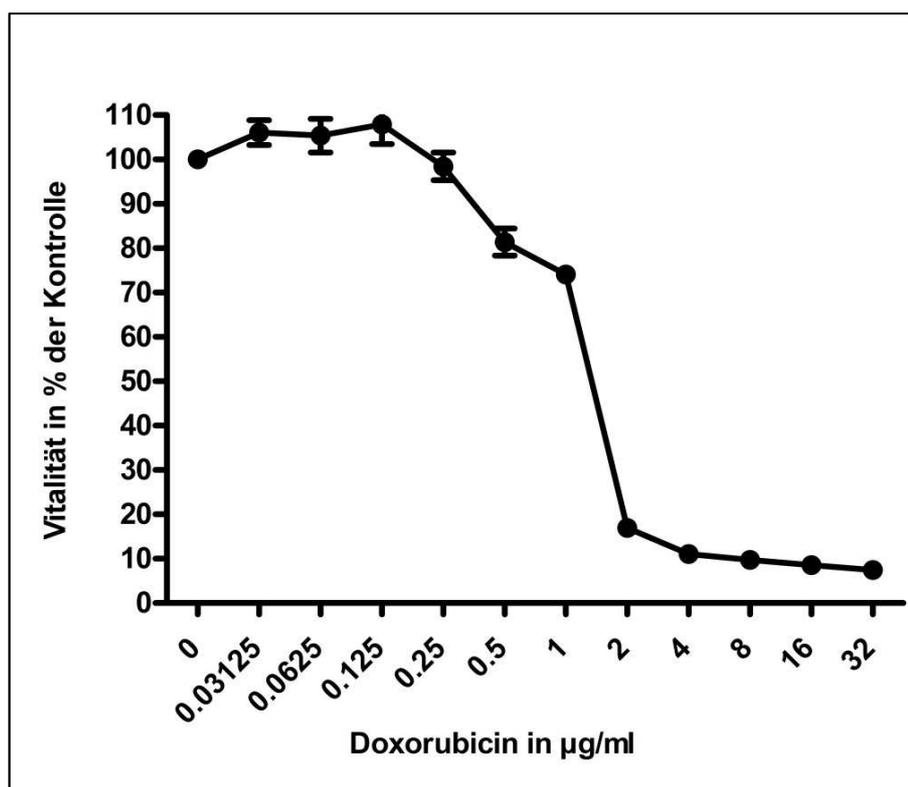
**Abbildung 2** Konzentrationsabhängige  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme (counts per minute) vitaler OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Doxorubicin. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme der unbehandelten Kontrolle (0) wurde auf den Wert 1 normiert und die der Konzentrationen als Vielfaches bzw. Bruchteil davon berechnet (fold of control). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Mittelwerte aus  $n=5$ .

Die  $^{18}\text{F}$ -FDG -Aufnahme der OPM-2 Zellen unter Behandlung mit Doxorubicin wurde für die Konzentrationen von 0  $\mu\text{g/ml}$ , 0,0625  $\mu\text{g/ml}$ , 0,125  $\mu\text{g/ml}$ , 0,25  $\mu\text{g/ml}$ , 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$ , 8  $\mu\text{g/ml}$ , 16  $\mu\text{g/ml}$ , 32  $\mu\text{g/ml}$  getestet. Die OPM-2 Zellen wurden mit dem Topoisomerase-Hemmstoff für 24 Stunden inkubiert.

Es zeigte sich für die ersten drei niedrigsten Konzentrationsstufen ein nahezu linearer Anstieg des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes von plus 18,2% (0,0625  $\mu\text{g/ml}$ ) auf 30,1% (0,125  $\mu\text{g/ml}$ ) bis zu einer maximalen Zunahme von plus 42,7% (0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) bezogen auf die Kontrolle. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  war mit einem  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake vom 1,07-fachen der Kontrolle in etwa der Ausgangswert wieder erreicht. Bis zu einer Konzentration von 8  $\mu\text{g/ml}$  nahm die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme stark ab und erreichte bei 32  $\mu\text{g/ml}$  einen minimalen  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake vom 0,085-fachen der Kontrolle.

**Zusammengefasst** ließ sich bei Doxorubicin eine Steigerung der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme im niedrigen Konzentrationsbereich von 0,0625- 0,25  $\mu\text{g/ml}$  beobachten. Dieser folgte eine fast lineare Abnahme  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme.

#### 4.1.1.2 Vitalitätsprüfung mittels ATP-Assay

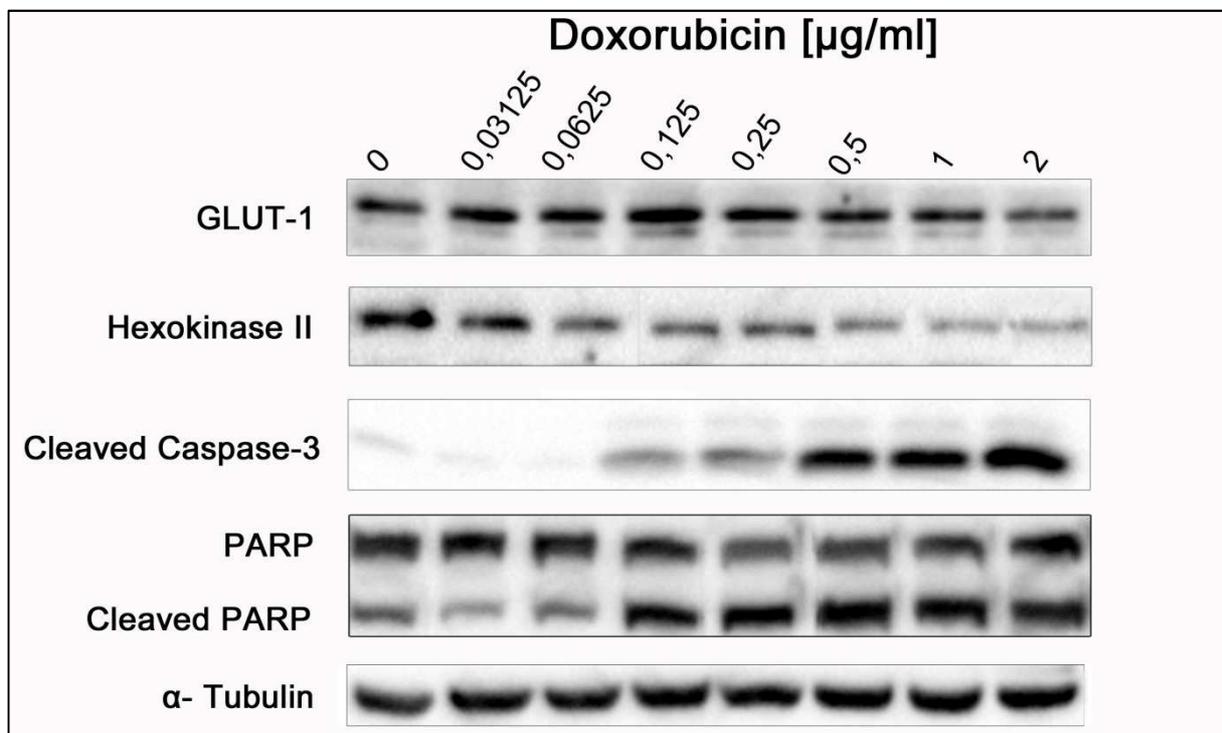


**Abbildung 3** Konzentrationsabhängige Überlebenskurve der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Doxorubicin. Mit dem CellTiter-Glo® wurde der ATP-Gehalt der Zellen kolorimetrisch bestimmt. Das Überleben der Kontrolle wurde als 100% festgesetzt. Werte über 100% bedeuten eine Zunahme, Werte unter 100% eine Abnahme des Überlebens. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus  $n=4$ . Dargestellt ist der Fehlerbalken als Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Zur Bestimmung der Zellvitalität der OPM-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Doxorubicin wurde der ATP-Assay mit folgenden Konzentrationen durchgeführt: 0 µg/ml, 0,03125 µg/ml, 0,0625 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml. In den geringsten Verdünnungsstufen zeigt sich kein inhibitorischer Einfluss des Doxorubicin auf das Zellüberleben. Bei 1 µg/ml betrug die Vitalität im Mittel noch 74,11 % der Kontrolle. Im Bereich zwischen 1 und 2 µg/ml kam es zu einem starken Abfall des Überlebens. Bei 2 µg/ml betrug die Vitalität im Mittel noch 17,95 % der Kontrolle. Der IC<sub>50</sub> für Doxorubicin wurde bei 1,29 µg/ml ermittelt mit einem 95 % -KI von 1,19 -1,41 µg/ml. Im weiteren Konzentrationsverlauf nahm das Überleben bis zu ein Minimum von 7,49 % der Kontrolle (bei 32 µg/ml) ab.

**Zusammenfassend** zeigte Doxorubicin im Bereich von 1-2 µg/ml die stärkste Dynamik mit einem starken Absinken der Vitalität. Sowohl in niedrigen als auch in hohen Konzentrationsstufen war der Kurvenverlauf eher statisch.

#### 4.1.1.3 Charakterisierung von Apoptose und Glukosestoffwechsel mittels Western Blot



**Abbildung 4** Proteinexpression von Markern des Glukosestoffwechsels (GLUT-1, Hexokinase II) und des Zelltods (PARP-1, CC3) nach 24-stündiger Behandlung mit Doxorubicin. 0 µg/ml bezeichnet die unbehandelte Kontrolle (Referenzwert). Eine Zunahme der Bandenintensität weist auf eine vermehrte Proteinexpression hin. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Ergebnisse wurden mindestens dreimal verifiziert.

Um die molekulare Basis der bisherigen Resultate für die Behandlung der OPM-2 mit Doxorubicin zu ermitteln (anfängliche Zunahme der  $^{18}\text{F}$ -FDG -Aufnahme, starker Abfall der Vitalität zwischen 1- 2 $\mu\text{g/ml}$ ), führten wir Western Blots von Markern des Zelltods und des Glukosemetabolismus durch. Dafür wurde ein Konzentrationsbereich von 0,03125 - 2  $\mu\text{g/ml}$  Doxorubicin ausgewählt.

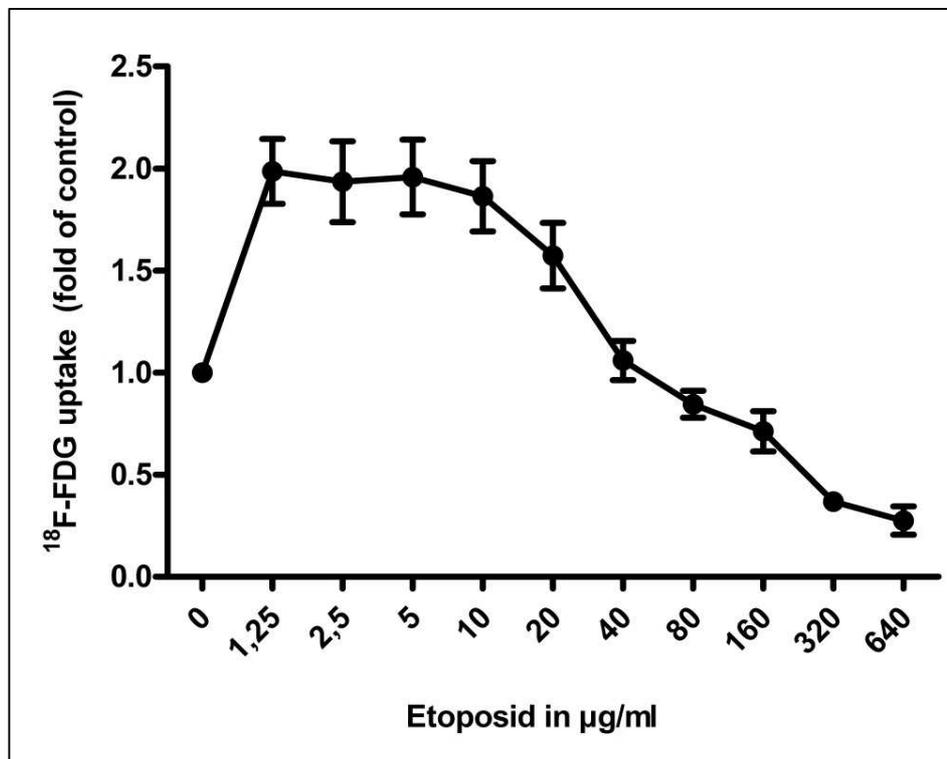
Der Glukosetransporter-1 (GLUT-1) wies in der unbehandelten Kontrolle eine deutliche Expression auf. Im weiteren Konzentrationsverlauf war keine merkliche Abschwächung der Expression zu erkennen. Das Intensitätsmaximum lag bei etwa 0,125 - 0,25  $\mu\text{g/ml}$ . Ab der letzten Konzentrationsstufe (2  $\mu\text{g/ml}$ ) sank die Expression etwas unter Ausgangsniveau.

Die Hexokinase II war ebenfalls in der Kontrolle gut exprimiert. Dies zeigte sich auch für die beiden ersten Konzentrationen, während nachfolgend ein leichter Intensitätsverlust einsetzte. Die Spaltung des PARP-1 Komplexes setzte ab 0,125  $\mu\text{g/ml}$  ein und nahm dosisabhängig bis zur höchsten Konzentrationsstufe zu. Die Spaltung der Caspase-3 wurde ebenfalls ab einer Konzentration von 0,125  $\mu\text{g/ml}$  evident und war ab 0,5  $\mu\text{g/ml}$  erheblich.

**Insgesamt** zeigten OPM-2 Zellen nach Inkubation mit Doxorubicin in fast allen getesteten Konzentrationen eine unverändert hohe Expression von GLUT-1. Im Vergleich dazu zeigte Hexokinase II eine leichte, dosisabhängige Herunterregulation. Die Abschwächung der HK II korrelierte mit der Spaltung von Caspase-3 und PARP.

## 4.1.2 Etoposid

### 4.1.2.1 Untersuchung des Glukosemetabolismus anhand der $^{18}\text{F}$ -FDG -Aufnahme



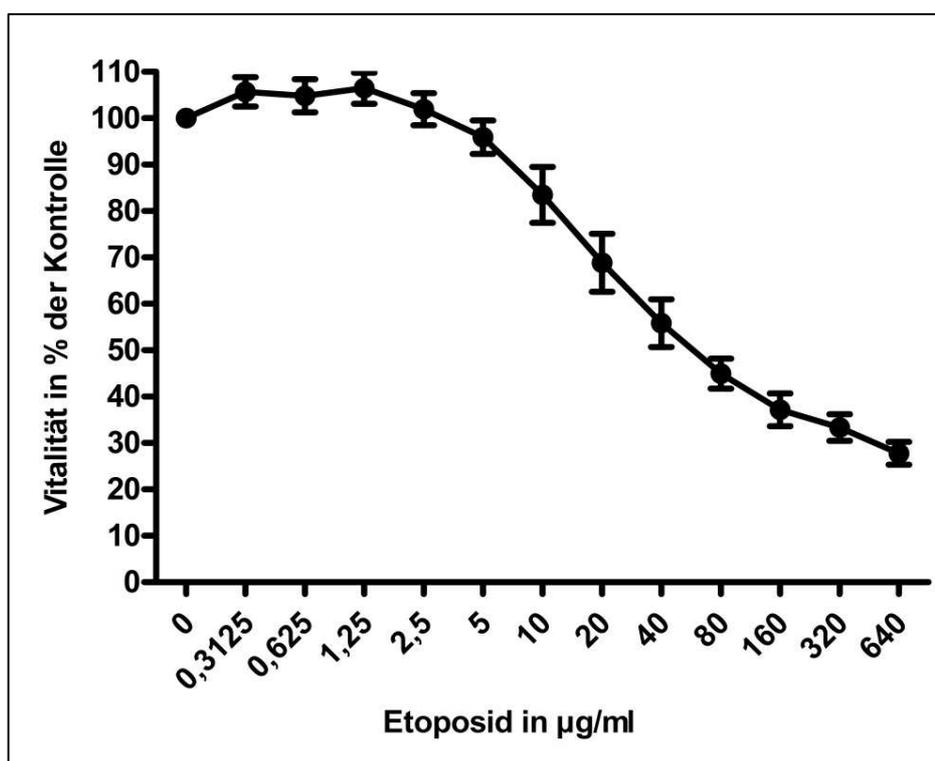
**Abbildung 5** Konzentrationsabhängige  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme (counts per minute) vitaler OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Etoposid. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme der unbehandelten Kontrolle ( $0\mu\text{g/ml}$ ) wurde auf den Wert 1 normiert und die der Konzentrationen als Vielfaches bzw. Bruchteil davon berechnet (fold of control). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Mittelwerte aus  $n=5$ .

Für die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahmeversuche nach 24-stündiger Inkubation der OPM-2 Zellen mit Etoposid wurden folgende Konzentrationen gemessen:  $0\mu\text{g/ml}$ ,  $1,25\mu\text{g/ml}$ ,  $2,5\mu\text{g/ml}$ ,  $5\mu\text{g/ml}$ ,  $10\mu\text{g/ml}$ ,  $20\mu\text{g/ml}$ ,  $40\mu\text{g/ml}$ ,  $80\mu\text{g/ml}$ ,  $160\mu\text{g/ml}$ ,  $320\mu\text{g/ml}$  und  $640\mu\text{g/ml}$ .

Die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme lag in den ersten fünf niedrigsten Konzentrationen deutlich über dem Kontrollwert. Die prozentuale Steigerung des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake lag für die Konzentrationen von  $1,25$ - $20\mu\text{g/ml}$  bei je folgenden Werten: plus 98,7%, 93,5%, 95,8%, 86,4% und 57,2%. An der Konzentrationsstufe von  $20$  auf  $40\mu\text{g/ml}$  ergab sich eine signifikante Abnahme des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes. Bei  $40\mu\text{g/ml}$  war mit einem  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake vom 1,05-fachen der Kontrolle das Ausgangsniveau erreicht. Danach nahm die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme stetig ab bis zum 0,28-fachen der Kontrolle bei der Höchstkonzentration ( $640\mu\text{g/ml}$ ).

**Insgesamt** zeigten die OPM-2 Zellen unter Etoposid Behandlung einen starken Anstieg der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme, die für die ersten drei Verdünnungsstufen bei etwa dem 2-fachen des Ausgangswerts lag. Danach erfolgte eine relativ langsame Abflachung der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahmekurve.

#### 4.1.2.2 Vitalitätsprüfung mittels ATP-Assay



**Abbildung 6** Konzentrationsabhängige Überlebenskurve der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Etoposid. Mit dem CellTiter-Glo® wurde der ATP-Gehalt der Zellen kolorimetrisch bestimmt. Das Überleben der Kontrolle wurde als 100% festgesetzt. Werte über 100% bedeuten eine Zunahme, Werte unter 100% eine Abnahme des Überlebens. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus  $n=4$ . Dargestellt ist der Fehlerbalken als Standardfehler der Mittelwerte (SEM).

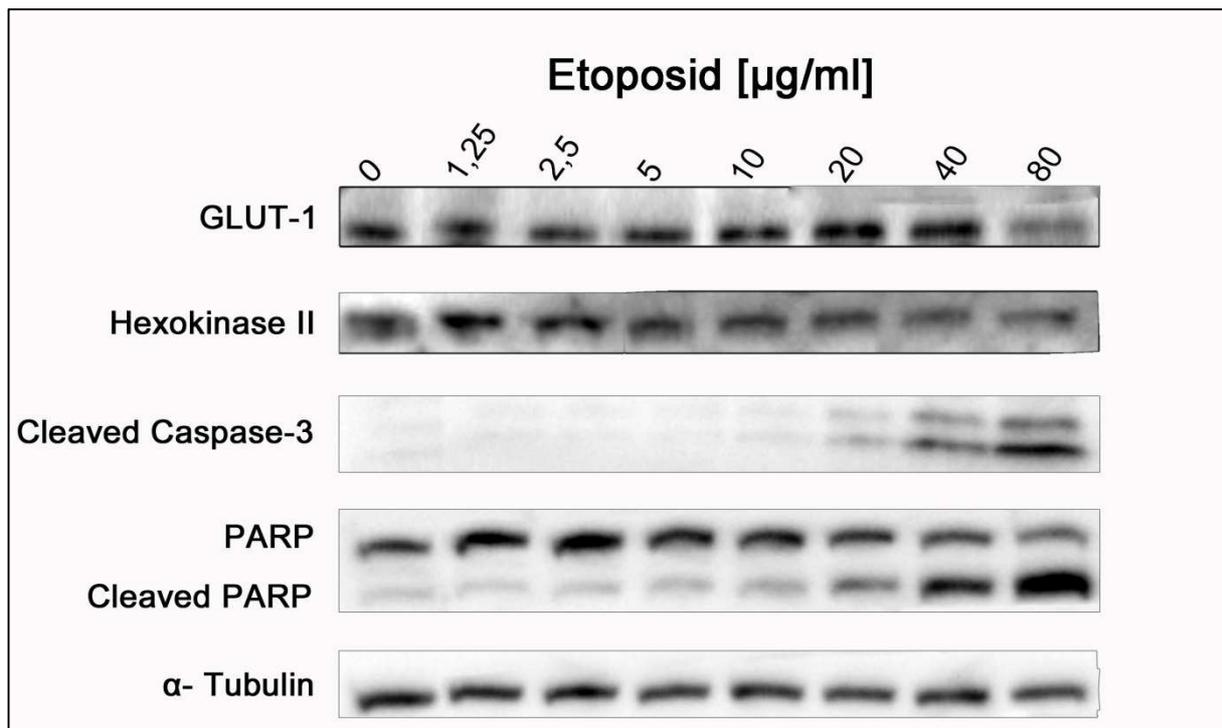
Die Vitalitätstestung der OPM-2 Zellen nach Inkubation mit Etoposid erfolgte nach 24 Stunden durch Messung des vorhandenen ATP nach Zelllyse. Folgende Konzentrationen wurden betrachtet: 0  $\mu\text{g/ml}$ , 0,3125  $\mu\text{g/ml}$ , 0,625  $\mu\text{g/ml}$ , 1,25  $\mu\text{g/ml}$ , 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$ , 80  $\mu\text{g/ml}$ , 160  $\mu\text{g/ml}$ , 320  $\mu\text{g/ml}$  und 640  $\mu\text{g/ml}$ .

Es zeigte sich ein flacher, sigmoidaler Abfall der Vitalitätskurve ab 5  $\mu\text{g/ml}$ . Die mittlere inhibitorische Hemmkonzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) lag bei 81,98  $\mu\text{g/ml}$  mit einem 95 %-KI von 66,07- 101,7

$\mu\text{g/ml}$ . Selbst in der höchsten Konzentration ( $640 \mu\text{g/ml}$ ) ließ sich das Überleben der OPM-2 „nur“ auf 27,76 % der Kontrolle senken.

**Insgesamt** war die Potenz des Topoisomerase-II-Hemmstoffs Etoposid auf das Überleben der OPM-2 Zellen als eher gering einzustufen. Eine asymptotische Annäherung an den Maximaleffekt konnte nicht erreicht werden.

#### 4.1.2.3 Charakterisierung von Apoptose und Glukosestoffwechsel mittels Western Blot



**Abbildung 7** Proteinexpression von Markern des Glukosestoffwechsels (GLUT-1, Hexokinase II) und des Zelltods (PARP-1, CC3) nach 24-stündiger Behandlung mit Etoposid.  $0 \mu\text{g/ml}$  bezeichnet die unbehandelte Kontrolle (Referenzwert). Eine Zunahme der Bandenintensität weist auf eine vermehrte Proteinexpression hin. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Ergebnisse wurden mindestens dreimal verifiziert.

Die Behandlung mit Etoposid hatte für die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme der OPM-2 eine deutliche Steigerung des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes für niedrige bis mittlere Konzentrationsbereiche ergeben. Zusätzlich konnte im ATP-Assay nur für hohe Konzentrationen eine Affektion des Zellüberlebens nachgewiesen werden. Zur Korrelation mit Veränderungen im Glukosestoffwechsel führten wir Western Blots im Konzentrationsbereich von 1,25-  $80 \mu\text{g/ml}$  durch.

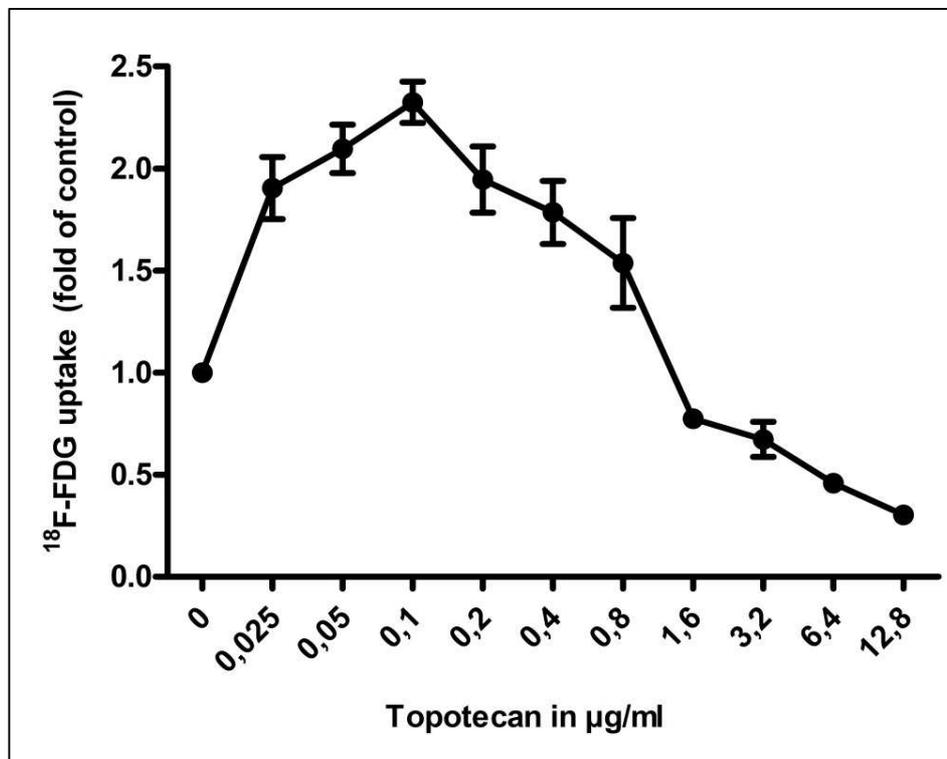
Die OPM-2 Zellen zeigten nach 24-stündiger Inkubation mit Etoposid eine starke GLUT-1 Expression relativ zur Kontrolle (bis auf  $80 \mu\text{g/ml}$ ). Auch die Hexokinase II-Expression wurde bis

etwa 20 µg/ml nicht supprimiert. Die Marker des Zelltods und der DNA-Reparatur zeigten erst spät eine Aktivierung. In den beiden höchsten Konzentrationen von 40 und 80 µg/ml zeigte sich die Spaltung von PARP-1 und Caspase-3.

**In Zusammenschau** der Ergebnisse konnte für OPM-2 Zellen unter Etoposid eine konstant starke Expression für GLUT-1 und Hexokinase II gezeigt werden. Cleaved PARP-1 und Cleaved Caspase-3 wurden ab 40 µg/ml sichtbar parallel zur Abnahme von HKII.

### 4.1.3 Topotecan

#### 4.1.3.1 Untersuchung des Glukosemetabolismus anhand der $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme



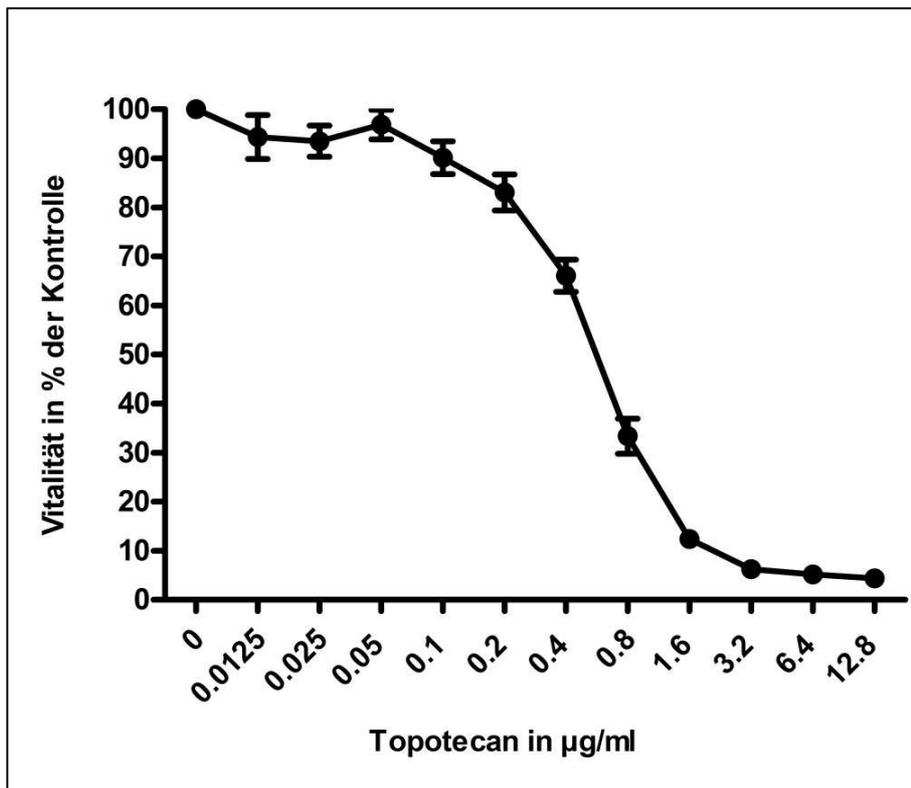
**Abbildung 8** Konzentrationsabhängige  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme (counts per minute) vitaler OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Topotecan. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme der unbehandelten Kontrolle (0) wurde auf den Wert 1 normiert und die der Konzentrationen als Vielfaches bzw. Bruchteil davon berechnet (fold of control). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Mittelwerte aus  $n=5$ .

Die für die  $^{18}\text{F}$ -FDG -Aufnahmeversuche in OPM-2 Zellen verwendeten Konzentrationen von Topotecan waren: 0  $\mu\text{g/ml}$ , 0,025  $\mu\text{g/ml}$ , 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , 0,4  $\mu\text{g/ml}$ , 0,8  $\mu\text{g/ml}$ , 1,6  $\mu\text{g/ml}$ , 3,2  $\mu\text{g/ml}$ , 6,4  $\mu\text{g/ml}$  und 12,8  $\mu\text{g/ml}$ . Die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden.

Die fünf niedrigsten Konzentrationen von Topotecan wiesen einen deutlichen Anstieg der  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme auf. Dabei war für 0,025  $\mu\text{g/ml}$  eine Steigerung des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake um 90,4% zu verzeichnen, für 0,05  $\mu\text{g/ml}$  um 109,6%, für 0,1  $\mu\text{g/ml}$  um 132,5%, für 0,2  $\mu\text{g/ml}$  um 94,6%, für 0,4  $\mu\text{g/ml}$  um 78,4% und für 0,8  $\mu\text{g/ml}$  um 53,7%. Bei 0,8  $\mu\text{g/ml}$  kam es zu einem signifikanten Abfall des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake unter den Kontrollwert mit einem weiteren Absinken auf ein Minimum vom 0,30-fachen der Kontrolle bei 12,8  $\mu\text{g/ml}$ .

**Insgesamt** ließ sich bei der Behandlung der OPM-2 Zellen mit Topotecan eine stark  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake-steigernde Wirkung im Konzentrationsbereich von 0,025- 0,8  $\mu\text{g/ml}$  feststellen bis zu einem Maximalwert vom 2,33-fachen der Kontrolle bei 0,1  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.1.3.2 Vitalitätsprüfung mittels ATP-Assay



**Abbildung 9** Konzentrationsabhängige Überlebenskurve der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Topotecan. Mit dem CellTiter-Glo® wurde der ATP-Gehalt der Zellen kolorimetrisch bestimmt. Das Überleben der Kontrolle wurde als 100% festgesetzt. Werte über 100% bedeuten eine Zunahme, Werte unter 100% eine Abnahme des Überlebens. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus  $n=4$ . Dargestellt ist der Fehlerbalken als Standardfehler der Mittelwerte (SEM).

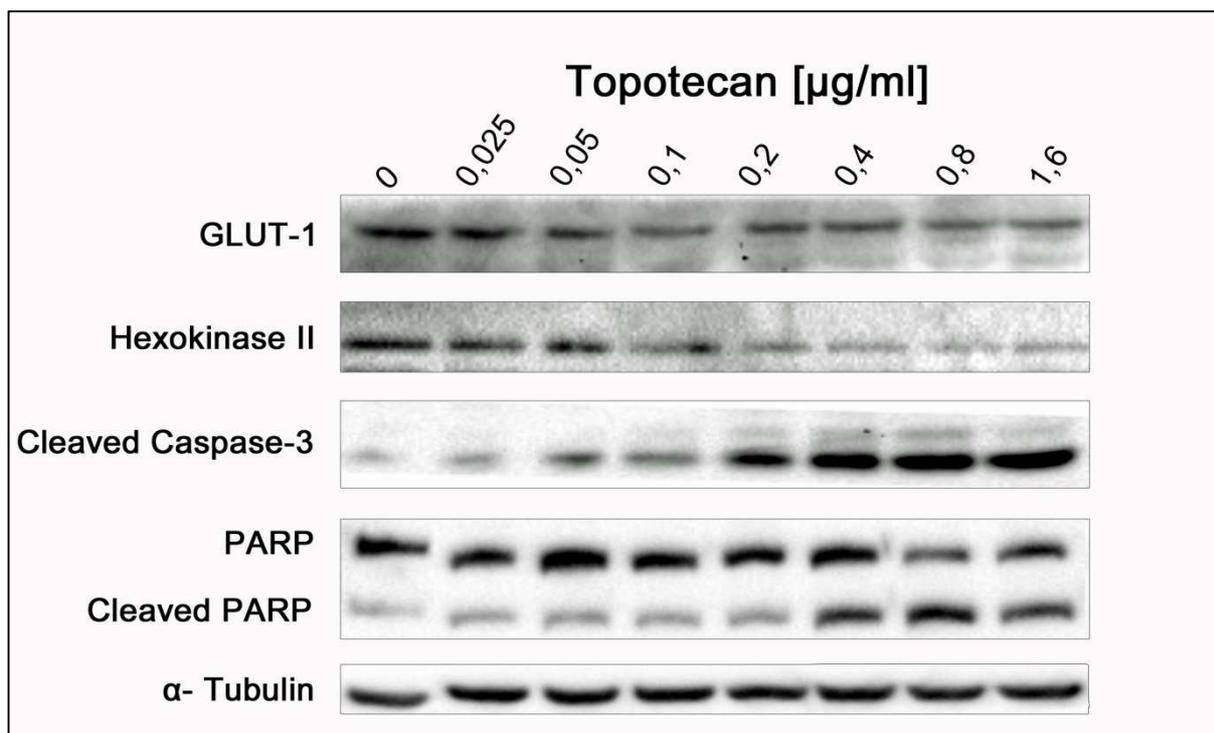
Für Topotecan wurde mit folgenden Konzentration das Überleben der OPM-2 per ATP-Assay bestimmt (24- stündige Inkubation): 0  $\mu\text{g/ml}$ , 0,0125  $\mu\text{g/ml}$ , 0,025  $\mu\text{g/ml}$ , 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 0,2  $\mu\text{g/ml}$ , 0,4  $\mu\text{g/ml}$ , 0,8  $\mu\text{g/ml}$ , 1,6  $\mu\text{g/ml}$ , 3,2  $\mu\text{g/ml}$ , 6,4  $\mu\text{g/ml}$  und 12,8  $\mu\text{g/ml}$ .

Ab 0,1  $\mu\text{g/ml}$  ließ sich ein relevanter Abfall des Überlebens feststellen. Im Konzentrationsbereich von 0,2 -1,6  $\mu\text{g/ml}$  fiel die Vitalität der OPM-2 von 83,08 % auf 12,4 % in Bezug auf die Kontrolle. Der  $\text{IC}_{50}$  wurde mit 0,54  $\mu\text{g/ml}$  errechnet (95 %- KI:0,50- 0,59  $\mu\text{g/ml}$ ). Danach

flachte die Überlebenskurve bis zu einem minimalen Wert von 4,35 % vitaler Zellen (12,8 µg/ml) ab.

**Zusammenfassend** ließ sich für OPM-2 Zellen unter Topotecan-Behandlung ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml ein dosisabhängiger, zytotoxischer Effekt nachweisen, mit maximaler Depletion des Überlebens ab 1,6 µg/ml.

#### 4.1.3.3 Charakterisierung von Apoptose und Glukosestoffwechsel mittels Western Blot



**Abbildung 10** Proteinexpression von Markern des Glukosestoffwechsels (GLUT-1, Hexokinase II) und des Zelltods (PARP-1, CC3) nach 24-stündiger Behandlung mit Topotecan. 0µg/ml bezeichnet die unbehandelte Kontrolle (Referenzwert). Eine Zunahme der Bandenintensität weist auf eine vermehrte Proteinexpression hin. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Ergebnisse wurden mindestens dreimal verifiziert.

Bisher fiel für OPM-2 Zellen unter Topotecan-Behandlung eine initiale erhebliche Steigerung des <sup>18</sup>F-FDG uptake auf. In diesem Bereich konnte auch eine verlangsamte Abnahme der Zellvitalität der OPM-2 Zellen gezeigt werden. Zur Charakterisierung von Zelltod und Glykolyse wurden Western Blots im Bereich von 0,025- 1,6 µg/ml Topotecan durchgeführt.

GLUT-1 und Hexokinase II waren in der unbehandelten Kontrolle der OPM-2 gut exprimiert. Die Expression war für beide bis 0,05 µg/ml in etwa isointens im Vergleich zur Kontrolle. Während die GLUT-1 Banden im weiteren Verlauf wenig supprimiert wurden, nahm die Ex-

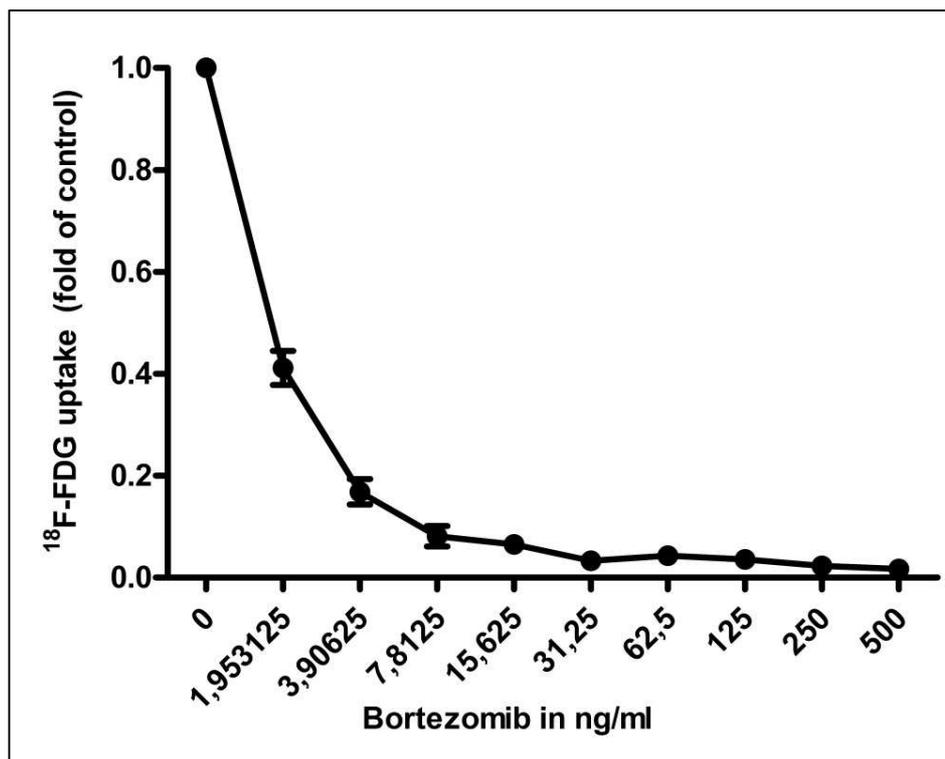
pression von Hexokinase II stetig ab. PARP-1 wurde ab einer Konzentration von 0,4 µg/ml und Caspase-3 ab 0,2 µg/ml vermehrt gespalten.

**Zusammengefasst** ließ sich für die Topotecan-Behandlung feststellen, dass GLUT-1 und HKII relativ zur Kontrolle nur in den niedrigen Konzentrationsbereichen isointens exprimiert waren. Die Expression von GLUT-1 zeigte sich stabiler als die von HKII. Die Spaltung von Caspase-3 und PARP-1 stieg maßgeblich mit der Aktivitätsminderung von HKII.

## 4.2 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod für Nicht-DNA-schädigende Substanzen

### 4.2.1 Bortezomib

#### 4.2.1.1 Untersuchung des Glukosestoffwechsels anhand der $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme



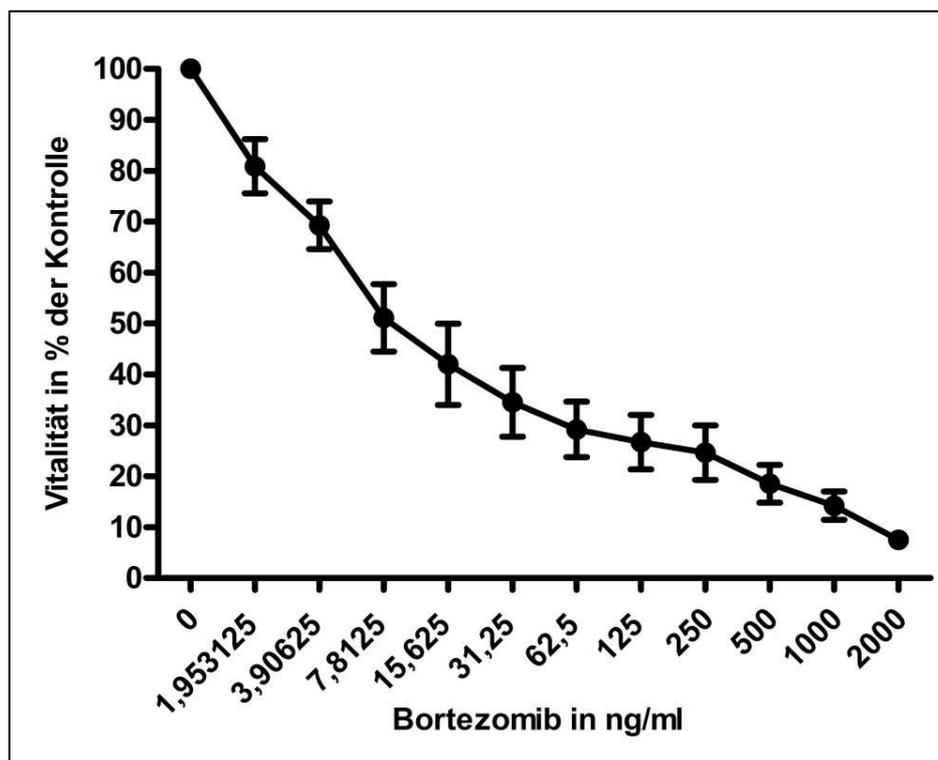
**Abbildung 11** Konzentrationsabhängige  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme (counts per minute) vitaler OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Bortezomib. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme der unbehandelten Kontrolle (0) wurde auf den Wert 1 normiert und die der Konzentrationen als Vielfaches bzw. Bruchteil davon berechnet (fold of control). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Mittelwerte aus n=5.

Der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahmeversuch nach Behandlung der OPM-2 Zellen mit Bortezomib wurde für Konzentrationen von 0 ng/ml, 1,953125 ng/ml, 3,90625 ng/ml, 7,8125 ng/ml, 15,625 ng/ml, 31,25 ng/ml; 62,5 ng/ml, 125 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml bestimmt. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden.

Es zeigte sich ein sofortiger, starker Abfall des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake der OPM-2 um 83,2 % innerhalb der ersten beiden Konzentrationsstufen relativ zur Kontrolle. Danach war der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake fast vollständig supprimiert innerhalb eines Bereichs von 8,1 % (7,8125 ng/ml) bis auf 1,7 % (500 ng/ml) der  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme der Kontrolle.

**Insgesamt** führte Bortezomib in allen getesteten Konzentrationen zu einem starken Abfall des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake in OPM-2 Zellen bis hin zu einer fast vollständigen Depletion der  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme.

#### 4.2.1.2 Vitalitätsprüfung mittels ATP-Assay



**Abbildung 12** Konzentrationsabhängige Überlebenskurve der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Bortezomib. Mit dem CellTiter-Glo® wurde der ATP-Gehalt der Zellen kolorimetrisch bestimmt. Das Überleben der Kontrolle wurde als 100% festgesetzt. Werte über 100% bedeuten eine Zunahme, Werte unter 100% eine Abnahme des Überlebens. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus n=4. Dargestellt ist der Fehlerbalken als Standardfehler der Mittelwerte (SEM).

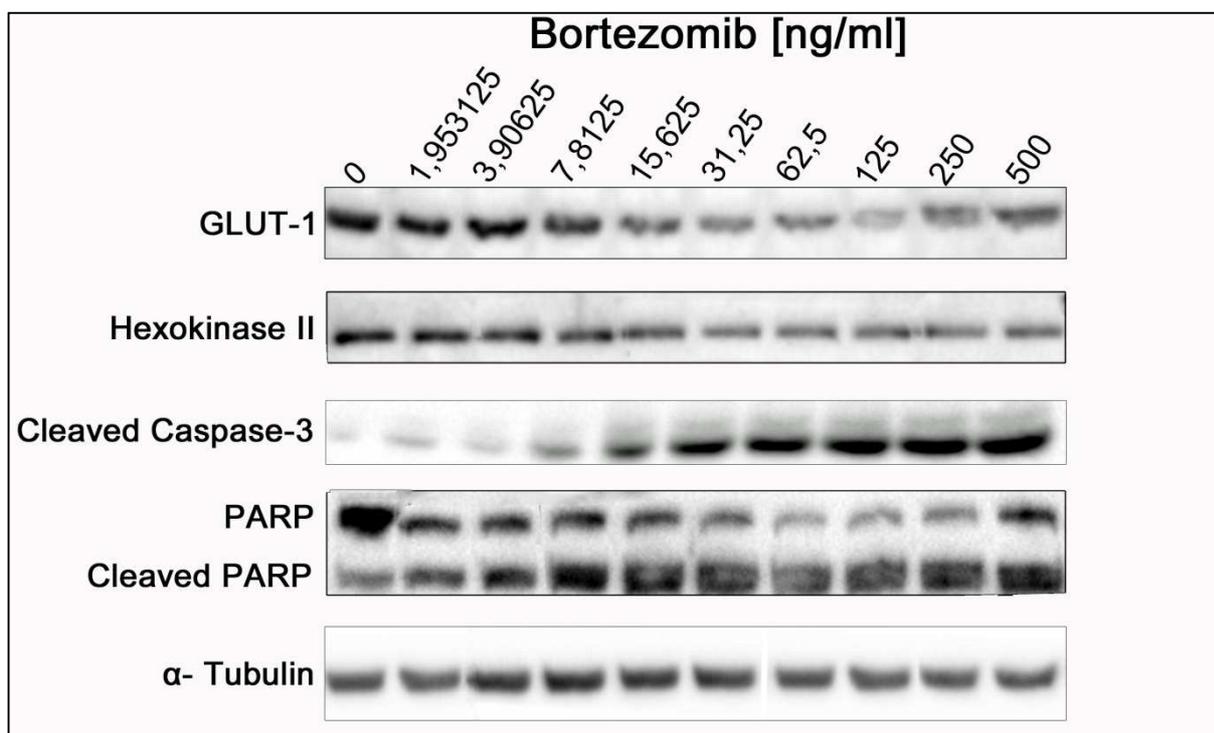
Für die Testung der Vitalität der OPM-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Bortezomib wurde ein ATP-Assay durchgeführt. Die dabei verwendeten Konzentrationen des Bortezomib betragen 0 ng/ml, 1,953125 ng/ml, 3,90625 ng/ml, 7,8125 ng/ml, 15,625 ng/ml, 31,25 ng/ml; 62,5 ng/ml, 125 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml und 2000 ng/ml.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich ein dosisabhängiger Rückgang der Überlebensrate der OPM-2. Der  $\text{IC}_{50}$  lag bei einer Konzentration von 13 ng/ml bei einem 95%-Konfidenzintervall

von 9,4- 19 ng/ml. Bei der höchsten Konzentration von 2000 ng/ml lebten im Mittel noch 7,51 % der Zellen.

**Zusammenfassend** ließ für Bortezomib eine klassische Dosis-Wirkungs-Beziehung feststellen mit kontinuierlicher, fast linearer Abnahme des Überlebens. Es bleibt zu beachten, dass diese Suppression bereits mit Dosierungen im nanomolaren Bereich zu erzielt werden konnte.

#### 4.2.1.3 Charakterisierung von Apoptose und Glukosestoffwechsel mittels Western Blot



**Abbildung 13** Proteinexpression von Markern des Glukosestoffwechsels (GLUT-1, Hexokinase II) und des Zelltods (PARP-1, CC3) nach 24-stündiger Behandlung mit Bortezomib. 0 bezeichnet die unbehandelte Kontrolle (Referenzwert). Eine Zunahme der Bandenintensität weist auf eine vermehrte Proteinexpression hin. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Ergebnisse wurden mindestens dreimal verifiziert.

Der dosisabhängige Einfluss von Bortezomib auf die Expression von Proteinen des Zelltods und des Glukosestoffwechsels in OPM-2 wurde mittels Western Blot charakterisiert. Der Messbereich lag bei 1,953125 - 500 ng/ml Bortezomib.

GLUT-1 wurde in der Kontrolle und in den beiden niedrigsten Konzentrationsstufen gleichmäßig stark exprimiert. Ab 7,8125 ng/ml zeigte sich eine Abnahme der Intensität, die sich dosisabhängig fortsetzte. Die Hexokinase II war in unbehandeltem Zustand und bis zu einer Kon-

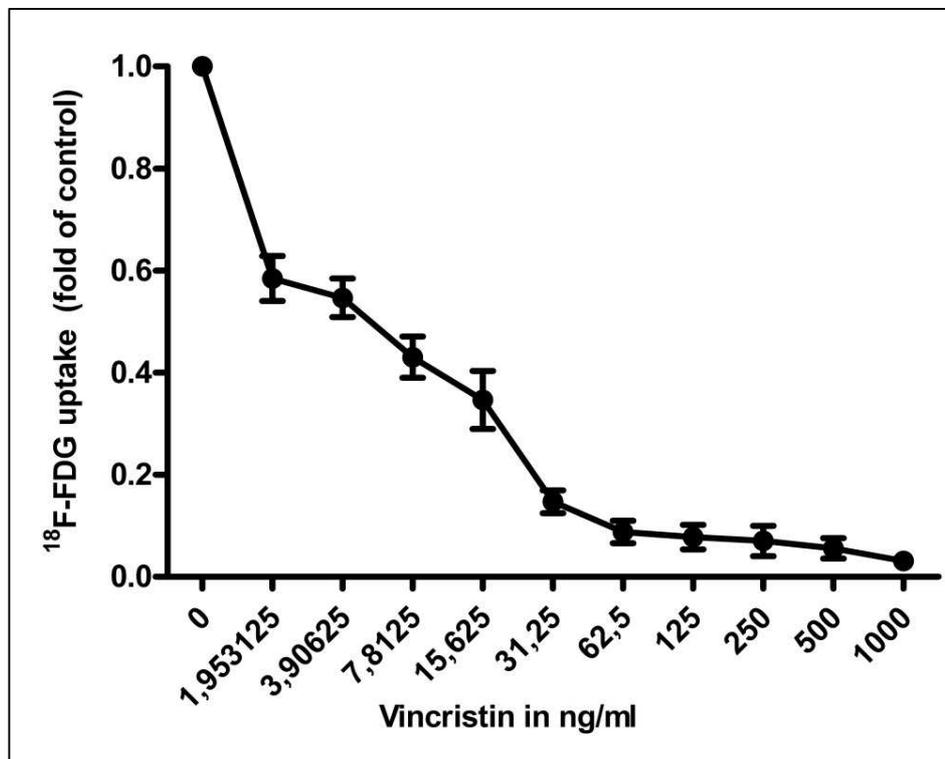
zentration von 15,625 ng/ml gut exprimiert. Danach begann eine Herunterregulierung des Enzyms.

Die Toxizität von Bortezomib auf OPM-2 Zellen ließ sich anhand der Spaltung von PARP-1 nachvollziehen. Schon ab der ersten Verdünnungsstufe setzte eine Spaltung des PARP-Komplexes ein, deren Intensität dosisabhängig zunahm. Ähnliches ließ sich für die Caspase-3 beobachten, für die ab 15,625 ng/ml eine vermehrte Spaltung einsetzte.

**Zusammenfassend** ließ sich in OPM-2 nach Bortezomib-Behandlung eine Herunterregulierung des Glukosetransporters-1 und der Hexokinase II ab niedrigen Konzentrationsbereichen feststellen. Gegenläufig wurden die „apoptotischen Marker“ PARP-1 und Cleaved Caspase-3 zunehmend hochreguliert.

## 4.2.2 Vincristin

### 4.2.2.1 Untersuchung des Glukosemetabolismus anhand der $^{18}\text{F}$ -FDG -Aufnahme



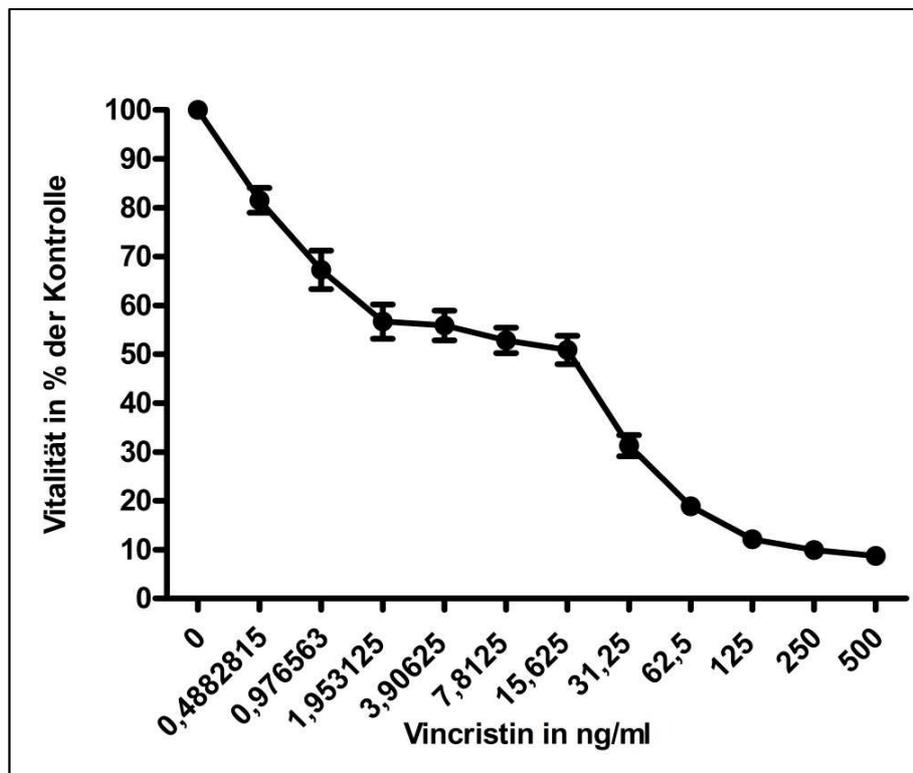
**Abbildung 14** Konzentrationsabhängige  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme (counts per minute) vitaler OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Vincristin. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme der unbehandelten Kontrolle (0) wurde auf den Wert 1 normiert und die der Konzentrationen als Vielfaches bzw. Bruchteil davon berechnet (fold control). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Mittelwerte aus  $n=5$ .

Für die Messung des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake von OPM-2 Zellen nach Behandlung mit Vincristin wurden Konzentrationen von 0 ng/ml, 1,953125 ng/ml, 3,90625 ng/ml, 7,8125 ng/ml, 15,625 ng/ml, 31,25 ng/ml; 62,5 ng/ml, 125 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml und 1000 ng/ml verwendet. Die OPM-2 Zellen wurden für 24 Stunden mit Vincristin inkubiert.

Die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der OPM-2 Zellen fiel in der niedrigsten Konzentrationsstufe der Vincristin-Therapie um 58,5% im Vergleich zur Kontrolle. Anschließend bildete der Kurvenverlauf eine „Schulter“ aus, bevor der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake ab 15,625 ng/ml weiter abfiel. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme war in der Folge fast vollständig supprimiert und erreichte bei 1000 ng/ml ein Minimum vom 0,031-fachen der Kontrolle.

**Zusammenfassend** wirkte Vincristin auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme OPM-2 „uptakesenkend“. Dosisabhängig war eine stetige Abnahme der  $^{18}\text{F}$ -FDG -Aufnahme für OPM-2 zu verzeichnen.

#### 4.2.2.2 Vitalitätsprüfung mittels ATP-Assay



**Abbildung 15** Konzentrationsabhängige Überlebenskurve der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Vincristin. Mit dem CellTiter-Glo® wurde der ATP-Gehalt der Zellen kolorimetrisch bestimmt. Das Überleben der Kontrolle wurde als 100% festgesetzt. Werte über 100% bedeuten eine Zunahme, Werte unter 100% eine Abnahme des Überlebens. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus  $n=4$ . Dargestellt ist der Fehlerbalken als Standardfehler der Mittelwerte (SEM).

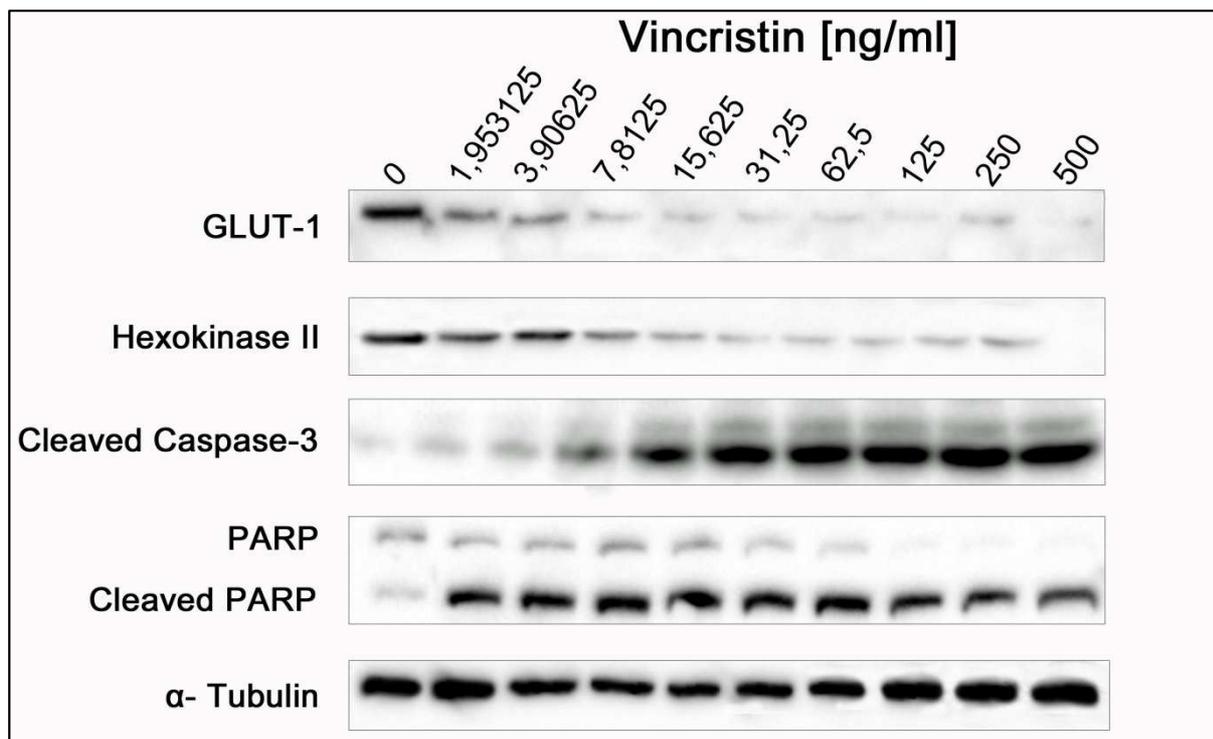
Das Überleben der OPM-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Vincristin wurde mittels ATP-Assay bestimmt. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen bestimmt: 0 ng/ml, 0,4882815 ng/ml, 0,976563 ng/ml, 1,953125 ng/ml, 3,90625 ng/ml, 7,8125 ng/ml, 15,625 ng/ml, 31,25 ng/ml; 62,5 ng/ml, 125 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml.

Die Vitalität der OPM-2 Zellen sank in den ersten drei Konzentrationsstufen bis 1,953125 ng/ml fast linear auf 56,7 % des Kontrollwerts. Anschließend ergab sich für die folgenden drei Konzentrationen ein Plateau, bevor bei 31,25 ng/ml ein weiterer Abfall des Überlebens der OPM-2 auf 32,08 % der Kontrolle erfolgte. Der  $IC_{50}$  für Vincristin lag bei 6,8 ng/ml (95 %- KI: 5,7- 8,0 ng/ml).

**Insgesamt** senkte Vincristin das Überleben der OPM-2 zunächst annähernd linear, bevor zwischen 1,953125 ng/ml und 15,625 ng/ml ein Plateau erreicht wurde. Danach ließ sich der Zell-

tod der OPM-2 wieder verstärken. Auffällig war, dass Vincristin schon im niedrigsten nanomolaren Bereich toxisches Potential hatte.

#### 4.2.2.3 Charakterisierung von Apoptose und Glukosestoffwechsel mittels Western Blot



**Abbildung 16** Proteinexpression von Markern des Glukosestoffwechsels (GLUT-1, Hexokinase II) und des Zelltods (PARP-1, CC3) nach 24-stündiger Behandlung mit Vincristin. 0 bezeichnet die unbehandelte Kontrolle (Referenzwert). Eine Zunahme der Bandenintensität weist auf eine vermehrte Proteinexpression hin. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Ergebnisse wurden mindestens dreimal verifiziert.

Für OPM-2 Zellen unter Vincristin-Therapie hatte sich bisher eine deutliche Verminderung des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes und ein hohes zytotoxisches Potential auf die OPM-2 Zellen gezeigt. Um Veränderungen auf proteinbiochemischer Ebene nachzuvollziehen, wurde für den Bereich von 1,953125- 500 ng/ml eine Western Blot-Analyse mit Markern des Zelltods und des Glukosestoffwechsels angefertigt.

Unbehandelte OPM-2 Zellen zeigten auch in dieser Versuchsreihe eine starke Expression von GLUT-1 und HKII. Für GLUT-1 ergab sich eine sofortige, starke Herabregulation. Für die hohen Konzentrationsbereiche von Vincristin war dann schließlich kaum mehr ein Signal zu erkennen. Die Expression der Hexokinase II zeigte sich bis 3,90625 ng/ml kaum verändert, nahm

danach aber deutlich ab. Die Spaltung des PARP-1 und der Caspase-3-Komplexes erfolgte ab den niedrigsten Konzentrationen.

**Zusammengefasst** regulierten OPM-2 Zellen nach Vincristin-Behandlung Hexokinase II und in besonderem Maße GLUT-1 herunter mit ausgeprägter, frühzeitiger Induktion von Zelltodproteinen.

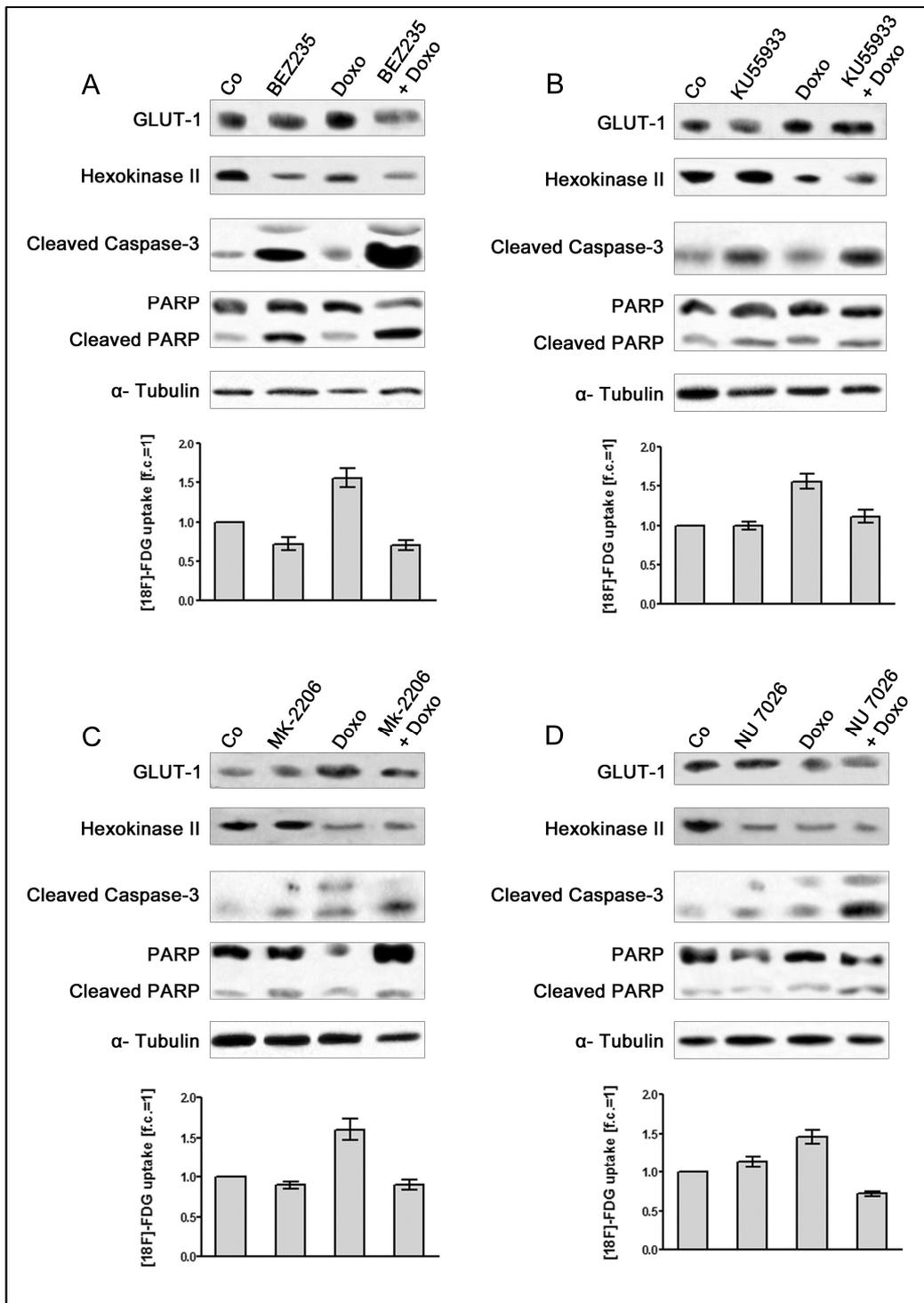
### **4.3 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod unter DNA-schädigenden Substanzen mit Inhibitoren der DDR und PI3K/Akt/mTOR**

Nachdem die OPM-2 Zellen in den vorausgegangenen Versuchen nach Behandlung mit den Topoisomerase-Hemmern Doxorubicin, Etoposid und Topotecan einen erhöhten  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake für niedrige bis mittlere Konzentrationsbereiche gezeigt hatten, untersuchten wir, ob sich dieser Effekt unter Applikation von Inhibitoren des Energiestoffwechsels bzw. der DNA-Strangbruch-Reparatur modulieren ließe im Sinne einer Reversion der erhöhten Glukoseaufnahme und dessen Auswirkung auf das Zellüberleben. Dazu wurden Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs [Akt 1/2/3-Inhibitor (MK-2206) und mTOR-Inhibitor (NVP-BEZ235)] und Inhibitoren der DNA damage response-Kinasen (PIKKs) [ATM (KU55933) und DNA-PKcs (NU7026)] in Einzelgabe und in Kombination mit Topoisomerase-Hemmern getestet.

In diesen  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme-Versuchen wurden die Mittelwerte der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der lebenden OPM-2 Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren, Topoisomerase-Hemmern und deren Kombination nach 24-stündiger Inkubation ausgewertet. Der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake der mitgeführten, unbehandelten Kontrolle wurde auf den Wert 1 normiert und die Aufnahme der jeweiligen Probe als Bruchteil bzw. Vielfaches davon beschrieben (fold control). Die verwendeten Zytostatika-Konzentrationen wurden anhand der Konzentration mit der höchsten  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme aus den Vorversuchen ausgewählt (siehe Kap. 4.1; für Doxorubicin: 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Etoposid: 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und Topotecan: 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Die ausgewählten Inhibitor-Konzentrationen wurden nach ausführlicher, vergleichender Literaturrecherche festgelegt und betragen: BEZ235 (200nM), MK-2206 (1 $\mu\text{M}$ ), KU55933 (10 $\mu\text{M}$ ), NU7026 (10 $\mu\text{M}$ ). (u.a. (Baumann, Mandl-Weber et al. 2009, Mukherjee, Tomimatsu et al. 2012, Ramakrishnan, Kimlinger et al. 2012).

Die Lysate für die Western Blots (Anleitung s. Kap. 3.2.6) wurden analog dieser Versuchsanordnung mit den immer gleichen Konzentrationen der Topoisomerase-Hemmstoffe und Inhibitoren nach 24-stündiger Inkubation erstellt. Es erfolgte eine Applikation der bisher verwendeten Antikörper (GLUT-1, Hexokinase II; PARP-1, Cleaved caspase-3,  $\alpha$ -Tubulin).

### 4.3.1 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod unter Doxorubicin und Inhibitoren der DDR und PI3K/Akt/mTOR



**Abbildung 17** OPM-2 blieben unbehandelt (Co) oder wurden für 24 Stunden mit festen Konzentrationen der Inhibitoren (A) BEZ235 (200 nM), (B) KU55933 (10  $\mu\text{M}$ ), (C) MK-2206 (1 $\mu\text{M}$ ), (D) NU7026 (10 $\mu\text{M}$ ) einzeln oder in Kombination mit Doxorubicin (0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) behandelt. Die Ergebnisse resultieren aus  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes (cpm/viable cells, fold control) und Western Blots von GLUT-1, Hexokinase II, Cleaved caspase-3 und PARP-1. Die Ergebnisse wurden mindestens zweimal bestätigt. Fehlerbalken = SEM.  $\alpha$ -Tubulin = Ladekontrolle.

**a) BEZ235/ Doxorubicin**

Die OPM-2 Zellen zeigten nach Einzelbehandlung mit BEZ235 eine Aufnahme vom 0,73-fachen der Kontrolle. Die Kombination aus BEZ235 und Doxorubicin bewirkte eine Senkung des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake vom 1,56-fachen (bei Doxorubicin in Einzelgabe) auf das 0,71-fache (Rückgang um 54,63%) und damit auf unter Kontrollniveau (= 1) und leicht unter die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme bei BEZ235-Einzelgabe.

Diese Abnahme der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme fand ihre Entsprechung in den Western Blots, wo in der Kombinationsbehandlung eine deutliche Abnahme der Bandenintensität sowohl für GLUT-1 als auch für HKII ersichtlich wurde im Vergleich zur Kontrolle und Doxorubicin-Einzelgabe. Auch die „Apoptosemarker“ Cleaved PARP-1 und Cleaved Caspase-3 waren in Kombinationsbehandlung stark hochreguliert, wobei auch schon BEZ235 allein diesen Effekt zeigte.

**b) KU55933/ Doxorubicin**

Unter Behandlung mit KU55933 hatten die OPM-2 Zellen eine zur Kontrolle fast unveränderte  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle. Nachdem für Doxorubicin die erwartete Steigerung des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes (1,56-fache der Kontrolle) gemessen wurde, nahm von diesem Wert ausgehend die Aufnahme in Kombinationsbehandlung um 28,62 % auf das 1,12-fache der Kontrolle ab.

In der proteinbiochemischen Analyse zeigte sich GLUT-1 unverändert stark exprimiert in der Kombinationsbehandlung. HKII jedoch war deutlich weniger exprimiert. Eine Spaltung der Caspase-3 war in KU55933 Einzelgabe nachweisbar mit Verstärkung der Spaltung in Kombinationsbehandlung, in der auch Cleaved PARP-1 leicht erhöht war.

**c) MK-2206/ Doxorubicin**

Der Einsatz von MK-2206 in dieser Versuchsreihe ergab für OPM-2 eine  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme vom im Schnitt 0,89-fachen bezogen auf die Kontrolle und vom 1,61-fachen für Doxorubicin. Von diesem Wert führte die Kombination zu einer mittleren Senkung der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme auf das 0,9-fache (fold control), was eine Abnahme um 43,81 % bedeutete.

Die Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin hatte nur auf die Expression von HKII eine abschwächende Wirkung. Auch die Spaltung der „Zelltodenzyme“ PARP-1 und Caspase-3 war in dieser Doppelbehandlung eher schwach ausgeprägt.

#### d) NU7026/ Doxorubicin

Unter Behandlung mit NU7026 zeigten die OPM-2 Zellen eine  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme vom 1,17-fachen bezüglich der Kontrolle. Auch für diesen Inhibitor ergab die Kombination mit Doxorubicin eine „uptakesenkende“ Wirkung, diesmal um 50,51 % (vom 1,46-fachen bei Doxorubicin auf das 0,72-fache der Kontrolle in Kombinationsbehandlung).

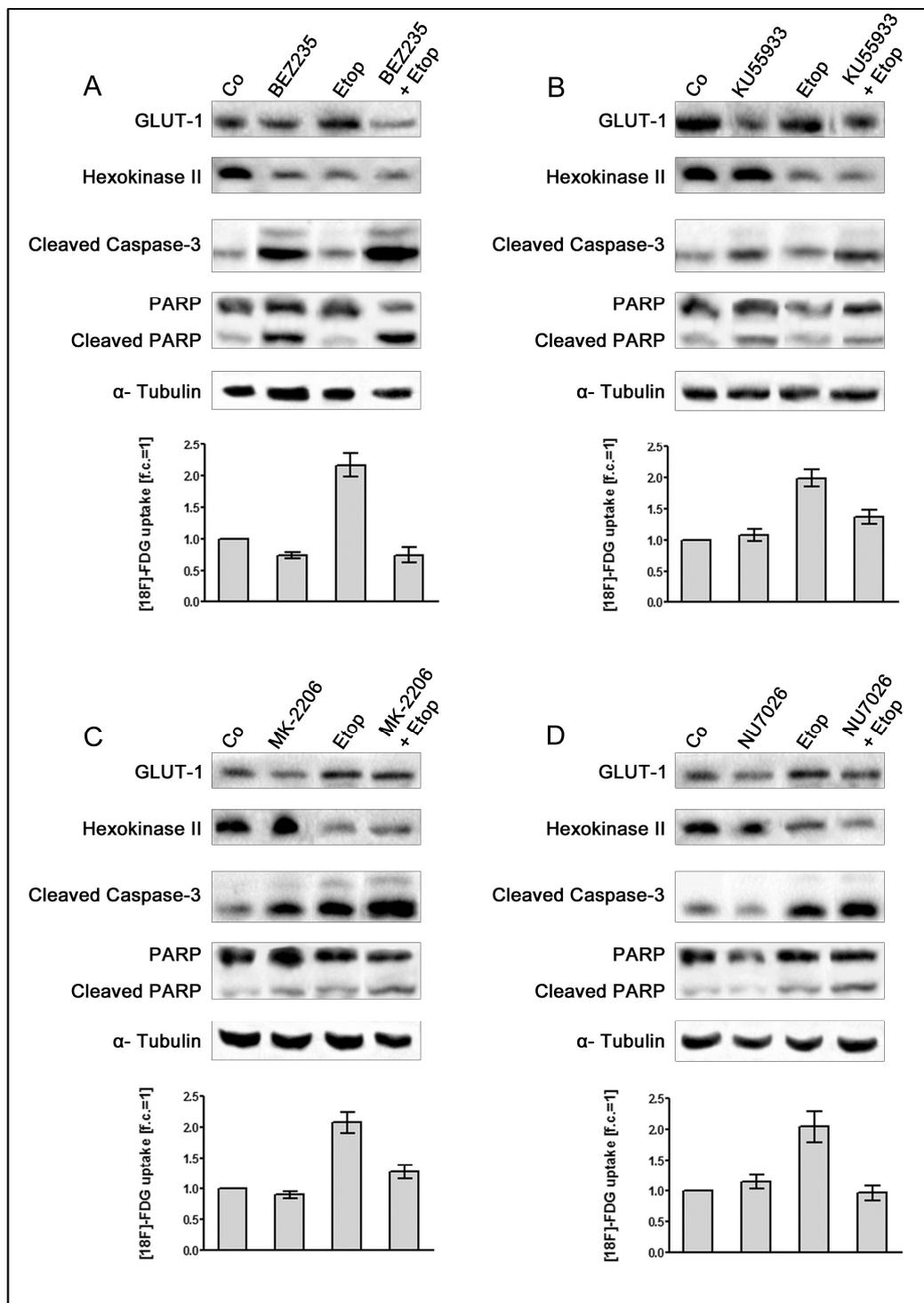
Wiederum zeigten die OPM-2 Zellen hinsichtlich der glykolytischen Enzyme eine starke Herunterregulierung für HKII in Kombinationsbehandlung, auch die GLUT-1 Expression zeigte sich deutlich vermindert. Die Spaltung der Caspase-3 war in Doppelbehandlung deutlich ausgeprägt, die von PARP-1 hingegen nicht.

**Zusammengefasst** ließ sich feststellen, dass hinsichtlich der Inhibitoren nur BEZ235 (s. Abb. 17 A) einen deutlich supprimierenden Einfluss auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der OPM-2 in Einzelgabe hatte. Der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake der anderen Inhibitoren (B-D) lag stets nahe des Kontrollwerts.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass alle vier getesteten Doxorubicin-Inhibitor-Kombinationen im Vergleich zur alleinigen Doxorubicingabe die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme relevant abschwächen konnten. Dabei wurden die relativ stärksten Senkungen für BEZ235 (A), NU7026 (D) und MK-2206 (C) gemessen, für die in Kombinationsbehandlung mit Doxorubicin die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme jeweils unter den Wert der unbehandelten Kontrolle fiel.

In Bezug auf die Expression von GLUT-1 hatte die Einzelgabe der Inhibitoren kaum einen Einfluss. Doxorubicin (0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) allein bewirkte (wie in den Vorversuchen, s. 4.1.1.3) eine Heraufregulierung des Glukosetransporters-1, die sich in Kombinationsbehandlung mit BEZ235 und NU7026 deutlich abschwächen ließ. Hexokinase II wurde in allen Kombinationsbehandlungen in seiner Expression geschwächt, wobei hier der Einfluss des Doxorubicin in Einzelgabe beachtet werden muss. Eine Apoptose-Induktion für Inhibitor- Einzelgabe (erkennbar anhand der Caspase-3 und PARP-1-Spaltung) war ausschließlich für BEZ235 nachweisbar, wobei die Spaltung der Caspase-3 durch alle Kombinationsschemata hervorgerufen werden konnte.

### 4.3.2 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod unter Etoposid und Inhibitoren der DDR und PI3K/Akt/mTOR



**Abbildung 18** OPM-2 blieben unbehandelt (Co) oder wurden für 24 Stunden mit festen Konzentrationen der Inhibitoren (A) BEZ235 (200 nM), (B) KU55933 (10  $\mu\text{M}$ ), (C) MK-2206 (1  $\mu\text{M}$ ), (D) NU7026 (10  $\mu\text{M}$ ) einzeln oder in Kombination mit Etoposid (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) behandelt. Die Ergebnisse resultieren aus  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes (cpm/viable cells, fold control) und Western Blots von GLUT-1, Hexokinase II, Cleaved caspase-3 und PARP-1. Die Ergebnisse wurden mindestens zweimal bestätigt. Fehlerbalken = SEM.  $\alpha$ -Tubulin = Ladekontrolle.

**a) BEZ235/ Etoposid**

Die Behandlung der OPM-2 Zellen mit dem dualen PI3K/mTOR-Inhibitor BEZ235 erbrachte einen verminderten  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake vom 0,75-fachen zur Kontrolle. Unter Etoposid-Behandlung wurde die Aufnahme der OPM-2 mit dem 2,17-fachen (f.c.) bestimmt. Bei gleichzeitiger Gabe beider Substanzen wurde eine Minderung des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes um 51,83% auf das 0,75-fache der Kontrolle erzielt.

In den Western Blots bewirkte BEZ235/ Etoposid in OPM-2 Zellen eine starke Minderexpression von GLUT-1 und HKII im Vergleich zur Kontrolle und zu den Einzelbehandlungen. Auch die Zelltodmarker CC3 und Cleaved PARP-1 waren maximal hochreguliert in BEZ235 Einzel- und Kombinationsbehandlung.

**b) KU55933/ Etoposid**

Unter Behandlung mit dem den ATM-Inhibitor KU55933 wurde ein  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake-Wert vom 1,08-fachen der Kontrolle ermittelt. Während der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake für Etoposid in dieser Versuchsreihe durchschnittlich beim 1,99-fachen der Kontrolle lag, ging er bei gleichzeitiger Anwendung von Etoposid und KU55933 auf das 1,38-fache zurück, was einem mittleren Rückgang von 30,88 % entsprach.

Hinsichtlich der Expression glykolytischer Enzyme fand eine Modulation der Hexokinase II unter Kombinationsbehandlung statt, deren Expression deutlich unter der unbehandelten OPM-2 Kontrolle lag. Die GLUT-1 Expression blieb weitestgehend unverändert. KU55933 konnte bereits in Einzelgabe eine Spaltung von Caspase-3 und PARP-1 bewirken, die auch unter Zugabe von Etoposid ähnlich stark ausgeprägt war.

**c) MK-2206/ Etoposid**

Die Behandlung der OPM-2 mit dem Akt-Inhibitor MK-2206 erbrachte eine  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahmesenkung von im Mittel 11,25 %. verglichen zur Kontrolle. Etoposid konnte in dieser Versuchsreihe die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der OPM-2 auf das 2,08-fache der Kontrolle steigern. Die beiden Substanzen zusammen zeigten einen verminderten  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake von 1,28 (f.c.), mit einer relativen Senkung zur Einzelgabe von Etoposid um 38,68 %.

Im Western Blot zeigte sich für MK-2206 in Einzelgabe ein abschwächender Effekt auf die GLUT-1 Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die Kombinationsbehandlung mit Etoposid bewirkte eine maßgebliche Minderexpression von HKII, die auch für die Etoposid-Einzelbehandlung ersichtlich war. Eine Aktivierung der Cleaved caspase-3 in OPM-2 fand für

alle Behandlungen statt, wohingegen PARP-1 nur in Kombinationsbehandlung leicht vermehrt gespalten wurde.

#### **d) NU7026/ Etoposid**

Der Einsatz des DNA-Pkcs-Hemmstoffs NU7026 in OPM-2 bewirkte im Mittel einen Anstieg des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes um 16,63 % im Vergleich zur Kontrolle. Auch mit diesem Inhibitor konnte in Kombination die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme gesenkt werden. Im Vergleich zur Einzelgabe von Etoposid betrug die Differenz hier 53,41 % (vom 2,05- auf das 0,95-fache relativ zur Kontrolle).

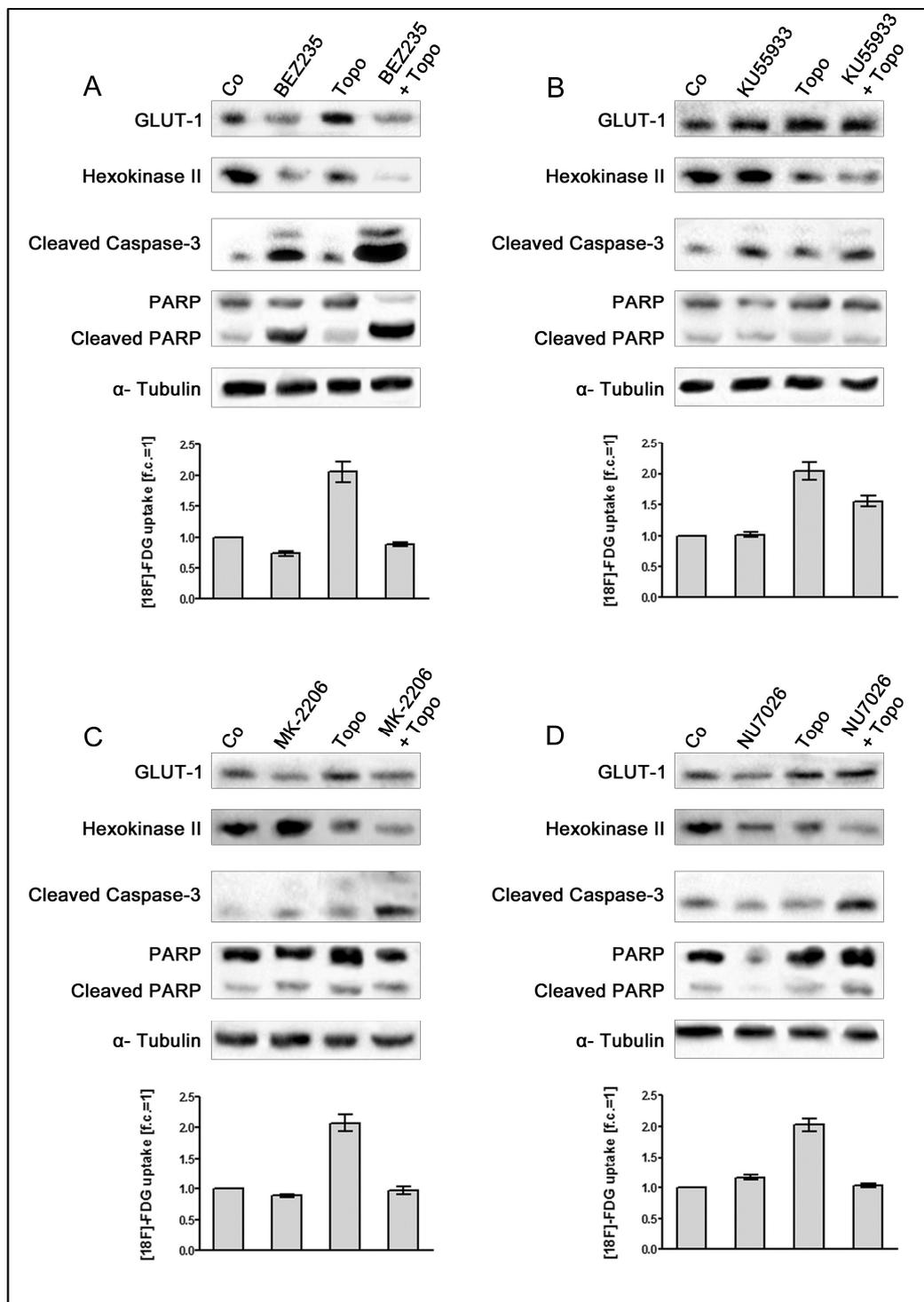
NU7026 hatte einen schwach negativ-regulierenden Einfluss auf die Expression von GLUT-1 in OPM-2. Ansonsten überwog der „uptakesteigernde“ Einfluss von Etoposid auf die GLUT-1 Expression. NU7026 hatte keinen modulierenden Effekt auf HKII, während die Kombinationsbehandlung eine deutliche Abschwächung dieses Enzyms bewirkte. Auch die Apoptose-Induktion konnte anhand der Verstärkung von CC3 und Cleaved PARP-1 in OPM-2 unter NU7026/ Etoposid nachgewiesen werden.

**Zusammengefasst** ergab die Versuchsreihe, dass alle vier Inhibitoren (s. Abb. 18 A-D) in Kombinationsbehandlung mit Etoposid den erhöhten  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake der OPM-2 im Vergleich zur alleinigen Etoposidgabe revidieren konnten. Etoposid plus BEZ235 (A) bzw. plus NU7026 (D) konnten den  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake auf unter Kontrollniveau senken, wobei BEZ235 allein schon diesen Effekt hatte. Die NU7026 Einzelgabe selbst hingegen hatte eine leicht „uptakesteigernde“ Wirkung.

Bei den Western Blots bestätigte sich für OPM-2 Zellen eine Zunahme der Expression von GLUT-1 unter alleiniger Inkubation mit Etoposid  $c=10\ \mu\text{g/ml}$  (s. Kap.4.1.2.3), die sich durch NU7026 leicht und durch BEZ235 deutlich unter Kontrollniveau senken ließ. Die HK II-Aktivität wurde bereits stark durch Etoposid herunterreguliert, was auch in Kombinationsbehandlungen erhalten blieb bzw. sich leicht verstärkte.

Sowohl die Inhibitoren [z.B. BEZ235 (A), KU55933 (B)] als auch Etoposid selbst [bei MK-2206 (C), NU7026 (D)] konnten eine Induktion der „Apoptose-Marker“ hervorrufen und die Spaltung von Caspase-3 und PARP-1 in Kombinationsbehandlung weiter verstärken.

### 4.3.3 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod unter Topotecan und Inhibitoren der DDR und PI3K/Akt/mTOR



**Abbildung 19** OPM-2 blieben unbehandelt (Co) oder wurden für 24 Stunden mit festen Konzentrationen der Inhibitoren (A) BEZ235 (200 nM), (B) KU55933 (10  $\mu\text{M}$ ), (C) MK-2206 (1  $\mu\text{M}$ ), (D) NU7026 (10  $\mu\text{M}$ ) einzeln oder in Kombination mit Topotecan (0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) behandelt. Die Ergebnisse resultieren aus  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes (cpm/viable cells, fold control) und Western Blots von GLUT-1, Hexokinase II, Cleaved caspase-3 und PARP-1. Die Ergebnisse wurden mindestens zweimal bestätigt. Fehlerbalken = SEM.  $\alpha$ -Tubulin = Ladekontrolle.

**a) BEZ235/ Topotecan**

Der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake in vitalen OPM-2 unter Behandlung mit BEZ235 betrug in dieser Reihe im Mittel das 0,74-fache der Kontrolle. Einer mittleren Aufnahme des  $^{18}\text{F}$ -FDG vom 2,05-fachen der Kontrolle bei Topotecan in Einzelgabe, folgte eine  $^{18}\text{F}$ -FDG-Abnahme in Kombination mit BEZ235 um 56,8 % auf das 0,89-fache der Kontrolle.

Dieses Ergebnis spiegelte sich auch im Western Blot wider, wo sich eine massive Abnahme von GLUT-1 und HKII zeigte, sowohl in BEZ235-Einzeltherapie als auch in Doppelbehandlung mit Topotecan. Auch der Zelltod der OPM-2 unter diesen Behandlungen war anhand der starken Expression von CC3 und Cleaved PARP-1 nachvollziehbar.

**b) KU55933/ Topotecan**

Für KU55933 erbrachte die Messung des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes in OPM-2 in diesen Versuchen eine kaum messbare Veränderung zum Kontrollwert. Es konnte eine  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake-Steigerung für Topotecan um 104,4 % im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Die Kombinationsbehandlung KU55933/ Topotecan hatte eine durchschnittliche  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme vom 1,56-fachen der Kontrolle, was einem Rückgang im Vergleich zur alleinigen Topotecangabe von 27,8 % entsprach.

Die „glykolytischen Marker“ in OPM-2 ließen sich in dieser Behandlung nur wenig modulieren. Ausschließlich die Expression von HKII war in der Kombinationsbehandlung abgeschwächt. Apoptotische Vorgänge der OPM-2 waren anhand einer CC3-Expression unter KU55933-Einzelgabe und in Kombination mit Topotecan nachweisbar.

**c) MK-2206/ Topotecan**

Für die Behandlung der OPM-2 mit MK-2206 zeigte sich ein  $^{18}\text{F}$ -FDG Messwert der vitalen Zellen vom 0,89-fachen der Kontrolle. Die Kombinationsbehandlung mit Topotecan zeigte einen mittleren  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake vom 1,28-fachen der Kontrolle, was einer Senkung der  $^{18}\text{F}$ -FDGAufnahme um 38,7 % entsprach, bei einer Aufnahme vom 2,08-fachen (f.c) unter Topotecan.

Die Therapie mit MK-2206 bewirkte einen leichten Rückgang der GLUT-1-Expression für OPM-2, der auch in Kombinationsbehandlung erhalten blieb. Auch die HKII-Expression war in Doppeltherapie mit Topotecan rückläufig. Caspase-3-abhängige Zelltodinduktion der OPM-2 war nur in Kombinationsbehandlung nachweisbar.

**d) NU7026/ Topotecan**

Der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake vitaler OPM-2 Zellen unter Behandlung mit NU7026 lag bei dieser Messreihe im Mittel beim 1,17-fachen der Kontrolle. Die Kombinationsbehandlung mit Topotecan erbrachte eine  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme vom 1,04-fachen der Kontrolle und konnte so, verglichen mit der Topotecan-Einzelgabe (2,03-fache der Kontrolle), um 48,77 % gesenkt werden.

NU7026 konnte eine Abschwächung der „Glukoseparameter“ GLUT-1 und zusammen mit Topotecan für HKII erzielen. Die NU7026/ Topotecan-Therapie induzierte eine Spaltung der Caspase-3 bei leichter Induktion von Cleaved PARP-1.

**Zusammengefasst** hat auch die Kombination der vier Inhibitoren mit dem Topoisomerase-Hemmer Topotecan (s. Abb 19 A- D) die unter alleiniger Topotecangabe erhöhte  $^{18}\text{F}$ -FDG - Aufnahme signifikant senken können. Am stärksten war die Senkung des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes abermals unter Kombination mit BEZ235 (A) und NU7026 (D).

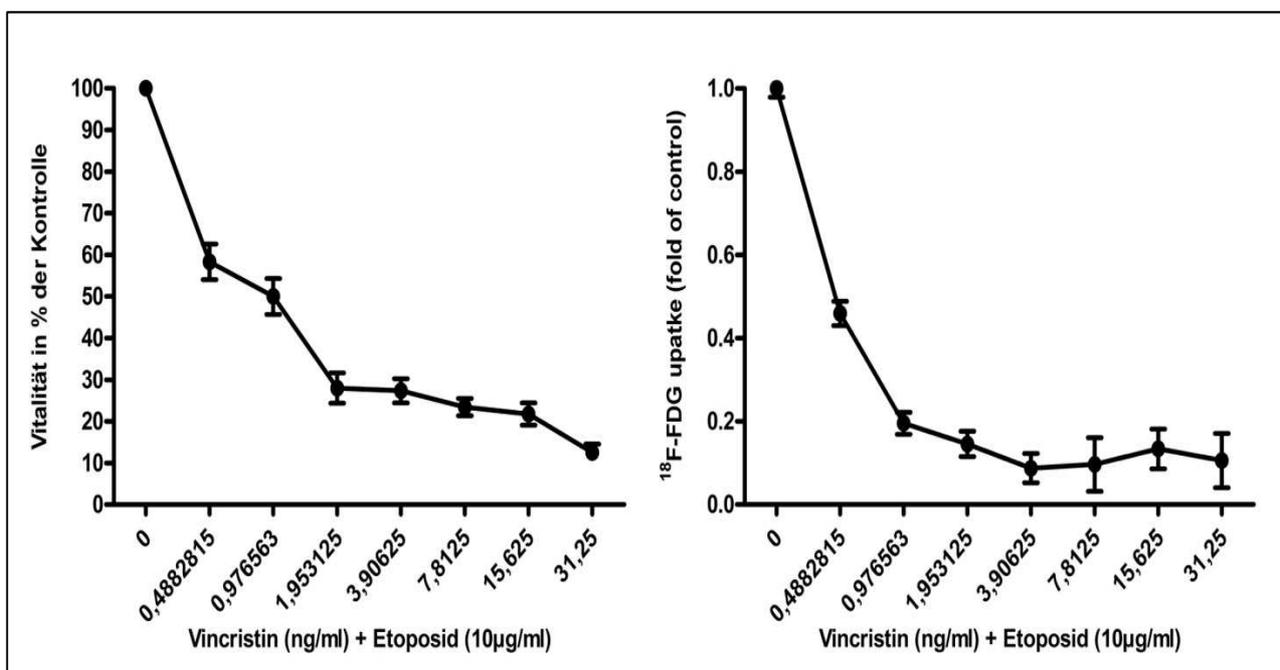
In der proteinanalytischen Auswertung ergab die Kombinationsbehandlung für die OPM-2 Zellen eine stabile Expression des GLUT-1, während die Inhibitoren selbst eher eine Abschwächung herbeiführten, insbesondere BEZ235 (A) und MK-2206 (C). Kombinationsbehandlungen mit Topotecan konnten die HKII-Expression deutlich schwächen. Während Topotecan plus Inhibitoren einen synergistischen Effekt auf die Spaltung der Caspase 3 hatten, blieb die Auswirkung auf die Spaltung von PARP-1 eher schwach (ausgenommen BEZ235).

#### 4.4 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus und Zelltod bei Kombination von Zytostatika

In dieser Versuchsanordnung sollte der Effekt einer kombinierten Zytostatikagabe auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme und das Überleben von OPM-2 untersucht werden. Es wurden Verdünnungsreihen der zuvor als „uptakesenkenden“ Zytostatika Bortezomib und Vincristin (s. Abb. 11 und 14) erstellt und zu jeder Konzentrationsstufe die als „uptakesteigernd“ ermittelten Doxorubicin bzw. Etoposid (s. Abb. 2 und 5) hinzugefügt, um zu ermitteln, welcher Effekt sich als stabiler erweisen würde.

Für Doxorubicin und Etoposid wurden Konzentrationen gewählt, die in den Vorversuchen eine maximale  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme gezeigt hatten ( $c= 0,25 \mu\text{g/ml}$  bzw.  $10\mu\text{g/ml}$ ). Die Inkubationszeit lag bei 24 Stunden. Es wurde die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der vitalen OPM-2 Zellen gemessen und auf die unbehandelte Kontrolle (fold control= 1) bezogen. Das Zellüberleben wurde wieder kolorimetrisch mittels CellTiter-Glo® (ATP-Assay) bestimmt.

##### 4.4.1 Vitalitätstestung und $^{18}\text{F}$ -FDG -Aufnahmeversuch bei Kombination von Vincristin und Etoposid



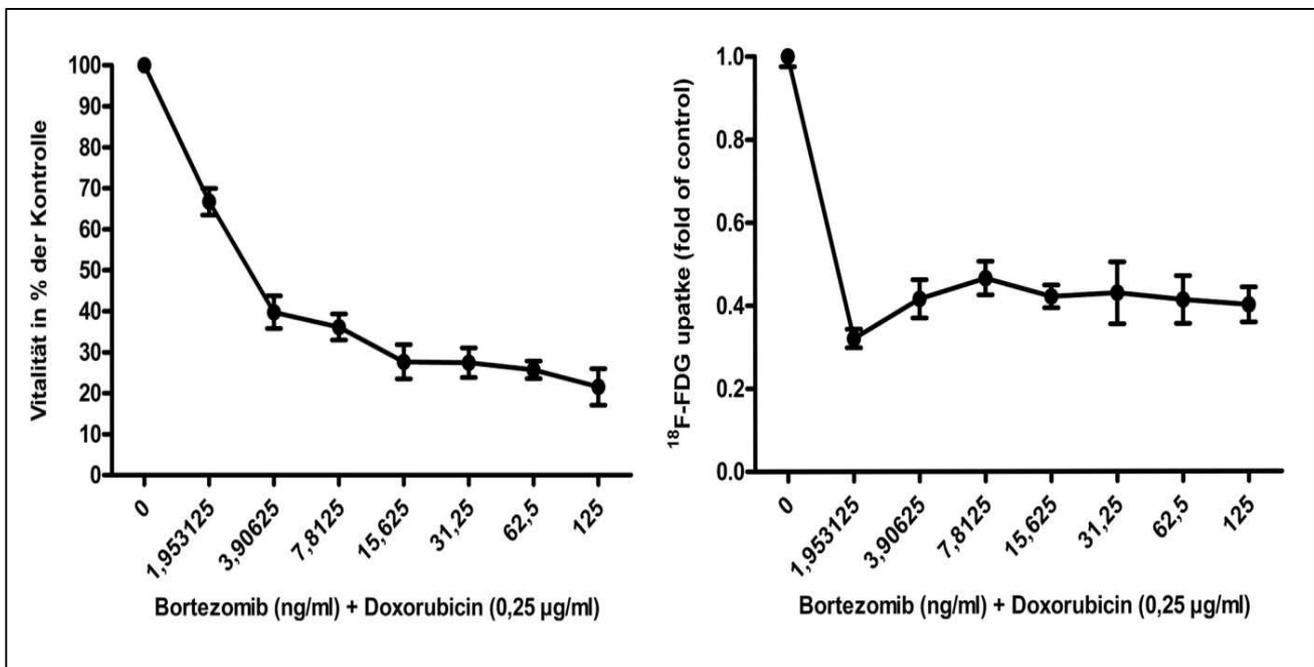
**Abbildung 20** OPM-2 Zellen blieben unbehandelt (0) oder wurden mit Vincristin (Verdünnungsreihe) und Etoposid (je  $10 \mu\text{g/ml}$ ) 24 Stunden lang inkubiert. Es wurde die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der OPM-2 (cpm/viable.cells, fold control= 1) und die Zellvitalität mit dem CellTiter-Glo® bestimmt (Kontrolle=100%). Die Ergebnisse sind der Mittelwert aus  $n=3$ . Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Es wurden der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake und die Zellvitalität der OPM-2 bei einer Verdünnungsreihe von Vincristin im Bereich von 0,4882815- 312,5 ng/ml unter Addition von je 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Etoposid nach 24-stündiger Inkubation untersucht.

Die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahmekurve zeigte ein sofortiges Abfallen der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme um 54,08 % in der ersten Vincristin-Verdünnungsstufe (0,4882815 ng/ml). In der nächsten Konzentrationsstufe fiel der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake auf 19,54% bezüglich der Kontrolle und nahm im Verlauf weiter bis auf 10,56% der Kontrolle ab. Insgesamt überwog folglich die „uptakessenkende“ Wirkung von Vincristin gegenüber Etoposid und nahm einen ähnlichen Verlauf wie unter alleiniger Vincristingabe (s. Abb. 15).

Fast korrespondierend dazu entwickelte sich die Zellvitalität der OPM-2, die schon in der dritten Konzentrationsstufe (1,953125 ng/ml) auf unter 30% Überleben abgesunken war. Somit zeigte die Kombination aus den beiden Zytostatika eine synergistische Wirkung bzgl. der Toxizität auf das Zellüberleben der OPM-2 als die alleinige Gabe von Vincristin.

#### 4.4.2 Vitalitätstestung und $^{18}\text{F}$ -FDG -Aufnahmeversuch bei Kombination von Bortezomib und Doxorubicin



**Abbildung 21** OPM-2 Zellen blieben unbehandelt (0) oder wurden mit Bortezomib (Verdünnungsreihe) und Doxorubicin (je 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 24 Stunden lang inkubiert. Es wurde die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der OPM-2 (cpm/viable.cells, fold of control=1) und die Zellvitalität mit dem CellTiter-Glo® bestimmt (Kontrolle=100%). Die Ergebnisse sind der Mittelwert aus n=3. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Es wurde auch die Kombination aus Bortezomib und Doxorubicin getestet, um den  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake und die Zellvitalität zweier unterschiedlich auf den Glukosestoffwechsel wirkender Zytostatika auf die OPM-2 Zellen zu überprüfen. Dazu wurde eine Bortezomib-Verdünnungsreihe im Bereich von 1,953125-125 ng/ml in Kombination mit je 0,25  $\mu\text{g/ml}$  Doxorubicin erstellt.

Es zeigte sich bereits für die niedrigste Konzentrationsstufe (1,953125 ng/ml) eine sofortige Abnahme des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes auf 32,07% relativ zur Kontrolle. Es bildete sich für die folgenden Konzentrationen ein Plateau aus, in der sich die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme in einem engen Bereich zwischen 46,58 % (78,125 ng/ml) und 40,13 % (125 ng/ml) bezüglich der Kontrolle befand. Die Zellvitalität nahm in Doppelbehandlung zunächst fast linear auf 27,37 % lebender OPM-2 ab (3,90625 ng/ml), bevor sich eine langsamere Abnahme des Überlebens zeigte. Im Vergleich zur Einzelgabe von Bortezomib (s. Abb. 12) zeigte der Kurvenverlauf der OPM-2 in Doppelbehandlung einen deutlich steileren Abfall der Zellvitalität.

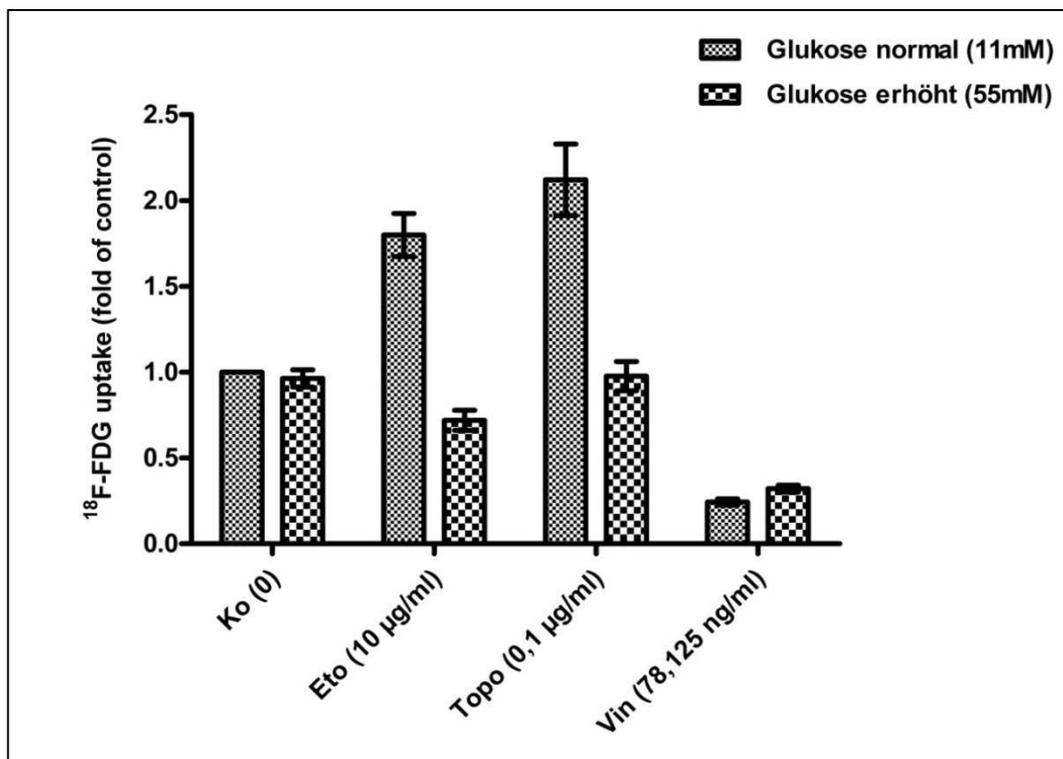
**Insgesamt** ließ sich so für die Kombination aus Bortezomib und Doxorubicin ein stark aufnahmehemmender Effekt für  $^{18}\text{F}$ -FDG in allen Konzentrationsstufen ermitteln. Sehr ähnlich dazu entwickelte sich die Überlebenskurve, die den synergistischen Effekt von Bortezomib und Doxorubicin auf das Zellüberleben OPM-2 verdeutlichte.

#### **4.5 Untersuchungen zum Glukosemetabolismus für Zytostatika in verändertem Nährmedium**

Um den Einfluss eines veränderten Nährstoffangebots auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der OPM-2 Zellen zu untersuchen, variierten wir den Glukoseanteil des Mediums. Das bisher verwendete „normale“ RPMI1640-Nährmedium wies eine Glukosekonzentration von 2 g/l (11 mM) auf. Durch Zugabe von D-Glucose erhöhten wir diese auf 10 g/ml (55 mM) und verglichen die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Etoposid, Topotecan und Vincristin bei normalem und künstlich erhöhtem Glukoseangebot. Für Etoposid und Topotecan wählten wir Konzentrationen (10  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ), in denen der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake in den Vorversuchen möglichst hoch war (s. Abb. 6 und 9). Für Vincristin wurde eine Konzentrationsstufe nahe des  $\text{IC}_{50}$  von 7,8125 ng/ml ausgewählt (s. Abb. 15).

Um zu ermitteln, wie sich ein restriktives Glukoseangebot auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der OPM-2 Zellen auswirken würde, verglichen wir den  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake im üblichen RPMI 1640 Medium (2 g/l Glukose) mit einem glukosefreien RPMI 1640. Die sonstige Zusammensetzung (10% FKS, 1% L-Glutamin und 1% P/S) blieb erhalten. Wir testeten die drei „uptakesteigernden“ Zytostatika Etoposid (10  $\mu\text{g/ml}$ ), Topotecan (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) und Doxorubicin (0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) nach 24-stündiger Inkubation in den beiden unterschiedlichen Medien. Es erfolgte eine Normierung der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake-Werte vitaler OPM-2 Zellen auf die Kontrolle (unbehandelte Probe) bei unveränderter Glukosekonzentration (fold of control=1).

#### 4.5.1 Untersuchung des Glukosemetabolismus mittels $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahmeversuch in Medium mit erhöhter Glukosekonzentration



**Abbildung 22** Die Abbildung zeigt die  $^{18}\text{F}$ -FDG -Aufnahme der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation in Nährmedien mit unterschiedlicher Glukosekonzentration für Etoposid, Topotecan und Vincristin. Es wurde der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake (CPM/viable cells) im Standardmedium (RPMI 1640, 11mM Glukose) mit dem eines glukosereichen Mediums (RPMI 1640, 55mM) verglichen. Die Werte wurden auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der Kontrolle (Ko) des normoglykämischen (11mM) Mediums bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus n=3 und der SEM.

Innerhalb der Kontrollen der beiden Medien zeigte sich kein messbarer Einfluss der erhöhten Glukosekonzentration auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme in unbehandelten OPM-2 Zellen. So betrug im Medium mit erhöhtem Glukoseanteil die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme 96,3% der Kontrolle mit normwertigem Glukoseanteil.

Nach Behandlung mit Etoposid (10 µg/ml) führte das vermehrte Glukoseangebot zu einem deutlichen Rückgang des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes in OPM-2. Während im Kontrollmedium mit 11mM Glukose die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme auf das 1,8-fache der Kontrolle anstieg, sank der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake der OPM-2 Zellen im Medium mit 55mM Glukose auf das 0,72-fache der Kontrolle, was einem Rückgang von 60,02 % entsprach.

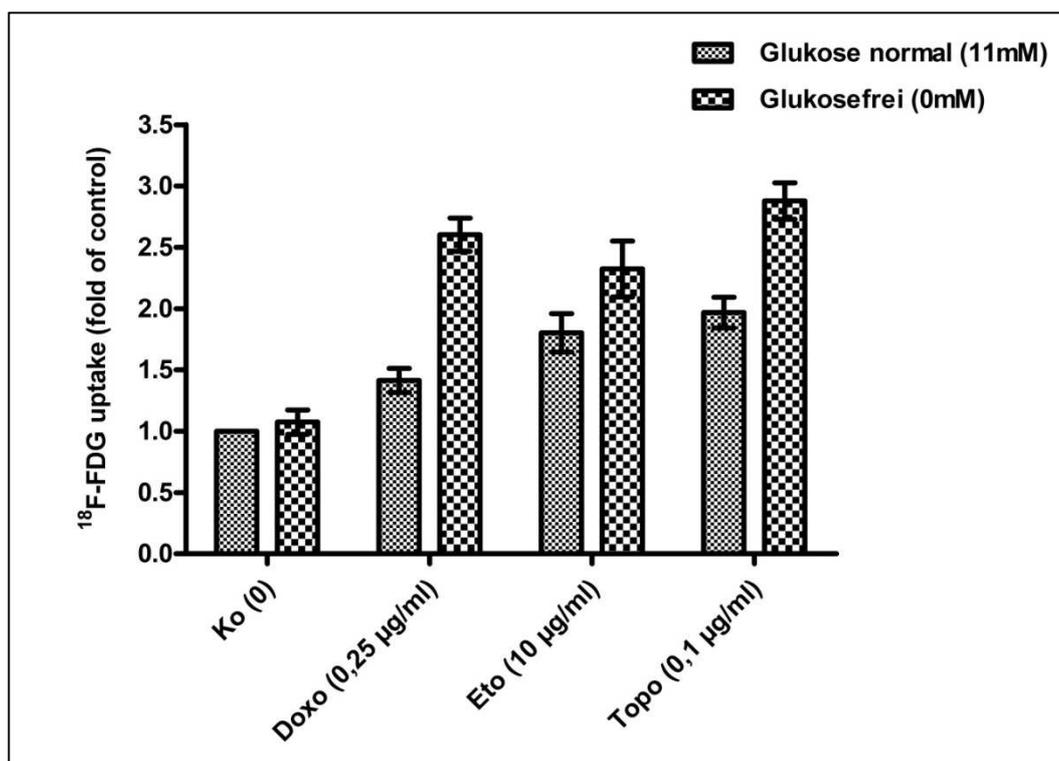
Für die Behandlung mit Topotecan ergab sich ein ähnliches Ergebnis. Während der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake der OPM-2 einen durchschnittlichen Anstieg auf das 2,12-fache des Ausgangsniveaus

verzeichnete, reduzierte sich die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der OPM-2 im erhöhten Glukosemedium um 53,95 % auf das 0,98-fache der Kontrollaufnahme.

Für Vincristin betrug der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake der OPM-2 im normalen Medium 24,4 % gegenüber 32,2% der Kontrolle im glukosereichen Medium. Dies entspricht einem Anstieg der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme um 32,04 % im Medium mit erhöhtem Glukoseanteil.

**In Zusammenschau** hatte die Erhöhung des Glukosegehalts des Nähstoffmediums für unbehandelte OPM-2 Zellen kaum einen Einfluss auf deren  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme. Unter Behandlung der OPM-2 Zellen mit den Topoisomerase-Hemmern Etoposid und Topotecan im Medium mit erhöhter Glukosekonzentration reduzierte sich deren  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme deutlich bis unter den Ausgangswert der Kontrolle. Dieser Effekt ließ sich für Vincristin nicht feststellen. Hier erhöhte sich die Aufnahme des  $^{18}\text{F}$ -FDG in OPM-2 Zellen leicht.

#### 4.5.2 Untersuchung des Glukosemetabolismus mittels $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahmeversuch in glukosefreiem Medium



**Abbildung 23** Die Abbildung zeigt die  $^{18}\text{F}$ -FDG -Aufnahme der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation in Nährmedien mit unterschiedlicher Glukosekonzentration für Doxorubicin, Etoposid und Topotecan. Es wurde der  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake (CPM/viable cells) im Standardmedium (RPMI 1640, 11mM Glukose) mit dem eines glukosefreien Mediums (RPMI 1640, 0mM) verglichen. Die Werte wurden auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der Kontrolle (Ko) des normoglykämischen (11mM) Mediums bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus n=3 und der SEM.

Im Vergleich beider Kontrollen zeigte sich eine minimale mittlere Zunahme der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme in OPM-2 um 7,46% zugunsten des glukosefreien Mediums.

Unter Behandlung der OPM-2 Zellen mit Doxorubicin im glukosefreien Medium ergab sich ein starker Anstieg des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes in um 84,1% vom 1,41-fachen auf das 2,6-fache der Kontrolle.

Nach Inkubation der OPM-2 mit Etoposid fiel der Anstieg der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme in den beiden unterschiedlichen Nährmedien geringer aus (plus 28,88 %) bei erhöhtem Aufnahme-Ausgangsniveau. Hier war die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme der OPM-2 im normoglykämischen RPMI1640-Medium um das 2,12-fache gesteigert und ließ sich im glukosefreien Medium auf das durchschnittlich 2,73-fache des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes der Kontrolle erhöhen.

Nach Behandlung der OPM-2 Zellen mit Topotecan in glukosefreiem Medium ergab sich eine  $^{18}\text{F}$ -FDG-Zunahme von im Mittel 46,2 % bezüglich des normoglykämischen Mediums.

Einer  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake-Steigerung von 81,6 % (f.c.) unter Topotecantherapie im normoglykämischen Medium stand eine  $^{18}\text{F}$ -FDG-Zunahme der OPM-2 im glukosefreien Medium von 165,64 % (f.c.) gegenüber.

**Zusammengefasst** hat der Entzug von Glukose im RPMI1640-Medium die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme in OPM-2 Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Topoisomerase-Hemmern weiter steigern können, besonders unter Therapie mit Doxorubicin und Topotecan. Die unbehandelte Kontrolle der OPM-2 wies in glukosefreiem Medium einen schwach gesteigerten  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake auf.

## 5. Diskussion

Tumorzellen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften erheblich von normalen Körperzellen. Sie sind unter anderem durch eine hohe Proliferationsrate, Umgehung von „Checkpoints“ des Zellzyklus, Resistenzentwicklung gegenüber Apoptose-induzierenden Signalen und Invasion ins Nachbargewebe gekennzeichnet (Levine and Puzio-Kuter 2010). Um dies alles zu ermöglichen, muss der Tumormetabolismus einen effizienten Energieumsatz gewährleisten. Hierbei spielt der Glukosestoffwechsel als ATP-Generator und Kohlenstofflieferant eine entscheidende Rolle für z.B. die Synthese von Proteinen, Aminosäuren und DNA-Bausteinen.

Otto von Warburg erkannte schon früh die Bedeutung der tumorspezifischen Glykolyse für die Energieversorgung in Tumorzellen. Der deutlich geringeren Energieausbeute (etwa 4 mol ATP/mol Glukose versus 36 mol ATP/mol Glukose bei der oxidativen Phosphorylierung) steht hierbei die hohe Geschwindigkeit der aeroben Glykolyse gegenüber (Warburg, Wind et al. 1927).

Lange Zeit wurde der Warburg-Effekt eher als ein Epiphänomen und weniger als eine mögliche Ursache der Karzinogenese betrachtet und die Forschungsschwerpunkte lagen vermehrt auf der Klärung der Entstehung und Bedeutung genetischer Aberrationen in Tumoren.

Maßgeblich durch die Etablierung der Positronen-Emissions-Tomographie im klinischen Alltag und der Verwendung von Tracern wie der  $^{18}\text{F}$ -2-Fluoro-2-Deoxyglukose, ist der spezifische Glukosemetabolismus von Tumorzellen mittlerweile von großem diagnostischem Nutzen und Gegenstand therapiebezogener Forschung (Hanahan and Weinberg 2011, Bayley and Devilee 2012).

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit dem Einfluss von DNA-schädigenden, klinisch-etablierten Zytostatika auf Mechanismen der zellulären DNA-Reparatur (DNA damage response), vor allem den DNA-(Doppel)strangbrüchen. Wir legten den Fokus dabei besonders auf die Interaktion dieser potentiell genotoxischen Substanzen mit dem Glukosestoffwechsel und die Auswirkung auf das Zellüberleben von Myelomzellen (OPM-2).

In unserer Versuchsanordnung wurden zunächst OPM-2 Zellen mit Verdünnungsreihen fünf verschiedener Chemotherapeutika behandelt, wobei die DNA-schädigenden Topoisomerase-Hemmstoffe Doxorubicin, Etoposid und Topotecan den „Kontroll“-Zytostatika Bortezomib (Proteasom-Inhibitor) und Vincristin (Mitose-Hemmer) gegenübergestellt wurden, die beide keine direkten DNA-Schäden verursachen.

Die Glukoseaufnahme von OPM-2 Zellen unter Behandlung wurde mittels in vitro Quantifizierung im  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake charakterisiert und der Einfluss auf die Überlebensrate mittels eines Vitalitätsassays bestimmt, der luminometrisch den ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen erfasste. Auf molekularer Ebene wurden die Expressionsmuster des Glukosetransporters-1 (GLUT-1), des glykolytischen Schlüsselenzyms Hexokinase II (HKII) und der Reparatur- und Apoptosenzyme PARP-1 und Cleaved caspase-3 nach zytostatischer Behandlung bestimmt.

Im weiteren Verlauf versuchten wir die bis dato ermittelten Ergebnisse zu Glukoseaufnahme und Vitalität der OPM-2 durch den kombinierten Einsatz von Zytostatika und molekularer Inhibitoren von relevanten Signalkaskaden zu modifizieren. Dazu entschieden wir uns zum einen für Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs (BEZ235, MK-2206), da dieser in Bezug auf die metabolische Transformation in Tumorzellen sehr häufig aberrant ist und auf vielen Ebenen den Glukosestoffwechsel beeinflusst (Jones and Thompson 2009).

Zum anderen galt es herauszufinden, ob nach Induktion von DNA-Strangbrüchen die zusätzliche Inhibition der besonders für die homologe Rekombination wichtigen Kinase ATM (Blockade durch KU55933) oder der für die nicht-homologen Reparatur maßgeblich bedeutsamen DNA-Pkcs (Blockade durch NU7026) das Überleben durch Hemmung des Glukosestoffwechsels in OPM-2 Zellen gesenkt werden könnte.

Diverse Studien in zurückliegenden Jahren haben gezeigt, dass ein intakter Tumorglukosemetabolismus mit einer Apoptose-Resistenz und einem verbessertem Langzeit-Überleben von Tumorzellen assoziiert ist (Vaughn and Deshmukh 2008, Yun, Rago et al. 2009). Dabei wurde oft die Bedeutung der Glukosetransporter und der Hexokinase betont, u.a. auch deswegen, weil Stoffwechselanalysen in Tumorzellen ergeben haben, dass diese beiden Moleküle mit etwa 70% den Hauptanteil an der Steuerung des Glukoseflusses in Tumorzellen übernehmen (Rodriguez-Enriquez, Marin-Hernandez et al. 2009).

Auch die verstärkte Expression von GLUT-1 und der Hexokinase II im Grundzustand und deren Korrelation zur erhöhten  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme ist bereits für etliche Tumorentitäten beschrieben worden (Binder, Binder et al. 1997, Ong, Jin et al. 2008). Wir konnten dies für unsere Myelomzellen bestätigen, die ebenfalls im unbehandelten Kontrollzustand bereits einen guten  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake und eine stabile Expression von Hexokinase II und GLUT-1 aufwiesen.

Es wurden bisher wenige Untersuchungen durchgeführt, die den inhibitorischen Einfluss von DNA-Schäden induzierender Substanzen (in diesen Fällen: Cisplatin, Camptothecin, Doxorubicin, Etoposid) auf die Regulation der Glukosetransportergene und der glykolytischen Aktivität zum Thema hatten (Zhou, Vander Heiden et al. 2002, Watanabe, Naraba et al. 2010).

Nach Durchführung unserer experimentellen Versuchsreihe ließen sich für die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme von OPM-2 grob gefasst zwei unterschiedliche Verlaufsmuster der Tracer-Aufnahme erkennen, je nach Wirkmechanismus der Chemotherapeutika: unter Behandlung mit den DNA-Strangbruch-induzierenden Topoisomerase-Hemmstoffen Doxorubicin, Etoposid und Topotecan kam es in OPM-2 Zellen überraschenderweise zu einer erheblichen, gut reproduzierbaren Steigerung der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme in niedrigen bis mittleren Konzentrationsbereichen im Vergleich zur Kontrolle (z.T. auf mehr als das Doppelte).

Im Gegensatz dazu führte die Therapie mit dem Proteasom-Hemmer Bortezomib und dem Mitosehemmer Vincristin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einem sofortigen, stark verringerten  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake.

Die vermehrte Tracer-Aufnahme unter Topoisomerase-Hemmstoff-Therapie korrelierte in der ATP-Vitalitätstestung mit einem Überlebensvorteil der OPM-2 Zellen in diesen Konzentrationsbereichen. Auffällig war dabei die entsprechend zur Kontrolle gesteigerte Expression von GLUT-1 und Hexokinase II in der proteinbiochemischen Analyse. Die Ergebnisse zeigten, dass OPM-2 Zellen auf exogene, subletale Schädigungen ihrer DNA mit einer Erhöhung der glykolytischen Kapazität über eine vermehrte Glukoseaufnahme und -verarbeitung zu reagieren vermochten. Für die Zellen dürfte dies sowohl Vorteile in der ATP-abhängigen DNA-Reparatur als auch in der Bereitstellung von Phospholipidgerüsten, Nukleotiden zur DNA-Synthese aus dem Pentosephosphatweg etc. bedeuten. Diese metabolische Hochregulation trug zu einer relativen Resistenzausbildung gegenüber den eingesetzten genotoxischen Zytostatika bei.

Unter Bortezomib- und Vincristin-Einsatz hingegen zeigte sich in den Myelomzellen eine hochsensitive, eindruckliche ATP-Depletion bei frühzeitiger Herunterregulation von GLUT-1 und Hexokinase II. Offensichtlich konnten die OPM-2 Zellen unter Einfluss dieser Substanzen die Störung im Ablauf der aeroben Glykolyse nicht kompensieren, sodass der Zelltod initiiert wurde.

Die Bedeutung einer hochregulierten Glukoseaufnahme über Glukosetransporter auf das Überleben von Tumorzellen ist bekannt. Wachstumsfaktorabhängige, hämatopoetische Vorläuferzellen konnten im Falle einer Überexpression von GLUT-1 apoptotische Vorgänge verlangsamen, nachdem ihnen der essentielle Wachstumsfaktor (IL-3) entzogen worden war (Vander Heiden, Plas et al. 2001). Watanabe et al. konnten zeigen, dass durch eine Behandlung mit Doxorubicin und Etoposid die Expression von GLUT-3, nicht aber die von GLUT-1 in HeLa-Zellen vermindert werden konnte (Watanabe, Naraba et al. 2010).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht nur exogen zugeführte Substanzen, sondern auch Veränderungen im Umgebungs- und Nährstoffmilieu der Zelle zu ähnlichen Modulationen der Expression von Glukosetransportern führen können und so auf ein gemeinsames, grundlegendes Reaktionsmuster der Tumorzellen in zellulären „Stresssituationen“ hinweisen.

In unserer Testreihe waren OPM-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit allen drei Topoisomerase-Hemmstoffen in glukosefreiem Medium imstande, die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme weiter zu steigern. Auch der Sachverhalt, dass Doxorubicin (ein Anthrazyklin, zugleich Topoisomerase-II-Hemmer), Etoposid (reiner Topoisomerase-II-Hemmer) und Topotecan (Topoisomerase-I-Hemmer) genaunommen leicht unterschiedliche Wirkweisen aufweisen, führte zu sehr ähnlichen  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes und Expressionsmustern von GLUT-1 und Hexokinase II in OPM-2.

Trotzdem erschweren sicherlich die spezifischen Charakteristika von Zellarten unterschiedlichen Ursprungs und der Grad der Zellentwicklung die allgemeine Vorhersagbarkeit des Ansprechverhaltens von Tumorzellen auf DNA-schädigende Substanzen. Beispielsweise reagierten hämatopoetische Vorläuferzellen aus fetalen, murinen Leberzellen auf genotoxische Stressoren (Etoposid, Cisplatin,  $\gamma$ -Strahlung) mit einer stark verminderten Expression von GLUT-1 und GLUT-3, verbunden mit einer Störung der glykolytischen Aktivität (schon nach etwa 4-stündiger Inkubation), aber auch in der Folge der mitochondrialen Funktionalität dieser Zellen (Zhou, Vander Heiden et al. 2002).

Während unter der Behandlung mit Topoisomerase-Hemmstoffen die hohe Expression von GLUT-1 auch in höheren Konzentrationen erhalten blieb, korrelierte die Abschwächung der Expression von Hexokinase II mit einer vermehrten Spaltung von Caspase-3 und PARP-1 und mit einem ATP-Abfall im Vitalitätsassay und damit dem Zelltod der OPM-2. Es ist vorstellbar, dass die Behandlung zu einer Dissoziation der für viele Tumorarten mit aerober Glykolyse beschriebenen Bindung der Hexokinase II vom spannungsabhängigen Anionen-Kanal an der mitochondrialen Außenmembran führte und so den Zelltod initiierte. Diese Bindung ist bereits oft als ausschlagendgebend für den Warburg-Effekt und daher als interessanter, therapeutischer Angriffspunkt beschrieben worden (Mathupala, Ko et al. 2009).

Beispielsweise zeigte eine Arbeit von Nakano et al. an Hexokinase II-überexprimierenden Myelomzellen, dass eine Hemmung der Hexokinase II durch das synthetische Molekül 3-Bromopyruvat (3BrPA) möglich ist und eine ATP-Reduktion und Apoptose-Induktion in diesen Zellen auslöste (Nakano, Miki et al. 2012). Eine dazu verwandte Studie konnte nachweisen, dass durch den von 3-Bromopyruvat bedingten ATP-Abfall die Funktion von ATP-abhängigen Efflux-Pumpen (ABC-Transporter-Familie) in diesen Myelomzellen beeinträchtigt wurde. Die-

ser Transporter-Typ wird oft in Zusammenhang mit der Ausbildung einer multiplen Medikamenten-Resistenz gebracht, da dieser in ATP-abhängiger Weise Medikamente aus dem Zellinneren zu entfernen vermag. In dieser Versuchsreihe konnte durch die ATP-Depletion eine vorherige Resistenzbildung der Myelomzellen gegenüber einer Doxorubicin-Behandlung rückgängig gemacht werden (Nakano, Tsuji et al. 2011). Es ist nicht auszuschließen, dass bei der Behandlung unserer OPM-2 Zellen mit Topoisomerase-Hemmstoffen dieser Resistenzmechanismus zum beobachteten anti-apoptotischen Effekt beigetragen haben könnte.

Insgesamt blieb nach Einzelbehandlung mit den DNA-schädigenden Substanzen festzuhalten, dass nur sehr hohe Zytostatika-Konzentrationen in OPM-2 Zellen zu einer relevanten Senkung des ATP-Gehalts und Abnahme von GLUT-1 führten, die für benigne Körperzellen wohl hochtoxische Nebenwirkungen bedeuten würden. In der Folge versuchten wir eine tumorselektivere und synergistische Wirkung auf den Glukosestoffwechsel durch Einsatz molekularer Inhibitoren des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs (BEZ235, MK-2206), von ATM (KU55933) und DNA-Pkcs (NU7026) zu erzielen.

Besonders auffällige Ergebnisse ließen sich in Kombinationsversuchen der Topoisomerase-Hemmstoffe mit dem dualen PI3K/mTor-Inhibitor BEZ235 erzielen, der schon in Einzelgabe sowohl die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme auf unter Kontrollniveau senken konnte als auch die Expression von GLUT-1 und Hexokinase II deutlich abschwächte. Es ist gut belegt (z.B. für Glioblastom- und Lymphomzellen), dass BEZ235 neben der dualen Hemmung von PI3K und mTORC 1/2 ebenfalls die Phosphatidylinositol-3-kinase verwandten Kinasen (PIKKs) ATM und DNA-Pkcs blockieren und über diese kombinierte Inhibition der homologen wie auch nichthomologen DNA-Doppelstrangreparatur (DSB) eine medikamentöse Resistenzentwicklung dieser Tumorzellen überwinden konnte (Mukherjee, Tomimatsu et al. 2012, Shortt, Martin et al. 2013). In diesen Studien überwog der DSB-Reparatur-inhibierende und damit Zelltod-induzierende Effekt von BEZ235 den von selektiven Inhibitoren der DNA damage response (u.a. KU55993, NU7026).

Eine gesteigerte Apoptose-Induktion durch BEZ235 wurde auch bereits für Myelomzellen nachgewiesen (Baumann, Mandl-Weber et al. 2009, McMillin, Ooi et al. 2009), jedoch hatte keine dieser Studien dies auf Veränderungen in der Expression von glykolytischen Markern zurückgeführt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Kombination aus BEZ235 und den Topoisomerase-Inhibitoren am effektivsten zu einer konstanten Herunterregulierung von GLUT-1 (und HK II) bei gleichzeitiger, starker Spaltung von Caspase-3 und PARP-1 führte. Die Studienlage verdichtet sich dahingehend, dass eine duale Inhibition von PI3K/Akt bzw. der verwandten PIKK-Enzyme und mTORC1/2 notwendig ist, um die Apoptose in Krebszellen zu induzieren (Muller, Zang et al. 2013). Der Einsatz des klinisch häufig getesteten mTORC1-Inhibitors Rapamycin limitierte sich aufgrund einer Aktivierung von Akt (pAkt) durch Rapamycin-induziertes mTORC2 mit Resistenzausbildung gegen diesen Wirkstoff (Ramakrishnan, Kimlinger et al. 2012).

Die Notwendigkeit einer Hemmung mehrerer paralleler und/oder untergeordneter Signalkaskaden wurde auch für bestimmte Translokations-Subtypen von Myelomzellen festgestellt, bei denen rückgekoppelte Aktivierungssignale von PI3K und mTOR unterhalb des MAP (mitogen-activated protein)-Kinase-Signalwegs dafür sorgten, dass einzeln gegen Akt oder den mTOR-Komplex gerichtete Medikamente inaktiviert wurden (Stengel, Cheung et al. 2012).

Der Einfluss der getesteten ATM und DNA-PKcs-Inhibitoren in Kombination mit den Topoisomerase-Hemmstoffen auf den Zelltod und die Expression von GLUT-1 und HKII in OPM-2 war nachweisbar, aber nicht so evident wie im Falle von BEZ235. Dies kann möglicherweise damit erklärt werden, dass diese Reparatur-Kinasen besonders von bestimmten Zellcharakteristika wie Tumorsuppressorgen-Status, Zellzyklusphase, Proliferationsindex etc. abhängig sind. So konnte etwa der ATM-Inhibitor KU55933 einen Etoposid-induzierten DNA-Schaden nur in hochproliferativen, aber nicht in ruhenden Leukämie-Zellen verstärken (Korwek, Sewastianik et al. 2012). Es wurde auch gezeigt, dass eine ATM-Inhibition nur in p53-defizienten Tumorzellen zu einer Sensibilisierung gegenüber DNA-schädigenden Substanzen führte. Gleichzeitig konnte in diesen Zellen der Defekt in der homologen Rekombination (verursacht durch die ATM-Inhibition) dazu genutzt werden, unter gleichzeitiger Suppression von DNA-Pkcs (und damit der sequenzspezifischen Rekombination) eine Resensibilisierung gegenüber Doxorubicin-induzierten Doppelstrangbrüchen zu erreichen (Jiang, Reinhardt et al. 2009).

Unserer Datenlage nach war der DNA-PKcs- Inhibitor NU7026 ebenfalls gut geeignet, in Kombination mit den Topoisomerase-Hemmstoffen eine Abschwächung der GLUT-1 und Hexokinase-II-Expression und Spaltung von Caspase-3 zu induzieren. Da DNA-PKcs, neben seiner Rolle als Reparaturenzym, eine wichtige Funktion in der Interaktion mit dem Onkogen Akt nach DNA- Doppelstrangbrüchen einnimmt (Bozulic, Surucu et al. 2008), könnte die mög-

liche Entwicklung von dualen DNA-PKcs/PI3K/Akt-Inhibitoren durchaus eine therapeutische Option beim multiplen Myelom darstellen.

Die Mutation der anti-apoptotisch und proliferationsfördernd wirkenden Serin/Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B) ist ein häufiges Phänomen in Tumorzellen und eine mögliche Ursache für Resistenzen gegenüber Radio- und Chemotherapien (Bellacosa, Kumar et al. 2005). Nach Wachstumsfaktorentzug konnte für hämatopoetische Zellen gezeigt werden, dass Akt für eine post-transkriptionelle Hochregulierung der Glykolyse verantwortlich war, vor allem über eine verstärkte Expression von GLUT-1 und Hexokinase. Die vermehrte Glukoseaufnahme und Bereitstellung von Coenzymen (NAD(P)H) konnte den Zelltod über die Hemmung des pro-apoptotischen Bax verhindern. (Rathmell, Fox et al. 2003).

Akt scheint auch die bereits erwähnte, die aerobe Glykolyse aufrechterhaltende Bindung der Hexokinase II an die mitochondriale Außenmembran zu stabilisieren (Gottlob, Majewski et al. 2001). Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Akt-Inhibitor MK-2206 in Kombination mit den Topoisomerase-Hemmstoffen zu einer deutlichen Expressionsminderung von Hexokinase II führte und die Spaltung von Caspase-3 hervorrief. Nachdem auch die Reparaturenzym-Inhibitoren (KU55933, NU7026) eine sehr ähnliche Reaktion bewirkten, deutet dies auf eine mögliche Schnittstelle im metabolischen Programm der Tumorzelle mit der DNA damage control hin. Wir gehen davon aus, dass das Zusammentreffen einer fehlerhaften DNA-Rekombination und eines hoch aktiven Akt potentiell eine genomische Instabilität mit Deregulation des Glukosestoffwechsels in OPM-2 zur Folge hat.

Insgesamt konnten wir in unserer Arbeit zeigen, dass eine Behandlung von Myelomzellen des Typs OPM-2 mit Zytostatika (je nach Wirkweise) zu unterschiedlichen Veränderungen in der zellulären Aufnahme und Verwertung von  $^{18}\text{F}$ -FDG führte. Auf proteinbiochemischer Ebene konnten wir dies anhand der Parameter GLUT-1 und Hexokinase II nachvollziehen. Interessanterweise reagierten OPM-2 Zellen auf DNA-schädigende Substanzen wenig sensibel und erzielten einen relativen Überlebensvorteil. Parallel ließ sich eine Erhöhung der beiden Glukoseparameter beobachten, was für eine enge Interaktion des Glukosemetabolismus mit der DNA damage response control spricht.

Subletale DNA-Schäden kurbelten die aerobe Glykolyse in OPM-2 weiter an, was zu der Annahme führte, dass über die erhöhte Bereitstellung des Energieträgers ATP (und seiner Zwischenprodukte und Redoxäquivalente für andere Stoffwechselwege) neben replikativer Vorgänge die Zellhomöostase und die DNA-Reparatur effizient sichergestellt werden konnte. Das bedeutet auch, dass der transformierte Glukosemetabolismus in Myelomzellen kein statisches Element darstellte, sondern auf interne und externe Stressoren mit einer dynamischen Hochregulation zu reagieren vermochte.

Eine weitere Kernaussage unserer Datenlage ist, dass der Zelltod von OPM-2 nach hohen Konzentrationen von Topoisomerase-Hemmern und sehr niedrigen von Bortezomib und Vincristin stabil mit einer nahezu dosisabhängigen Abnahme der Hexokinase II-Expression verbunden war. Dies betont die Wichtigkeit der Hexokinase-Aktivität in Bezug auf das Tumorzellüberleben, da selbst bei erhaltener Glukoseaufnahme über GLUT-1 die fehlende Phosphorylierung der aufgenommenen Glukose und die erwähnte Disruption der mitochondrialen Homöostase bei Hexokinase-Ausfall eine Caspasen-Aktivierung in Myelomzellen zur Folge hatte.

Vermutlich ist die signifikante Abnahme der aeroben Glykolyse das entscheidende Signal für die Zelle, auch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien einzustellen. Deren Bedeutung für die ATP-Produktion und Bereitstellung von NAD(H) für die Glykolyse in Tumorzellen wird in neueren Forschungsergebnissen vermehrt betont (Moreno-Sanchez, Marin-Hernandez et al. 2014), sodass sich die korrekte Funktion von aerober und anaerober Glykolyse in Tumorzellen wechselseitig zu bedingen scheinen.

Wir konnten ebenfalls die Bedeutung und Effektivität der therapeutischen Intervention des „Energistoffwechsel-Signalwegs“ PI3K/Akt/mTOR zur tumorselektiveren Wirkung auf OPM-2 demonstrieren. Neben der oben diskutierten, direkten Wirkung der Inhibitoren lässt sich besonders über das Onkogen Akt eine Beeinflussung der DNA-Reparatur vermuten (s. auch Abb.1)

Ein wichtiger Schritt der Histon-Modifikation der DNA zur Öffnung der Chromatin-Struktur (bedeutsam für die Transkription) beruht auf der Acetylierung der Nukleotide durch Acetyl-CoA. Dieses Acetyl-CoA wird in einem ATP-abhängigen Schritt durch das Enzym ATP-Citrat-Lyase aus von der Glykolyse stammendem Citrat gebildet, wodurch der Zellglukosemetabolismus indirekt mit der Genexpression verknüpft ist (Wellen, Hatzivassiliou et al. 2009). Neue Studien zeigen, dass das Acetyl-CoA/CoA- Verhältnis dynamisch über die Glukoseverfügbarkeit reguliert wird. Zudem kann Akt über Phosphorylierung der ATP-Citrat-Lyase selbst bei niedrigem zellulären Glukoselevel die Histon-Acetylierung aufrechterhalten und dadurch weiterhin auf DNA-Schäden reagieren (Lee, Carrer et al. 2014). Neben den in der Einleitung diskutierten ATP-abhängigen Prozessen, mag dies einen weiteren Mechanismus darstellen, wie Glukosestoffwechsel und DNA damage control in Tumorzellen interagieren.

Es gilt weiter zu erforschen, über welche anderen Mechanismen und Signalwege Zytostatika den glykolytischen Status von Tumorzellen im Allgemeinen und von Myelomzellen im Besonderen zu beeinflussen vermögen. Beispielsweise ließe sich unsere Versuchsreihe durch die Detektion weiterer involvierter Glukosetransporter und veränderter Expressionsmuster von Enzymen wie Pyruvatkinase (besonders PK-M2), Laktatdehydrogenase, Phosphofruktokinase etc. erweitern. Neben einem schon länger erforschten „metabolic targeting“ der eben erwähnten Enzyme über synthetische Moleküle, werden mittlerweile auch direkte Inhibitoren der Glukosetransporter (z.B. GLUT-1) erfolgversprechend getestet (Wu, Ho et al. 2009, Liu, Cao et al. 2012).

Zusätzlich zu den von uns durchgeführten Experimenten würden eine methodische Erweiterung der Versuchsreihe durch immunhistochemische Verfahren oder der PCR, z.B. unter Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Glukoseregulation, sowie die Verifizierung der Ergebnisse an weiteren Myelom-Zelllinien eine sinnvolle Ergänzung darstellen.

Auch Untersuchungen zum jeweiligen Phosphorylierungs- und damit Aktivierungsstatus des Onkogens Akt (pAkt) wären interessant, um die Rolle von Akt als mögliche „Drehscheibe“ in der Interaktion von DNA damage response und Glukosestoffwechsel weiter herauszuarbeiten. Um die Integration genetischer und metabolischer Forschung weiter voranzutreiben, dürfte es von Relevanz sein, den Status von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen wie p53 und PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) in den Zellen zu ermitteln, da etwa der Verlust von p53 oft einen wichtigen Schritt in der Deregulation der glykolytischen und Glukosetransportergen-Aktivität darstellt (Bensaad, Tsuruta et al. 2006).

Neben den „klassischen“ in-vitro Versuchen sollte auch das Potential der  $^{18}\text{F}$ -FDG Bildgebung Beachtung finden. So könnte überprüft werden, ob sich die vorliegenden in-vitro Ergebnisse zum modulierten Tumorglukosestoffwechsel nach Zytostatika/Inhibitor-Therapie in  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-Messungen als reproduzierbar erweisen. Es wurde beispielsweise an 3D-Tumorsphäroiden in-vitro die Wirksamkeit von PI3K-Inhibitoren (u.a. BEZ235) anhand der Abnahme des  $^{18}\text{F}$ -FDG uptakes gemessen und das Potential als Frühmarker in der Therapieresponsivität hervorgehoben (Kelly, Hussien et al. 2012). Auch für die Inhibition von Akt konnte im Tierversuch die Bedeutung des  $^{18}\text{F}$ -FDG PET als pharmakodynamischer Biomarker zur Evaluation der anti-tumoralen Aktivität nachgewiesen werden (Maynard, Ricketts et al. 2013).

Idealerweise könnte die  $^{18}\text{F}$ -FDG Bildgebung dazu eingesetzt werden, unwirksame Therapien am Patienten rechtzeitig zu erkennen und in Tumorzellen konstitutiv aktivierte Signalwege zu identifizieren helfen. Diesbezüglich weist unsere Arbeit an Myelomzellen auf die potentielle Einschränkung hin, dass eine chemotherapeutische Vor- oder Parallelbehandlung beim Patienten Einfluss auf die  $^{18}\text{F}$ -FDG Verwertung in Tumorzellen nehmen und damit die Beurteilbarkeit des Behandlungserfolgs einschränken kann.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Möglichkeiten zur Beeinflussung des Glukosemetabolismus von humanen malignen Myelomzellen (OPM-2) durch Zytostatika und mit molekularen Mechanismen, durch die der Glukosestoffwechsel mit Zellvitalität und DNA-Reparaturmechanismen (DNA damage response) in Verbindung steht.

Dazu wurden in der klinischen Routine verwendete Zytostatika an OPM-2 Zellen in-vitro getestet. Die Glukoseaufnahme wurde mittels Messung der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme im  $\gamma$ -Counter quantifiziert und mit der Vitalität (ATP-Assay), der Aktivierung von Caspasen sowie der Expression des Glukosetransporters-1 (GLUT-1) und der Hexokinase II (Schlüsselenzym der Glykolyse) korreliert.

Es zeigte sich, dass Topoisomerase-Hemmstoffe (Doxorubicin, Etoposid und Topotecan), die potentiell (Doppel)strangbrüche der DNA verursachen können, im niedrigen bis mittleren Konzentrationsbereich die zelluläre  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme verstärkten und dies einen Überlebensvorteil für OPM-2 Zellen bedeutete. Höhere Konzentrationen hemmten die  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme und induzierten eine Caspasen-abhängige Apoptose in OPM-2. Zytostatika mit anderen Wirkmechanismen (Bortezomib und Vincristin) hemmten hingegen den  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake bereits in niedrigsten Konzentrationen.

Western Blots ergaben eine konstitutive Expression von GLUT-1 und Hexokinase II in OPM-2 Zellen in der unbehandelten Kontrolle, die bei niedrigen bis mittleren Konzentrationen der DNA-schädigenden Zytostatika in Korrelation mit der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme verstärkt exprimiert wurden. Bei den Nicht-DNA-schädigenden Zytostatika nahm die Expression der beiden Glukosestoffwechselfparameter GLUT-1 und Hexokinase II dosisabhängig ab.

Zytostatika-Kombinationen (Bortezomib/Doxorubicin, Vincristin/Etoposid) zeigten synergistische Effekte auf OPM-2, sowohl in Bezug auf den Rückgang der Glukoseaufnahme als auch auf die Zytotoxizität.

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass es bei DNA-schädigenden Medikamenten infolge des durch die DNA damage response verstärkten Energieverbrauchs zu einer Steigerung der Glukoseaufnahme und -verwertung in OPM-2 Zellen kommt, die für nicht-DNA-schädigende Substanzen oder in Kombinationsbehandlungen nicht festgestellt werden konnte.

Es wurde deshalb untersucht, ob spezifische Inhibitoren von Schlüsselenzymen der DNA -Strangbruch-Reparatur (sog. PIKKs, ATM und DNA-PKcs) und des Energiestoffwechsel-Signalwegs PI3K/Akt/mTOR (BEZ235 und MK-2206) die nach DNA-Schädigung reaktiv gesteigerte Glukoseaufnahme hemmen können. In Kombination der Inhibitoren mit den „uptake-

steigernden“ Topoisomerase-Hemmstoffen konnte eine Senkung der  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme beobachtet werden, bei gleichzeitiger Abnahme der Aktivität von Hexokinase II und teils von GLUT-1. Die verminderte Expression der Hexokinase II korrelierte mit der Aktivierung von „Apoptose- und Reparaturmarkern“ (Cleaved Caspase-3, Cleaved PARP).

Es kann somit eine Interaktion des Glukosestoffwechsels mit der DNA damage response angenommen werden, wobei DNA-schädigende Zytostatika die Glukoseaufnahme über eine Stimulation der für die aerobe Glykolyse essentiellen Transporter und Enzyme in Myelomzellen zu steigern vermögen. Die Myelomzellen erzielen dadurch einen Überlebensvorteil und relative Unempfindlichkeit gegen entsprechende Zytostatika. Dieser Effekt kann durch molekulare Inhibitoren der oben genannten Wachstums- und Reparatursignalwege blockiert werden.

## 7. Tabellenverzeichnis

### 7.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid 30%/0,8%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfatlösung 10% (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-cleaved caspase-3 (#9664)	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Anti-GLUT-1 monoklonal (Clone SP168)	SpringBioscience, Pleasanton, USA
Anti-Hexokinase II polyklonal (AB3279)	Millipore, Temecula, USA
Anti-PARP-1 (#9542)	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Anti- $\alpha$ -Tubulin (T8203)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aqua destillita steril	Apotheke des RKI, München
CellTiter-Glo® Cell Viability Assay	Promega, Madison, USA
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Basel, Schweiz
D-Glukose	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DTT (Ditriotheitol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol 70%	Apotheke des RKI, München
Fetales Bovines Serum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Goat anti-Mouse IgG, Sekundär-Ak (#AP124P)	Millipore, Temecula, USA
Goat anti-Rabbit IgG, Sekundär-Ak (#AP132P)	Millipore, Temecula, USA
KU55933 (ATM-Inhibitor)	Selleck Chemicals, Houston, USA
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MK-2206 (Akt 1/2/3-Inhibitor)	Selleck Chemicals, Houston, USA
NU7026 (DNA-PKcs-Inhibitor)	Selleckchem, Houston, USA
NVP-BEZ235 (PI3K/mTOR-Inhibitor)	Selleckchem, Houston, USA

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Rockford,USA
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford,USA
RIPA Lysis Buffer, 10X (20-188)	Millipore, Temecula, USA
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Bio-Rad, München, Deutschland
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Perbio Science Germany, Bonn, Germany
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TRIS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblaulösung 0,5%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

## 7.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Eppendorf	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Analysewaage, Typ LA 230S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Brutschrank Typ 6000	Heraeus, Berlin, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+ System	BioRad, München, Deutschland
Countess® Automated Cell Counter	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Gamma-Counter Typ 1480 Wizard TM3	Wallac, Turku, Finnland
Gefrierschrank (-20 °C)	Heraeus, Berlin, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	Heraeus, Berlin, Deutschland
Heraeus Fresco Microcentrifuge	Heraeus, Berlin, Deutschland
Laminair Flow HB 2472	Heraeus, Berlin, Deutschland
Mikroskop, Aktiovert 10	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Milli-Q UF Plus	Millipore, Temecula, USA

Mini Trans-Blot® Cell	BioRad, München, Deutschland
Doppel-Elektrophorese-Kammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mithras LB 940, Mikroplattenleser	Berthold Technologies, Deutschland
pH-Meter, pH 522	WTW, Weilheim, Deutschland
pipetus®-akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Vortex-Genie	Bender/Hobei AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wellplattenleser BioTek Elx800TM	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Zentrifuge, Megafuge	Heraeus, Berlin, Deutschland

### 7.3 Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Photoshop Elements 10	Adobe Systems, San Jose, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageLab	Bio-Rad, München, Deutschland
KC Junior	Bio-Tek Instruments, London, UK
Microsoft Office 2010 Windows	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
MikroWin	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Deutschland
Thomson EndNote X7	Thomson Reuters, New York, USA

## 7.4 Verbrauchsmaterial

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Countess® Chamber Slides	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Safe-Lock-Reaktionsgefäß (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon® Zentrifugenröhrchen (5ml, 15ml, 50ml)	Corning, Bodenheim, Deutschland
Kulturflaschen mit Filter (75, 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner, Solingen, Deutschland
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PVDF-Membran (0,2µm)	Peqlab Biotechnologie
Tissue Culture Plate 24-well	Greiner, Solingen, Deutschland
Tissue Culture Plate 6-well	Greiner, Solingen, Deutschland
Tissue Culture Plate 96-well	Greiner, Solingen, Deutschland
Whatman Paper, 7,5x10cm	Bio-Rad, München, Deutschland

## 8. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** Schematische Darstellung wichtiger Bestandteile der Glykolyse (rechts), des PI3K/Akt/mTOR- Signalwegs (mittig), der DNA damage response (links) und verwendeter molekularer Inhibitoren. Es soll verdeutlicht werden, wie diese Signalpfade untereinander verknüpft sind und wie Tumorzellen ihren Glukosemetabolismus in Reaktion auf genotoxischen Stress regulieren könnten. (→) steht für Aktivierung, (⊥) steht für Hemmung des entsprechenden Vorgangs. Es sind auch die im Verlauf eingesetzten Inhibitoren mit ihren Zielenzymen eingetragen (BEZ235, KU55933, MK-2206, NU7026). ..... 12
- Abbildung 2** Konzentrationsabhängige  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme (counts per minute) vitaler OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Doxorubicin. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme der unbehandelten Kontrolle (0) wurde auf den Wert 1 normiert und die der Konzentrationen als Vielfaches bzw. Bruchteil davon berechnet (fold of control). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Mittelwerte aus n=5..... 23
- Abbildung 3** Konzentrationsabhängige Überlebenskurve der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Doxorubicin. Mit dem CellTiter-Glo® wurde der ATP-Gehalt der Zellen kolorimetrisch bestimmt. Das Überleben der Kontrolle wurde als 100% festgesetzt. Werte über 100% bedeuten eine Zunahme, Werte unter 100% eine Abnahme des Überlebens Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus n=4. Dargestellt ist der Fehlerbalken als Standardfehler des Mittelwerts (SEM)..... 24
- Abbildung 4** Proteinexpression von Markern des Glukosestoffwechsels (GLUT-1, Hexokinase II) und des Zelltods (PARP-1, CC3) nach 24-stündiger Behandlung mit Doxorubicin. 0 µg/ml bezeichnet die unbehandelte Kontrolle (Referenzwert). Eine Zunahme der Bandenintensität weist auf eine vermehrte Proteinexpression hin. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Ergebnisse wurden mindestens dreimal verifiziert..... 25
- Abbildung 5** Konzentrationsabhängige  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme (counts per minute) vitaler OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Etoposid. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme der unbehandelten Kontrolle (0µg/ml) wurde auf den Wert 1 normiert und die der Konzentrationen als Vielfaches bzw. Bruchteil davon berechnet (fold of control). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Mittelwerte aus n=5..... 27
- Abbildung 6** Konzentrationsabhängige Überlebenskurve der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Etoposid. Mit dem CellTiter-Glo® wurde der ATP-Gehalt der Zellen kolorimetrisch bestimmt. Das Überleben der Kontrolle wurde als 100% festgesetzt. Werte über 100% bedeuten eine Zunahme, Werte unter 100% eine Abnahme des Überlebens Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus n= 4. Dargestellt ist der Fehlerbalken als Standardfehler der Mittelwerte (SEM). ..... 28
- Abbildung 7** Proteinexpression von Markern des Glukosestoffwechsels (GLUT-1, Hexokinase II) und des Zelltods (PARP-1, CC3) nach 24-stündiger Behandlung mit Etoposid. 0µg/ml bezeichnet die unbehandelte Kontrolle (Referenzwert). Eine Zunahme der Bandenintensität weist auf eine vermehrte Proteinexpression hin. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Ergebnisse wurden mindestens dreimal verifiziert..... 29
- Abbildung 8** Konzentrationsabhängige  $^{18}\text{F}$ -FDG-Aufnahme (counts per minute) vitaler OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Topotecan. Die  $^{18}\text{F}$ -FDG Aufnahme der unbehandelten Kontrolle (0) wurde auf den Wert 1 normiert und die der Konzentrationen als Vielfaches bzw. Bruchteil davon berechnet (fold of control). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Mittelwerte aus n= 5..... 31
- Abbildung 9** Konzentrationsabhängige Überlebenskurve der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Topotecan. Mit dem CellTiter-Glo® wurde der ATP-Gehalt der Zellen kolorimetrisch bestimmt.

- Das Überleben der Kontrolle wurde als 100% festgesetzt. Werte über 100% bedeuten eine Zunahme, Werte unter 100% eine Abnahme des Überlebens Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus n=4. Dargestellt ist der Fehlerbalken als Standardfehler der Mittelwerte (SEM)..... 32
- Abbildung 10** Proteinexpression von Markern des Glukosestoffwechsels (GLUT-1, Hexokinase II) und des Zelltods (PARP-1, CC3) nach 24-stündiger Behandlung mit Topotecan. 0µg/ml bezeichnet die unbehandelte Kontrolle (Referenzwert). Eine Zunahme der Bandenintensität weist auf eine vermehrte Proteinexpression hin. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Ergebnisse wurden mindestens dreimal verifiziert. .... 33
- Abbildung 11** Konzentrationsabhängige <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme (counts per minute) vitaler OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Bortezomib. Die <sup>18</sup>F-FDG Aufnahme der unbehandelten Kontrolle (0) wurde auf den Wert 1 normiert und die der Konzentrationen als Vielfaches bzw. Bruchteil davon berechnet (fold of control). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Mittelwerte aus n=5..... 35
- Abbildung 12** Konzentrationsabhängige Überlebenskurve der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Bortezomib. Mit dem CellTiter-Glo® wurde der ATP-Gehalt der Zellen kolorimetrisch bestimmt. Das Überleben der Kontrolle wurde als 100% festgesetzt. Werte über 100% bedeuten eine Zunahme, Werte unter 100% eine Abnahme des Überlebens Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus n=4. Dargestellt ist der Fehlerbalken als Standardfehler der Mittelwerte (SEM)..... 36
- Abbildung 13** Proteinexpression von Markern des Glukosestoffwechsels (GLUT-1, Hexokinase II) und des Zelltods (PARP-1, CC3) nach 24-stündiger Behandlung mit Bortezomib. 0 bezeichnet die unbehandelte Kontrolle (Referenzwert). Eine Zunahme der Bandenintensität weist auf eine vermehrte Proteinexpression hin. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Ergebnisse wurden mindestens dreimal verifiziert..... 37
- Abbildung 14** Konzentrationsabhängige <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme (counts per minute) vitaler OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Vincristin. Die <sup>18</sup>F-FDG Aufnahme der unbehandelten Kontrolle (0) wurde auf den Wert 1 normiert und die der Konzentrationen als Vielfaches bzw. Bruchteil davon berechnet (fold control). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Mittelwerte aus n=5..... 39
- Abbildung 15** Konzentrationsabhängige Überlebenskurve der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Vincristin. Mit dem CellTiter-Glo® wurde der ATP-Gehalt der Zellen kolorimetrisch bestimmt. Das Überleben der Kontrolle wurde als 100% festgesetzt. Werte über 100% bedeuten eine Zunahme, Werte unter 100% eine Abnahme des Überlebens Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus n=4. Dargestellt ist der Fehlerbalken als Standardfehler der Mittelwerte (SEM)..... 40
- Abbildung 16** Proteinexpression von Markern des Glukosestoffwechsels (GLUT-1, Hexokinase II) und des Zelltods (PARP-1, CC3) nach 24-stündiger Behandlung mit Vincristin. 0 bezeichnet die unbehandelte Kontrolle (Referenzwert). Eine Zunahme der Bandenintensität weist auf eine vermehrte Proteinexpression hin. Tubulin diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Ergebnisse wurden mindestens dreimal verifiziert. .... 41
- Abbildung 17** OPM-2 blieben unbehandelt (Co) oder wurden für 24 Stunden mit festen Konzentrationen der Inhibitoren (A) BEZ235 (200 nM), (B) KU55933 (10 µM), (C) MK-2206 (1µM), (D) NU7026 (10µM) einzeln oder in Kombination mit Doxorubicin (0,25 µg/ml) behandelt. Die Ergebnisse resultieren aus <sup>18</sup>F-FDG uptakes (cpm/viable cells, fold control) und Western Blots von GLUT-1, Hexokinase II, Cleaved caspase-3 und PARP-1. Die Ergebnisse wurden mindestens zweimal bestätigt. Fehlerbalken = SEM. α-Tubulin = Ladekontrolle. .... 44
- Abbildung 18** OPM-2 blieben unbehandelt (Co) oder wurden für 24 Stunden mit festen Konzentrationen der Inhibitoren (A) BEZ235 (200 nM), (B) KU55933 (10 µM), (C) MK-2206

- (1µM), (D) NU7026 (10µM) einzeln oder in Kombination mit Etoposid (10 µg/ml) behandelt. Die Ergebnisse resultieren aus <sup>18</sup>F-FDG uptakes (cpm/viable cells, fold control) und Western Blots von GLUT-1, Hexokinase II, Cleaved caspase-3 und PARP-1. Die Ergebnisse wurden mindestens zweimal bestätigt. Fehlerbalken = SEM. α-Tubulin = Ladekontrolle..... 47
- Abbildung 19** OPM-2 blieben unbehandelt (Co) oder wurden für 24 Stunden mit festen Konzentrationen der Inhibitoren (A) BEZ235 (200 nM), (B) KU55933 (10 µM), (C) MK-2206 (1µM), (D) NU7026 (10µM) einzeln oder in Kombination mit Topotecan (0,1 µg/ml) behandelt. Die Ergebnisse resultieren aus <sup>18</sup>F-FDG uptakes (cpm/viable cells, fold control) und Western Blots von GLUT-1, Hexokinase II, Cleaved caspase-3 und PARP-1. Die Ergebnisse wurden mindestens zweimal bestätigt. Fehlerbalken = SEM. α-Tubulin = Ladekontrolle..... 50
- Abbildung 20** OPM-2 Zellen blieben unbehandelt (0) oder wurden mit Vincristin (Verdünnungsreihe) und Etoposid (je 10 µg/ml) 24 Stunden lang inkubiert. Es wurde die <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme der OPM-2 (cpm/viable.cells, fold control= 1) und die Zellvitalität mit dem CellTiter-Glo® bestimmt (Kontrolle=100%). Die Ergebnisse sind der Mittelwert aus n=3. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts (SEM)..... 53
- Abbildung 21** OPM-2 Zellen blieben unbehandelt (0) oder wurden mit Bortezomib (Verdünnungsreihe) und Doxorubicin (je 0,25 µg/ml) 24 Stunden lang inkubiert. Es wurde die <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme der OPM-2 (cpm/viable.cells, fold of control=1) und die Zellvitalität mit dem CellTiter-Glo® bestimmt (Kontrolle=100%). Die Ergebnisse sind der Mittelwert aus n=3. Der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts (SEM)..... 54
- Abbildung 22** Die Abbildung zeigt die <sup>18</sup>F-FDG -Aufnahme der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation in Nährmedien mit unterschiedlicher Glukosekonzentration für Etoposid, Topotecan und Vincristin. Es wurde der <sup>18</sup>F-FDG uptake (CPM/viable cells) im Standardmedium (RPMI 1640, 11mM Glukose) mit dem eines glukosereichen Mediums (RPMI 1640, 55mM) verglichen. Die Werte wurden auf die <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme der Kontrolle (Ko) des normoglykämischen (11mM) Mediums bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus n=3 und der SEM. .... 57
- Abbildung 23** Die Abbildung zeigt die <sup>18</sup>F-FDG -Aufnahme der OPM-2 nach 24-stündiger Inkubation in Nährmedien mit unterschiedlicher Glukosekonzentration für Doxorubicin, Etoposid und Topotecan. Es wurde der <sup>18</sup>F-FDG uptake (CPM/viable cells) im Standardmedium (RPMI 1640, 11mM Glukose) mit dem eines glukosefreien Mediums (RPMI 1640, 0mM) verglichen. Die Werte wurden auf die <sup>18</sup>F-FDG-Aufnahme der Kontrolle (Ko) des normoglykämischen (11mM) Mediums bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus n=3 und der SEM. .... 58

## 9. Literaturverzeichnis

- Airley, R. E. and A. Mobasheri (2007). "Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics." *Chemotherapy* 53(4): 233-256.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." *Nature* 421(6922): 499-506.
- Bartel, T. B., J. Haessler, T. L. Brown, J. D. Shaughnessy, Jr., F. van Rhee, E. Anaissie, T. Alpe, E. Angtuaco, R. Walker, J. Epstein, J. Crowley and B. Barlogie (2009). "F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma." *Blood* 114(10): 2068-2076.
- Baumann, P., S. Mandl-Weber, F. Oduncu and R. Schmidmaier (2009). "The novel orally bioavailable inhibitor of phosphoinositol-3-kinase and mammalian target of rapamycin, NVP-BEZ235, inhibits growth and proliferation in multiple myeloma." *Exp Cell Res* 315(3): 485-497.
- Bayley, J. P. and P. Devilee (2012). "The Warburg effect in 2012." *Curr Opin Oncol* 24(1): 62-67.
- Bellacosa, A., C. C. Kumar, A. Di Cristofano and J. R. Testa (2005). "Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting." *Adv Cancer Res* 94: 29-86.
- Bensaad, K., A. Tsuruta, M. A. Selak, M. N. Vidal, K. Nakano, R. Bartrons, E. Gottlieb and K. H. Vousden (2006). "TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis." *Cell* 126(1): 107-120.
- Binder, C., L. Binder, D. Marx, A. Schauer and W. Hiddemann (1997). "Deregulated simultaneous expression of multiple glucose transporter isoforms in malignant cells and tissues." *Anticancer Res* 17(6D): 4299-4304.
- Bozulic, L., B. Surucu, D. Hynx and B. A. Hemmings (2008). "PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival." *Mol Cell* 30(2): 203-213.
- Brandon, M., P. Baldi and D. C. Wallace (2006). "Mitochondrial mutations in cancer." *Oncogene* 25(34): 4647-4662.
- Brown, R. S., J. Y. Leung, P. V. Kison, K. R. Zasadny, A. Flint and R. L. Wahl (1999). "Glucose transporters and FDG uptake in untreated primary human non-small cell lung cancer." *J Nucl Med* 40(4): 556-565.
- Brown, R. S. and R. L. Wahl (1993). "Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study." *Cancer* 72(10): 2979-2985.
- Buzzai, M., D. E. Bauer, R. G. Jones, R. J. Deberardinis, G. Hatzivassiliou, R. L. Elstrom and C. B. Thompson (2005). "The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation." *Oncogene* 24(26): 4165-4173.

- Caers, J., I. Vande broek, H. De Raeve, L. Michaux, F. Trullemans, R. Schots, B. Van Camp and K. Vanderkerken (2008). "Multiple myeloma--an update on diagnosis and treatment." *Eur J Haematol* 81(5): 329-343.
- Caldecott, K., G. Banks and P. Jeggo (1990). "DNA double-strand break repair pathways and cellular tolerance to inhibitors of topoisomerase II." *Cancer Res* 50(18): 5778-5783.
- Cantuaria, G., A. Fagotti, G. Ferrandina, A. Magalhaes, M. Nadji, R. Angioli, M. Penalver, S. Mancuso and G. Scambia (2001). "GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy." *Cancer* 92(5): 1144-1150.
- Ciccia, A. and S. J. Elledge (2010). "The DNA damage response: making it safe to play with knives." *Mol Cell* 40(2): 179-204.
- Czech, N., W. Brenner, W. U. Kampen and E. Henze (2000). "[Diagnostic value of positron emission tomography (PET) in clinical oncology]." *Dtsch Med Wochenschr* 125(18): 565-567.
- DeBerardinis, R. J., J. J. Lum, G. Hatzivassiliou and C. B. Thompson (2008). "The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation." *Cell Metab* 7(1): 11-20.
- Delforge, M., J. Blade, M. A. Dimopoulos, T. Facon, M. Kropff, H. Ludwig, A. Palumbo, P. Van Damme, J. F. San-Miguel and P. Sonneveld (2010). "Treatment-related peripheral neuropathy in multiple myeloma: the challenge continues." *Lancet Oncol* 11(11): 1086-1095.
- Delorme, S. and A. Baur-Melnyk (2009). "Imaging in multiple myeloma." *Eur J Radiol* 70(3): 401-408.
- Dimopoulos, M., E. Terpos, R. L. Comenzo, P. Tosi, M. Beksac, O. Sezer, D. Siegel, H. Lokhorst, S. Kumar, S. V. Rajkumar, R. Niesvizky, L. A. Moulopoulos, B. G. Durie and Imwg (2009). "International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma." *Leukemia* 23(9): 1545-1556.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2002). "Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake." *Mol Biol Cell* 13(7): 2276-2288.
- Elstrom, R. L., D. E. Bauer, M. Buzzai, R. Karnauskas, M. H. Harris, D. R. Plas, H. Zhuang, R. M. Cinalli, A. Alavi, C. M. Rudin and C. B. Thompson (2004). "Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells." *Cancer Res* 64(11): 3892-3899.
- Finlay, M. R. and R. J. Griffin (2012). "Modulation of DNA repair by pharmacological inhibitors of the PIKK protein kinase family." *Bioorg Med Chem Lett* 22(17): 5352-5359.
- Furgason, J. M. and M. Bahassi el (2013). "Targeting DNA repair mechanisms in cancer." *Pharmacol Ther* 137(3): 298-308.
- Ganapathy, V., M. Thangaraju and P. D. Prasad (2009). "Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond." *Pharmacol Ther* 121(1): 29-40.
- Gatenby, R. A. and R. J. Gillies (2004). "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" *Nat Rev Cancer* 4(11): 891-899.

- Gottlob, K., N. Majewski, S. Kennedy, E. Kandel, R. B. Robey and N. Hay (2001). "Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase." *Genes Dev* 15(11): 1406-1418.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Hansen, L. T., C. Lundin, T. Helleday, H. S. Poulsen, C. S. Sorensen, L. N. Petersen and M. Spang-Thomsen (2003). "DNA repair rate and etoposide (VP16) resistance of tumor cell subpopulations derived from a single human small cell lung cancer." *Lung Cancer* 40(2): 157-164.
- Harousseau, J. L., M. Attal, H. Avet-Loiseau, G. Marit, D. Caillot, M. Mohty, P. Lenain, C. Hulin, T. Facon, P. Casassus, M. Michallet, H. Maisonneuve, L. Benboubker, F. Maloisel, M. O. Petillon, I. Webb, C. Mathiot and P. Moreau (2010). "Bortezomib plus dexamethasone is superior to vincristine plus doxorubicin plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: results of the IFM 2005-01 phase III trial." *J Clin Oncol* 28(30): 4621-4629.
- Harris, R. A. (2013). Glycolysis Overview. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. W. J. Lennarz and M. D. Lane. Waltham, Academic Press: 443-447.
- Hsu, J., Y. Shi, S. Krajewski, S. Renner, M. Fisher, J. C. Reed, T. F. Franke and A. Lichtenstein (2001). "The AKT kinase is activated in multiple myeloma tumor cells." *Blood* 98(9): 2853-2855.
- Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, T. Murray and M. J. Thun (2008). "Cancer statistics, 2008." *CA Cancer J Clin* 58(2): 71-96.
- Jiang, H., H. C. Reinhardt, J. Bartkova, J. Tommiska, C. Blomqvist, H. Nevanlinna, J. Bartek, M. B. Yaffe and M. T. Hemann (2009). "The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response." *Genes Dev* 23(16): 1895-1909.
- Jones, R. G. and C. B. Thompson (2009). "Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth." *Genes Dev* 23(5): 537-548.
- Kawamura, T., T. Kusakabe, T. Sugino, K. Watanabe, T. Fukuda, A. Nashimoto, K. Honma and T. Suzuki (2001). "Expression of glucose transporter-1 in human gastric carcinoma: association with tumor aggressiveness, metastasis, and patient survival." *Cancer* 92(3): 634-641.
- Kelly, C. J., K. Hussien and R. J. Muschel (2012). "3D tumour spheroids as a model to assess the suitability of [18F]FDG-PET as an early indicator of response to PI3K inhibition." *Nucl Med Biol* 39(7): 986-992.
- Kinoshita, E., E. van der Linden, H. Sanchez and C. Wyman (2009). "RAD50, an SMC family member with multiple roles in DNA break repair: how does ATP affect function?" *Chromosome Res* 17(2): 277-288.
- Koppenol, W. H., P. L. Bounds and C. V. Dang (2011). "Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism." *Nat Rev Cancer* 11(5): 325-337.

- Korwek, Z., T. Sewastianik, A. Bielak-Zmijewska, G. Mosieniak, O. Alster, M. Moreno-Villanueva, A. Burkle and E. Sikora (2012). "Inhibition of ATM blocks the etoposide-induced DNA damage response and apoptosis of resting human T cells." *DNA Repair (Amst)* 11(11): 864-873.
- Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, A. L. Harris and E. Sivridis (2006). "Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma." *Cancer Res* 66(2): 632-637.
- Lans, H., J. A. Marteijn and W. Vermeulen (2012). "ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response." *Epigenetics Chromatin* 5: 4.
- Lee, J. V., A. Carrer, S. Shah, N. W. Snyder, S. Wei, S. Venneti, A. J. Worth, Z. F. Yuan, H. W. Lim, S. Liu, E. Jackson, N. M. Aiello, N. B. Haas, T. R. Rebbeck, A. Judkins, K. J. Won, L. A. Chodosh, B. A. Garcia, B. Z. Stanger, M. D. Feldman, I. A. Blair and K. E. Wellen (2014). "Akt-dependent metabolic reprogramming regulates tumor cell histone acetylation." *Cell Metab* 20(2): 306-319.
- Levine, A. J. and A. M. Puzio-Kuter (2010). "The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes." *Science* 330(6009): 1340-1344.
- Liu, P., H. Cheng, T. M. Roberts and J. J. Zhao (2009). "Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer." *Nat Rev Drug Discov* 8(8): 627-644.
- Liu, Y., Y. Cao, W. Zhang, S. Bergmeier, Y. Qian, H. Akbar, R. Colvin, J. Ding, L. Tong, S. Wu, J. Hines and X. Chen (2012). "A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo." *Mol Cancer Ther* 11(8): 1672-1682.
- Lokhorst, H., H. Einsele, D. Vesole, B. Bruno, J. San Miguel, J. A. Perez-Simon, N. Kroger, P. Moreau, G. Gahrton, C. Gasparetto, S. Giralt, W. Bensinger and G. International Myeloma Working (2010). "International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma." *J Clin Oncol* 28(29): 4521-4530.
- Lord, C. J. and A. Ashworth (2012). "The DNA damage response and cancer therapy." *Nature* 481(7381): 287-294.
- Mahindra, A., J. Laubach, N. Raje, N. Munshi, P. G. Richardson and K. Anderson (2012). "Latest advances and current challenges in the treatment of multiple myeloma." *Nat Rev Clin Oncol* 9(3): 135-143.
- Majewski, N., V. Nogueira, P. Bhaskar, P. E. Coy, J. E. Skeen, K. Gottlob, N. S. Chandel, C. B. Thompson, R. B. Robey and N. Hay (2004). "Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak." *Mol Cell* 16(5): 819-830.
- Mathupala, S. P., Y. H. Ko and P. L. Pedersen (2009). "Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy." *Semin Cancer Biol* 19(1): 17-24.

- Maynard, J., S. A. Ricketts, C. Gendrin, P. Dudley and B. R. Davies (2013). "2-Deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose positron emission tomography demonstrates target inhibition with the potential to predict anti-tumour activity following treatment with the AKT inhibitor AZD5363." *Mol Imaging Biol* 15(4): 476-485.
- McMillin, D. W., M. Ooi, J. Delmore, J. Negri, P. Hayden, N. Mitsiades, J. Jakubikova, S. M. Maira, C. Garcia-Echeverria, R. Schlossman, N. C. Munshi, P. G. Richardson, K. C. Anderson and C. S. Mitsiades (2009). "Antimyeloma activity of the orally bioavailable dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235." *Cancer Res* 69(14): 5835-5842.
- Moreau, P., P. G. Richardson, M. Cavo, R. Z. Orlowski, J. F. San Miguel, A. Palumbo and J. L. Harousseau (2012). "Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later." *Blood* 120(5): 947-959.
- Moreno-Sanchez, R., A. Marin-Hernandez, E. Saavedra, J. P. Pardo, S. J. Ralph and S. Rodriguez-Enriquez (2014). "Who controls the ATP supply in cancer cells? Biochemistry lessons to understand cancer energy metabolism." *Int J Biochem Cell Biol* 50: 10-23.
- Mori, Y., K. Tsukinoki, M. Yasuda, M. Miyazawa, A. Kaneko and Y. Watanabe (2007). "Glucose transporter type 1 expression are associated with poor prognosis in patients with salivary gland tumors." *Oral Oncol* 43(6): 563-569.
- Mueckler, M. and B. Thorens (2013). "The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters." *Mol Aspects Med* 34(2-3): 121-138.
- Mukherjee, B., N. Tomimatsu, K. Amancherla, C. V. Camacho, N. Pichamoorthy and S. Burma (2012). "The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is a potent inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-mediated DNA damage responses." *Neoplasia* 14(1): 34-43.
- Muller, A., C. Zang, C. Chumduri, B. Dorken, P. T. Daniel and C. W. Scholz (2013). "Concurrent inhibition of PI3K and mTORC1/mTORC2 overcomes resistance to rapamycin induced apoptosis by down-regulation of Mcl-1 in mantle cell lymphoma." *Int J Cancer* 133(8): 1813-1824.
- Nakano, A., H. Miki, S. Nakamura, T. Harada, A. Oda, H. Amou, S. Fujii, K. Kagawa, K. Takeuchi, S. Ozaki, T. Matsumoto and M. Abe (2012). "Up-regulation of hexokinaseII in myeloma cells: targeting myeloma cells with 3-bromopyruvate." *J Bioenerg Biomembr* 44(1): 31-38.
- Nakano, A., D. Tsuji, H. Miki, Q. Cui, S. M. El Sayed, A. Ikegame, A. Oda, H. Amou, S. Nakamura, T. Harada, S. Fujii, K. Kagawa, K. Takeuchi, A. Sakai, S. Ozaki, K. Okano, T. Nakamura, K. Itoh, T. Matsumoto and M. Abe (2011). "Glycolysis inhibition inactivates ABC transporters to restore drug sensitivity in malignant cells." *PLoS One* 6(11): e27222.
- Nitiss, J. L. (2009). "Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy." *Nat Rev Cancer* 9(5): 338-350.
- Ong, L. C., Y. Jin, I. C. Song, S. Yu, K. Zhang and P. K. Chow (2008). "2-[18F]-2-deoxy-D-glucose (FDG) uptake in human tumor cells is related to the expression of GLUT-1 and hexokinase II." *Acta Radiol* 49(10): 1145-1153.

- Pedersen, P. L., S. Mathupala, A. Rempel, J. F. Geschwind and Y. H. Ko (2002). "Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention." *Biochim Biophys Acta* 1555(1-3): 14-20.
- Pelicano, H., D. S. Martin, R. H. Xu and P. Huang (2006). "Glycolysis inhibition for anticancer treatment." *Oncogene* 25(34): 4633-4646.
- Pene, F., Y. E. Claessens, O. Muller, F. Viguie, P. Mayeux, F. Dreyfus, C. Lacombe and D. Bouscary (2002). "Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma." *Oncogene* 21(43): 6587-6597.
- Pfeiffer, T., S. Schuster and S. Bonhoeffer (2001). "Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways." *Science* 292(5516): 504-507.
- Plosker, G. L. (2008). "Pegylated liposomal Doxorubicin: a review of its use in the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma." *Drugs* 68(17): 2535-2551.
- Rajkumar, S. V. (2013). "IV. Initial treatment of multiple myeloma." *Hematol Oncol* 31 Suppl 1: 33-37.
- Ramakrishnan, V., T. Kimlinger, J. Haug, U. Painuly, L. Wellik, T. Halling, S. V. Rajkumar and S. Kumar (2012). "Anti-myeloma activity of Akt inhibition is linked to the activation status of PI3K/Akt and MEK/ERK pathway." *PLoS One* 7(11): e50005.
- Rathmell, J. C., C. J. Fox, D. R. Plas, P. S. Hammerman, R. M. Cinalli and C. B. Thompson (2003). "Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival." *Mol Cell Biol* 23(20): 7315-7328.
- Reske, S. N., K. G. Grillenberger, G. Glatting, M. Port, M. Hildebrandt, F. Gansauge and H. G. Beger (1997). "Overexpression of glucose transporter 1 and increased FDG uptake in pancreatic carcinoma." *J Nucl Med* 38(9): 1344-1348.
- Robert Koch Institut, Z. f. K. (2010). "Krebs in Deutschland (Plasmozytom C90)." [http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2013/kid\\_2013\\_c90\\_multiples\\_myelom.pdf;jsessionid=53B3A515418C0651DF69226B1E8F41CB.2\\_cid363?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/kid_2013_c90_multiples_myelom.pdf;jsessionid=53B3A515418C0651DF69226B1E8F41CB.2_cid363?__blob=publicationFile). Stand:15.09.2014
- Rodriguez-Enriquez, S., A. Marin-Hernandez, J. C. Gallardo-Perez and R. Moreno-Sanchez (2009). "Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells." *J Cell Physiol* 221(3): 552-559.
- Semenza, G. L. (1998). "Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis." *Curr Opin Genet Dev* 8(5): 588-594.
- Shen, H., M. Schultz, G. D. Kruh and K. D. Tew (1998). "Increased expression of DNA-dependent protein kinase confers resistance to adriamycin." *Biochim Biophys Acta* 1381(2): 131-138.
- Shortt, J., B. P. Martin, A. Newbold, K. M. Hannan, J. R. Devlin, A. J. Baker, R. Ralli, C. Cullinane, C. A. Schmitt, M. Reimann, M. N. Hall, M. Wall, R. D. Hannan, R. B. Pearson, G.

- A. McArthur and R. W. Johnstone (2013). "Combined inhibition of PI3K-related DNA damage response kinases and mTORC1 induces apoptosis in MYC-driven B-cell lymphomas." *Blood* 121(15): 2964-2974.
- Shreve, P. D., Y. Anzai and R. L. Wahl (1999). "Pitfalls in oncologic diagnosis with FDG PET imaging: physiologic and benign variants." *Radiographics* 19(1): 61-77; quiz 150-151.
- Stengel, C., C. W. Cheung, J. Quinn, K. Yong and A. Khwaja (2012). "Optimal induction of myeloma cell death requires dual blockade of phosphoinositide 3-kinase and mTOR signalling and is determined by translocation subtype." *Leukemia* 26(8): 1761-1770.
- Tohma, T., S. Okazumi, H. Makino, A. Cho, R. Mochizuki, K. Shuto, H. Kudo, K. Matsubara, H. Gunji, H. Matsubara and T. Ochiai (2005). "Overexpression of glucose transporter 1 in esophageal squamous cell carcinomas: a marker for poor prognosis." *Dis Esophagus* 18(3): 185-189.
- van Lammeren-Venema, D., J. C. Regelink, Riphagen, II, S. Zweegman, O. S. Hoekstra and J. M. Zijlstra (2012). "(1)(8)F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography in assessment of myeloma-related bone disease: a systematic review." *Cancer* 118(8): 1971-1981.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley and C. B. Thompson (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *Science* 324(5930): 1029-1033.
- Vaughn, A. E. and M. Deshmukh (2008). "Glucose metabolism inhibits apoptosis in neurons and cancer cells by redox inactivation of cytochrome c." *Nat Cell Biol* 10(12): 1477-1483.
- Walker, R. C., T. L. Brown, L. B. Jones-Jackson, L. De Blanche and T. Bartel (2012). "Imaging of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias." *J Nucl Med* 53(7): 1091-1101.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* 123(3191): 309-314.
- Warburg, O., F. Wind and E. Negelein (1927). "The Metabolism of Tumors in the Body." *J Gen Physiol* 8(6): 519-530.
- Watanabe, M., H. Naraba, T. Sakyo and T. Kitagawa (2010). "DNA damage-induced modulation of GLUT3 expression is mediated through p53-independent extracellular signal-regulated kinase signaling in HeLa cells." *Mol Cancer Res* 8(11): 1547-1557.
- Wellen, K. E., G. Hatzivassiliou, U. M. Sachdeva, T. V. Bui, J. R. Cross and C. B. Thompson (2009). "ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation." *Science* 324(5930): 1076-1080.
- Wieman, H. L., J. A. Wofford and J. C. Rathmell (2007). "Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking." *Mol Biol Cell* 18(4): 1437-1446.
- Winterbottom, A. P. and A. S. Shaw (2009). "Imaging patients with myeloma." *Clin Radiol* 64(1): 1-11.

Wolf, A., S. Agnihotri, J. Micallef, J. Mukherjee, N. Sabha, R. Cairns, C. Hawkins and A. Guha (2011). "Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme." *J Exp Med* 208(2): 313-326.

Woods, D. and J. J. Turchi (2013). "Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways." *Cancer Biol Ther* 14(5): 379-389.

Wu, C. H., Y. S. Ho, C. Y. Tsai, Y. J. Wang, H. Tseng, P. L. Wei, C. H. Lee, R. S. Liu and S. Y. Lin (2009). "In vitro and in vivo study of phloretin-induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter." *Int J Cancer* 124(9): 2210-2219.

Xu, N., Y. Lao, Y. Zhang and D. A. Gillespie (2012). "Akt: a double-edged sword in cell proliferation and genome stability." *J Oncol* 2012: 951724.

Yamamoto, T., Y. Seino, H. Fukumoto, G. Koh, H. Yano, N. Inagaki, Y. Yamada, K. Inoue, T. Manabe and H. Imura (1990). "Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer." *Biochem Biophys Res Commun* 170(1): 223-230.

Yun, J., C. Rago, I. Cheong, R. Pagliarini, P. Angenendt, H. Rajagopalan, K. Schmidt, J. K. Willson, S. Markowitz, S. Zhou, L. A. Diaz, Jr., V. E. Velculescu, C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and N. Papadopoulos (2009). "Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells." *Science* 325(5947): 1555-1559.

Zamagni, E., F. Patriarca, C. Nanni, B. Zannetti, E. Englaro, A. Pezzi, P. Tacchetti, S. Buttignol, G. Perrone, A. Brioli, L. Pantani, C. Terragna, F. Carobolante, M. Baccarani, R. Fanin, S. Fanti and M. Cavo (2011). "Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation." *Blood* 118(23): 5989-5995.

Zhou, R., M. G. Vander Heiden and C. M. Rudin (2002). "Genotoxic exposure is associated with alterations in glucose uptake and metabolism." *Cancer Res* 62(12): 3515-3520.

Zu, X. L. and M. Guppy (2004). "Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction." *Biochem Biophys Res Commun* 313(3): 459-465.

## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich all jenen Dank sagen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. Schwaiger (Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar) bedanke ich mich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung meine Doktorarbeit durchführen zu können.

Großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Markus Essler, der mir das Thema überlassen hat. Er hat das Gelingen dieses Projekts stets mit kompetenter und geduldiger Hilfestellung gefördert, vor allem durch die Unterstützung bei der konzeptionellen Weiterentwicklung der Grundidee. Ich wünsche ihm nach seinem Wechsel zum Lehrstuhl der Nuklearmedizin in Bonn alles Gute für die Zukunft und viele weitere spannende Forschungsprojekte!

Besonders hervorheben möchte ich Frau Birgit Blechert (MTRA), deren unermüdlicher Einsatz sehr wertvoll war. Ich möchte mich vielmals für die große Geduld, die freundliche Zuwendung und die Zuverlässigkeit während der oft langwierigen Phasen bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. C. Seidl, der mir immer wieder fachlich und inhaltlich beratend zur Seite stand, vor allem für die große Unterstützung bei der Fertigstellung der wissenschaftlichen Publikation.

Die Zusammenarbeit mit allen anderen Mitarbeitern des Forschungslabors der Nuklearmedizin war immer von Hilfsbereitschaft und Rücksichtnahme geprägt. Ich bin dankbar dafür, dass ich Teil dieses Teams sein durfte!

Auch interdisziplinär fand ich große Hilfe bei der Realisierung des Projekts. Ich möchte mich sehr herzlich beim Forschungslabor der Hals-Nasen-Ohren-Abteilung, Klinikum rechts der Isar bedanken, insbesondere bei Herrn Guido Piontek (Forschungslabor Frau Dr. Anja Pickhard). Hier durfte ich uneingeschränkt über einen langen Zeitraum wichtige Gerätschaften zur Entwicklung der Ergebnisse mitbenutzen. Auch unter wissenschaftlichem Aspekt konnte ich viel dazulernen und habe darüber hinaus wertvolle Korrekturvorschläge (auch von Doktoranden) erhalten.

Zuletzt, aber ganz besonders möchte ich mich bei allen lieben Menschen in meinem Umfeld bedanken:

Riesiger Dank gilt zuvorderst meiner Familie, die mich immer wieder motivierte und Stimmungstiefs aufzufangen vermochte. Auch für die geduldige Sicherung des finanziellen Rahmens kann ich mich nicht genug bedanken. Liebsten Dank an Mama, Papa & meine Schwester!

Eine sehr wichtige moralische Stütze war mir Frau Magdalena Kiess. Sowohl in der abbildungstechnischen Realisierung und Unterstützung im Umgang mit Datenverarbeitungsprogrammen als auch in der Erinnerung an die „wichtigen Dinge im Leben“ außerhalb des Mikrokosmos Labor war sie unersetzlich.

Eine große Freude und Erleichterung des Laboralltags war es mir, so viele sympathische Menschen und auch neue Freunde kennenlernen zu dürfen. Sie seien an dieser Stelle unbedingt erwähnt: Herr Gabriel Buschner, Frau Johanna Bussemer, Herr Benedikt Feuerecker, Herr Samuel Kopping, Frau Katharina Teiluf, Frau Nahid Yusufi.