

Expression der Monocarboxylattransporter 1 und 4 beim kaninen
oralen spindelzelligen Sarkom und deren Verwendung als
Hypoxiemarker zur Unterscheidung von zyklischer und
chronischer Hypoxie

von Katrin Thomann

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Expression der Monocarboxylattransporter 1 und 4 beim kaninen
oralen spindelzelligen Sarkom und deren Verwendung als
Hypoxiemarker zur Unterscheidung von zyklischer und
chronischer Hypoxie

von Katrin Thomann

aus Stuttgart

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Mitbetreuung durch: Dr. Melanie Wergin, PhD Radioonkologie

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent: Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Meiner Mutter und den vier Seelenhunden

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Tumorhypoxie.....	3
1.1.	Chronische Hypoxie.....	3
1.2.	Zyklische Hypoxie	4
1.3.	Zelluläre Mechanismen	4
1.3.1.	Hypoxia-inducible Factor 1	5
1.3.2.	Vascular Endothelial Growth Factor.....	6
1.4.	Tumorhypoxie und Metastasierung.....	6
1.5.	Tumorhypoxie und Resistenzen	7
2.	Monocarboxylattransporter	8
2.1.	Die Monocarboxylattransporter-Familie.....	8
2.2.	Monocarboxylattransporter 1	9
2.3.	Monocarboxylattransporter 4	10
2.4.	Ablauf des Transportes.....	10
2.5.	Regulation	11
2.5.1.	Regulation von MCT1.....	11
2.5.2.	Regulation von MCT4.....	12
2.6.	Monocarboxylattransporter und Tumoren	13
2.6.1.	Laktattransport in Tumoren.....	13
2.6.2.	Monocarboxylattransporter und Metastasierung.....	13
3.	Kanine orale spindelzellige Sarkome.....	14
3.1.	Ätiologie und Inzidenz	14
3.2.	Diagnose.....	15
3.3.	Orale Spindelzellige Sarkome und Hypoxie	16
3.4.	Therapie.....	16
III.	MATERIAL UND METHODEN	18
1.	Proben	18
2.	Histologie.....	18
3.	Immunhistochemie	19

3.1.	S100.....	19
3.2.	MCT1-MCT4-Doppelfärbung.....	20
3.3.	VEGF	21
4.	Quantitative morphologische Bestimmung.....	22
4.1.	Ermittlung der Volumenanteile des Mesenchyms, der MCT1- und MCT4- positiven Zellen, sowie der VEGF-positiven Zellen in den Gewebeproben.....	23
5.	Statistische Auswertung.....	25
6.	Liste der verwendeten Materialien.....	25
6.1.	Geräte	25
6.2.	Ge- und Verbrauchsmaterial	26
6.3.	Reagenzien	27
6.4.	Lösungen	29
IV.	ERGEBNISSE	30
1.	Proben	30
2.	Qualitative Auswertung.....	30
2.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	30
2.2.	S100.....	32
2.3.	MCT1-MCT4-Doppelfärbung.....	34
2.4.	VEGF	38
3.	Quantitative Auswertung	40
3.1.	S100.....	40
3.2.	MCT1-MCT4- Doppelfärbung.....	41
3.3.	VEGF	43
V.	DISKUSSION	45
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	50
VII.	SUMMARY.....	52
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	54
IX.	ANHANG	71
1.	HE-Färbung.....	71

2.	S100-Färbung	72
3.	MCT1-MCT4-Doppelfärbung.....	73
3.1.	Tag 1.....	73
3.2.	Tag 2.....	73
3.3.	Tag 3.....	73
4.	VEGF-Färbung.....	75
4.1.	Tag 1.....	75
4.2.	Tag 2.....	75
5.	Volumendichten aller untersuchter kaninen oralen spindelzelligen Sarkomen	76
X.	DANKSAGUNG	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A _A	Flächendichte
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
C	Kohlenstoff
CA IX	Carboanhydrase 9
DAB	Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FNAB	Feinnadelaspirationsbiopsie
GF	Gesichtsfeld
GLUT-1	Glukosetransporter 1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1	Hypoxia-inducible Factor 1
HRE	Hypoxia Response Element
MCT	Monocarboxylattransporter
MDR1	Multidrug Resistance gene 1
mRNS	mitochondriale Ribonukleinsäure
MÜZ	Mediane Überlebenszeit
N	Stickstoff

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFI	Progressionsfreies Intervall
pH	potentia Hydrogenii
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
P _p	Punktedichte
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
V _v	Volumendichte

I. EINLEITUNG

Die Tumorphypoxie ist ein Phänomen, welches seit Jahrzehnten sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin erforscht wird. In zahlreichen Studien konnte eine Korrelation der Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes mit der Aggressivität und der Prognose gefunden werden (BRIZEL et al., 1996; HOCKEL et al., 1996b; BRIZEL et al., 1997; NORDSMARK et al., 2005; MARTINIVE et al., 2006).

Nachdem zunächst die chronische Hypoxie beschrieben wurde, welche durch eine zu geringe Gefäßversorgung entsteht (THOMLINSON & GRAY, 1955), kam in den 70er Jahren die Hypothese der akuten oder zyklischen Hypoxie auf, die durch eine vaskuläre Stase entsteht (REINHOLD et al., 1977; YAMAURA & MATSUZAWA, 1979), beziehungsweise durch die Fluktuation der Erythrozytenkonzentration in den Gefäßen (KIMURA et al., 1996). Der chronischen und der zyklischen Hypoxie liegen nicht nur unterschiedliche Mechanismen zugrunde, sondern sie können auch verschiedene Effekte auf die Zellen haben (YUAN et al., 2004; CARDENAS-NAVIA et al., 2008), weshalb die Unterscheidung der beiden Hypoxiearten von großer Bedeutung sein kann.

Derzeit ist eine Unterscheidung zwischen chronischer und zyklischer Hypoxie mittels endogener Marker noch nicht möglich. Für die immunhistochemische Differenzierung erscheinen die Monocarboxylattransporter (MCT) 1 und 4 vielversprechend. Dabei handelt es sich um transmembranäre Transporter, die insbesondere auf den Transport von Laktat und Protonen ausgelegt sind (HALESTRAP & PRICE, 1999). Der Monocarboxylattransporter 4 wird durch Hypoxie stimuliert und innerhalb von 2 Stunden vermehrt exprimiert. Die Expression des Monocarboxylattransporters 1 hingegen wird während einer Hypoxie innerhalb von 18 Stunden reduziert. Während der zeitlichen Überlappung kann es zu einer Co-Expression der beiden Monocarboxylattransporter kommen. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass Bereiche mit chronischer Hypoxie durch den Monocarboxylattransporter 4, Bereiche mit zyklischer Hypoxie durch die Co-Expression der Monocarboxylattransporter 1 und 4 und normoxische Bereiche durch den Monocarboxylattransporter 1 identifiziert werden können (WERGIN et al., in

Review).

Nachdem es bereits gelungen ist eine Doppelfärbung der Monocarboxylattransporter 1 und 4 bei eingefrorenen Proben von humanen Kopf- und Halstumoren durchzuführen (WERGIN et al., in Review), wurde mit dieser Studie versucht den Erfolg auf kanine orale spindelzellige Sarkome zu übertragen. Die kaninen oralen Sarkome gehören bekanntermaßen zu den Tumoren mit ausgeprägter Hypoxie (ROHRER BLEY et al., 2009) und zeichnen sich durch eine hohe Rezidivrate und ein häufiges Therapieversagen aus (THEON et al., 1997; FORREST et al., 2000).

Das Ziel dieser Studie war herauszufinden ob in kaninen oralen spindelzelligen Sarkomen MCT1 und MCT4 exprimiert werden. Des Weiteren wurde untersucht ob sich diese Marker für eine Unterscheidung von chronischer und zyklischer Hypoxie eignen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Tumorhypoxie

Mit dem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) wird die Oxygenierung von Geweben beschrieben. Dieser Wert liegt bei den meisten Geweben zwischen 17 und 65 mmHg (TATUM et al., 2006). Fällt der $pO_2 \leq 10$ mmHg spricht man von Hypoxie (SEMENZA, 2003; DEWHIRST et al., 2008).

Tumorhypoxie ist ein häufiges Merkmal, welches bei den meisten soliden Tumoren bei Mensch und Tier gefunden werden kann (ZHONG et al., 1999). In der Humanmedizin wurde in zahlreichen Studien eine Korrelation von Tumorhypoxie und der Entwicklung von Therapieresistenzen, der erhöhten Metastasierungswahrscheinlichkeit, sowie der schlechteren Prognose (TEICHER, 1994; BRIZEL et al., 1996; HOCKEL et al., 1996a; HOCKEL et al., 1996b; BRIZEL et al., 1997; TATUM et al., 2006) festgestellt, weshalb dies ein wichtiges Forschungsgebiet in der Onkologie ist, damit Tumore besser verstanden und therapiert werden können.

Man unterscheidet zwei Formen der Hypoxie, die chronische oder diffusionsabhängige Hypoxie und die zyklische, beziehungsweise akute oder perfusionsabhängige Hypoxie (THOMLINSON & GRAY, 1955; BROWN, 1979).

1.1. Chronische Hypoxie

Thomlinson und Gray fanden heraus, dass Sauerstoff durchschnittlich bis zu 170 μm von Kapillaren aus in das Gewebe diffundieren kann. Wird diese Distanz überschritten, verbrauchen die kapillar-nahen Zellen den Sauerstoff wodurch die kapillar-fernen Zellen chronisch hypoxisch werden (THOMLINSON & GRAY, 1955).

Tumore können nur bis zu einer Größe von zwei bis drei Millimeter ohne eigene Gefäßversorgung wachsen. Kommt es allerdings zur Produktion und Freigabe von proangiogenetischen Faktoren, so kann ein Tumor über diese kritische Größe hinaus wachsen. Diesen Vorgang nennt man angiogenetische Umschaltung des Tumors (FOLKMAN et al., 1966; FOLKMAN, 1970; FOLKMAN et al., 1971). Durch einen Überschuss an proangiogenetischen Faktoren kommt es zur Bildung

eines chaotischen Gefäßsystems, das sich durch eine abnormale Architektur der Tumorblutgefäße auszeichnet und in vielen Tumoren gefunden werden kann. Sie bilden beispielsweise Shunts oder enden blind, wodurch eine physiologische Funktion oftmals nicht gegeben ist. Desweiteren entsteht durch die unorganisierte Gefäßneubildung eine ungleichmäßige Verteilung im Tumorgewebe (FOLKMAN, 1971). Dies erklärt weshalb in den meisten soliden Tumoren trotz einer aktiven Angiogenese hypoxische Areale gefunden werden können (ZHONG et al., 1999).

1.2. Zyklische Hypoxie

Der zugrundeliegende Mechanismus zur Entstehung von zyklischer oder akuter Hypoxie ist eine temporäre Veränderung der Sauerstoffversorgung. Diese kann zum einen durch eine vaskuläre Stase hervorgerufen werden (REINHOLD et al., 1977; YAMAURA & MATSUZAWA, 1979), zum anderen durch eine Fluktuation der Erythrozyten in den Tumorkapillaren (KIMURA et al., 1996). In letzterem Fall konnte zudem festgestellt werden, dass es sich oftmals um zyklische Fluktuationen von 20 bis 30 Minuten handelt.

Zusätzlich zu diesen hochfrequenten Hypoxiezyklen wurden periodische Veränderungen in der Sauerstoffsättigung in Tumorgeweben auf einer täglichen Basis entdeckt. Die vermutliche Ursache für solch niederfrequente Hypoxiezyklen ist die dynamische strukturelle Veränderung der Tumervaskulatur (CAO et al., 2005).

In einigen Versuchen konnte inzwischen gezeigt werden, dass sich der Sauerstoffpartialdruck in Tumoren ständig verändert (CARDENAS-NAVIA et al., 2008) und dass mit jedem Hypoxie-Reoxiegnierungs-Zyklus die Häufigkeit von Mutationen (REYNOLDS et al., 1996), p53-Mutationen (GRAEBER et al., 1996) und spontaner Metastasierung (CAIRNS et al., 2001; CAIRNS & HILL, 2004) steigt.

1.3. Zelluläre Mechanismen

Einer der essentiellsten Mechanismen der Tumorzellen ist die Anpassung der Energiegewinnung an hypoxische Konditionen. Ohne Sauerstoff kann das, bei der Glykolyse entstandene, Pyruvat nicht über den Citratzyklus abgebaut werden und folglich kein Adenosintriphosphat (ATP) gebildet werden. Um dennoch Energie zu gewinnen, machen sich die Tumorzellen den Pasteur-Effekt zu nutze. Dabei

wird durch die anaerobe Glykolyse das Pyruvat weiter zu Laktat abgebaut, wodurch ATP entsteht. Da im Gegensatz zur oxidativen Phosphorylierung, bei der 38 Moleküle ATP pro Molekül Glukose entstehen, bei der anaeroben Glykolyse nur zwei Moleküle ATP pro Molekül Glukose entstehen, müssen Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen wesentlich mehr Glukose verstoffwechseln um den Energiebedarf zu decken (WARBURG, 1926; WU & RACKER, 1959).

Tumorzellen sind allerdings auch unter normoxischen Bedingungen dazu in der Lage, die Energiegewinnung auf anaerobe Glykolyse umzustellen. Dieses Phänomen ist als Warburg-Effekt bekannt (WARBURG, 1926; WARBURG, 1956).

Hypoxie führt bei nicht-tumorösen Zellen zur Apoptose. Dies geschieht unter anderem über einen p53-abhängigen Weg. Bei vielen Tumorzellen ist das Tumorsuppressorgen p53 mutiert, wodurch diese Zellen der Hypoxie-induzierten Apoptose entgehen können (CARMELIET et al., 1998). Auch Zellen, bei denen das Protoonkogen Bcl-2 überexprimiert ist, haben einen selektiven Vorteil durch diesen Effekt (NELSON et al., 2004).

Neben der Umstellung des Energiestoffwechsels und der Selektion von aggressiveren Tumorzellen, führen hypoxische Konditionen zur Produktion und Ausschüttung einer Vielzahl von Enzymen und Signalmolekülen, die den Zellen helfen sich an die veränderten Bedingungen anzupassen. So wird neben dem Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) und dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) auch der Glukosetransporter 1 (GLUT-1) vermehrt exprimiert, wodurch der erhöhte Glukosebedarf der Tumorzellen während der anaeroben Glykolyse gedeckt werden kann (BASHAN et al., 1992; SHWEIKI et al., 1992; WANG & SEMENZA, 1993).

1.3.1. Hypoxia-inducible Factor 1

Der Hypoxia-inducible Factor 1 gilt als Schlüsselmolekül und ist ein Heterodimer, das aus den Subeinheiten HIF-1 α und HIF-1 β besteht (WANG et al., 1995). HIF-1 β ist Hypoxie-unabhängig und wird konstant exprimiert (JIANG et al., 1996). HIF-1 α hingegen wird unter normoxischen Bedingungen mit Hilfe des von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorproteins schnell abgebaut. Hypoxie führt zu einer Stabilisierung der Alpha-Subeinheit, so kann diese sich mit der Beta-Subeinheit verbinden (MAXWELL et al., 1999). Das gebildete Heterodimer bindet an die

Hypoxia Response Elements (HRE) seiner Zielgene, dadurch werden diese hochreguliert (WANG & SEMENZA, 1993).

Zu den zahlreichen Faktoren, die durch HIF-1 stimuliert werden, gehören unter anderem Erythropoetin (SEMENZA et al., 1991), Vascular Endothelial Growth Factor (SHWEIKI et al., 1992), Glukose Transporter 1 (BASHAN et al., 1992), Carboanhydrase 9 (CA IX) (LONCASTER et al., 2001), Monocarboxylattransporter 4 (MCT4) (ULLAH et al., 2006) und das Multidrug Resistance gene 1 (MDR1) (COMERFORD et al., 2002).

1.3.2. Vascular Endothelial Growth Factor

Der Vascular Endothelial Growth Factor ist ein dimeres Protein und der wichtigste proangiogenetische Faktor in Tumoren (SHWEIKI et al., 1995). Sowohl der Faktor selbst, als auch sein Rezeptor werden durch HIF-1 stimuliert (SHWEIKI et al., 1992).

VEGF wird von vielen Geweben überexprimiert, wie der Plazenta (SHARKEY et al., 1993), einigen fetalen Geweben (SHIFREN et al., 1994), heilenden Wunden (BROWN et al., 1992) und Psoriasis (DETMAR et al., 1994). Außerdem kommt es auch bei einer Vielzahl von Tumoren bei Mensch und Tier zu einer übermäßigen Produktion des Faktors (DVORAK et al., 1979a; DVORAK et al., 1979b; SENGER et al., 1983; PLATE et al., 1992; BROWN et al., 1993a; BROWN et al., 1993b; GUIDI et al., 1995).

Durch die VEGF-induzierte Angiogenese und Neovaskularisierung entstehen unorganisierte und ungleichmäßig verteilte Gefäße mit anormaler Architektur und Funktion (FOLKMAN, 1971). Außerdem hat VEGF eine erhöhte Permeabilität von Gefäßen zur Folge, wodurch Makromoleküle die Gefäßwand überwinden können (DVORAK et al., 1999).

1.4. Tumorhypoxie und Metastasierung

Der Vorgang der Metastasierung ist ein komplexer Ablauf, bei dem Tumorzellen sich aus dem Verband des soliden Tumors lösen, in die Zirkulation gelangen, dort überleben, sich in einem entfernten Kapillarbett ansiedeln, ins Gewebe austreten und sich dort teilen (FOLKMAN, 1971; FIDLER, 2003).

Wie bereits in II.1.3 beschrieben, basiert der Energiestoffwechsel von hypoxischen Tumorzellen auf der anaeroben Glykolyse, wodurch Laktat entsteht

(WARBURG, 1926). Das Laktat wird gemeinsam mit Protonen aus den Zellen ausgeschleust (siehe II.2), wodurch der extrazelluläre *potentia Hydrogenii* (pH) - Wert sinkt. Ein niedriger pH-Wert wiederum aktiviert proteolytische Enzyme, wie Cathepsin B, welche die extrazelluläre Matrix abbauen (SLOANE et al., 1990; ROZHIN et al., 1994). Hierdurch wird es den Tumorzellen ermöglicht das Gewebe zu passieren, um zu einem Gefäß zu gelangen über welches sie in die Zirkulation gelangen können.

Durch die Hypoxie und den niedrigen pH-Wert wird desweiteren die Angiogenese über Faktoren, wie VEGF oder Interleukin-8 stimuliert (SHI et al., 1999; SHI et al., 2001). Die neu gebildeten Tumorgefäße sind meist von anormaler Architektur und Funktion (FOLKMAN, 1971) und weisen eine erhöhte Permeabilität auf (DVORAK et al., 1999), wodurch es auch den Tumorzellen erleichtert wird in das Gefäßsystem einzutreten.

Zuletzt wird auch das Immunsystem durch einen niedrigen, extrazellulären pH-Wert beeinflusst, so können die aus dem Tumorzellverband gelösten Zellen nicht erkannt und bekämpft werden (LARDNER, 2001).

1.5. Tumorhypoxie und Resistenzen

Der Therapieansatz vieler Chemotherapeutika und auch der Strahlentherapie liegt darin, dass die Desoxyribonukleinsäure (DNS) der Tumorzellen geschädigt wird und die Zelle bei der nächsten Zellteilung in die Apoptose geht (WITHERS, 1975; WARD, 1988; DEBATIN et al., 2002; WEAVER & CLEVELAND, 2005). Werden Tumorzellen hypoxischem Stress ausgesetzt, können sie ihren Zellzyklus stoppen (HARRIS, 2002), sie teilen sich nicht mehr und so entfällt der wichtigste Ansatz der Chemo- und Strahlentherapie.

In der Strahlentherapie ist der Sauerstoffpartialdruck der bedeutendste prognostische Faktor in Bezug auf das Therapieansprechen (HOCKEL et al., 1996a; OKUNIEFF et al., 1996; DIETZ et al., 1999). Bereits ab einem Sauerstoffpartialdruck von 25 - 30 mmHg sinkt die Sensitivität der Tumorzellen auf die Strahlentherapie drastisch (VAUPEL et al., 2001). Ein Großteil des Effekts der Strahlentherapie beruht darauf, dass freie Radikale gebildet werden, welche die DNS der Tumorzellen schädigen. Für diesen Prozess ist Sauerstoff essentiell (HALL & GIACCIA, 2006). Des Weiteren ist Sauerstoff in der Lage die hochreaktiven Radikale, die durch die Strahlentherapie gebildet wurden, zu

stabilisieren (MOLLS et al., 1998). Dies hat zur Folge, dass bei einer einzelnen Bestrahlung hypoxische Tumorzellen eine zwei- bis dreifach höhere Dosis benötigen um denselben Effekt wie normoxische Zellen zu zeigen (KUMAR, 2000). In den meisten Fällen wird die Strahlentherapie fraktioniert verabreicht um die Nebenwirkungen auf das umliegende Gewebe zu reduzieren und eine möglichst hohe Dosis im Tumorgewebe zu erreichen (WITHERS, 1975; WARD, 1988). Außerdem kommt es zwischen den Fraktionen zu einer Reoxygenierung der Tumorzellen, wodurch Zellen, die strahlenresistent waren, strahlensensitiver werden. Allerdings kann die Reoxygenierung unter hypoxischen Bedingungen langsamer und weniger ausgeprägt ablaufen (TEICHER, 1995).

Auch einige Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Cyclophosphamid oder Carboplatin sind sauerstoffabhängig in ihrer Wirkungsweise (TEICHER et al., 1981; TEICHER, 1994, 1995). Durch eine Hypoxie können weniger Radikale gebildet werden, die die DNS der Tumorzellen schädigen. Es werden außerdem vermehrt nukleophile Substanzen wie Glutathion gebildet, die an derselben Stelle der Tumor-DNS reagieren wie Alkylantien, so werden diese kompetitiv gehemmt. Des Weiteren werden vermehrt Enzyme produziert, die die geschädigte DNS der Tumorzellen reparieren (WALKER et al., 1994; VAUPEL et al., 2001). Neben der eingeschränkten Wirkungsweise der Chemotherapeutika wird auch deren Verteilung im Tumorgewebe von den unorganisierten und ungleichmäßig verteilten Gefäßen und der Fluktuation des Blutflusses im Tumor erschwert (FOLKMAN, 1971; DURAND, 2001).

2. Monocarboxylattransporter

Monocarboxylattransporter sind transmembranäre Transporter, die Monocarboxylate wie Laktat, Ketonkörper und Pyruvat, über einen Protonengebundenen Mechanismus transportieren (HALESTRAP & PRICE, 1999). Die MCTs gehören zur SLC16 Gen Familie, es wurden inzwischen 14 Mitglieder beschrieben (HALESTRAP & MEREDITH, 2004).

2.1. Die Monocarboxylattransporter-Familie

Die Monocarboxylattransporter bestehen aus zwölf transmembranären Domänen mit intrazytoplasmatisch gelegenen Stickstoff (N)- und Kohlenstoff (C)-Termini (HALESTRAP & MEREDITH, 2004). Es wird angenommen, dass die C-terminale Domäne die Substratspezifität bestimmt, wohingegen die N-terminale

Domäne für die Energiebindung zuständig ist (SAIER, 1994).

Aufgrund ihrer schnellen Transporteraktivität spielen die Mitglieder dieser Familie eine essentielle metabolische Rolle (HALESTRAP & MEREDITH, 2004). Eine der wichtigsten Aufgaben der Monocarboxylattransporter ist wohl der Transport von Laktat, insbesondere unter hypoxischen Bedingungen (HALESTRAP & PRICE, 1999). Dabei kommt es durch die anaerobe Glykolyse zu einer Konzentration von Laktat in den Zellen (WU & RACKER, 1959). Das entstandene Laktat muss einerseits aus den Zellen ausgeschleust werden, auf der anderen Seite können Zellen unter normoxischen Bedingungen Laktat aufnehmen und mittels oxidativer Phosphorylierung zur Energiegewinnung nutzen (CORI, 1931; GLADDEN, 2004).

Für die Expression und Funktionalität von MCT1 und MCT4 ist das Protein Basigin/CD147 essentiell (HALESTRAP & MEREDITH, 2004). Gallagher et al. zeigten, dass durch Inhibition von MCT1 oder MCT4 die Expression von CD147 vermindert wird und dass es durch die Inhibition von CD147 zu einem kompletten Verlust der Expression von MCT1 und MCT4 kommt (GALLAGHER et al., 2009).

2.2. Monocarboxylattransporter 1

MCT1 kann in den meisten Geweben, wie beispielsweise Herzmuskulatur, Skelettmuskulatur und Leber, gefunden werden. Er hat eine mittlere Affinität für L-Laktat (K_m 4 - 7 mM) und transportiert darüber hinaus noch weitere kurzkettige Monocarboxylate, wie Acetat oder Propionat (HALESTRAP & MEREDITH, 2004). MCT1 ist sowohl in der Lage Laktat als Energiequelle in die Zellen zu transportieren, als auch bei übermäßiger Produktion aus der Zelle zu exportieren (HALESTRAP & PRICE, 1999).

So wird beispielsweise in der Leber oder der Niere L-Laktat zur Glukoneogenese in die Zellen transportiert (HALESTRAP & PRICE, 1999). Herzmuskulatur und Typ-I-Fasern der Skelettmuskulatur verwenden Laktat und Ketonkörper als Treibstoff, wofür MCT1 das Substrat in die Zellen importiert (JUEL & HALESTRAP, 1999; PILEGAARD et al., 1999; BONEN, 2001). Des Weiteren können die kurzkettigen Monocarboxylate mittels MCT1 die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in Neuronen aufgenommen werden, denen sie ebenso als Energiequelle dienen (GERHART et al., 1997; FROBERG et al., 2001).

Unter hypoxischen Bedingungen oder in Zellen wie Astrozyten, Chondrozyten oder Leukozyten, die auch unter normoxischen Bedingungen primär durch Glykolyse ihre Energie gewinnen, transportiert MCT1 das produzierte Laktat aus den Zellen heraus und hat durch den gleichzeitigen Protonen-Transport eine regulatorische Rolle für den intrazellulären pH-Wert (HALESTRAP et al., 1997).

2.3. Monocarboxylattransporter 4

MCT4 ist ein Transporter, der in vielen Geweben gefunden werden kann, er wird allerdings besonders in Geweben mit glykolytischer Energiegewinnung, wie beispielsweise weißer Muskulatur, Astrozyten oder Chondrozyten, exprimiert (DIMMER et al., 2000). Seine Hauptaufgabe besteht darin, das während der Glykolyse entsandene Laktat aus den Zellen zu exportieren (JUEL & HALESTRAP, 1999), welches im weiteren Verlauf mit Hilfe von MCT1 in Zellen mit oxidativer Energiegewinnung aufgenommen und verstoffwechselt werden kann (HALESTRAP & WILSON, 2012).

Die Affinität von MCT4 für L-Laktat (K_m 14 - 20 mM) ist deutlich geringer als bei MCT1, dennoch handelt es sich dabei um das präferierte Substrat (DIMMER et al., 2000). Wegen der gleichzeitig geringen Affinität für Pyruvat (K_m 150 mM) ist sichergestellt, dass das für glykolytische Zellen essentielle Pyruvat nicht zusammen mit dem Laktat aus den Zellen ausgeschleust wird (HALESTRAP & WILSON, 2012). Damit ist MCT4 ein effektiver Exporteur von Laktat in Geweben mit anaerober Glykolyse (HALESTRAP & MEREDITH, 2004).

2.4. Ablauf des Transportes

Der Ablauf des Transportes von Laktat und Pyruvat folgt immer einer spezifischen Abfolge, bei der entweder ein Monocarboxylat mit einem Proton transportiert wird oder gegen ein anderes Monocarboxylat ausgetauscht wird (DEUTICKE, 1989). Da die MCTs Monocarboxylate und Protonen in die gleiche Richtung transportieren, werden sie auch als organische Anionen Symporter bezeichnet (FANG et al., 2006).

Zunächst erfolgt bei einem Laktattransport die Bindung des Protons an den Monocarboxylattransporter. Anschließend bindet das Laktat an den Transporter und es kommt zu einem Konformationswechsel, wodurch die beiden Komponenten die Zellmembran überwinden. Abschließend werden Laktat und Proton auf der anderen Seite der Zellmembran wieder freigesetzt und die

Substratbindungsseite des Transporters kehrt an ihre ursprüngliche Position zurück. Der limitierende Faktor für diesen Transport ist die Vollendung des Zyklus, welche durch die Wiederherstellung der ursprünglichen Anordnung des Transporters erreicht wird (DEUTICKE, 1982).

Es handelt sich um einen reversiblen Prozess, dessen Aktivität durch sich verändernden pH-Wert reguliert werden kann. Sinkt der pH-Wert auf der Seite mit der Laktatakkumulation, wird der Transport stimuliert indem der K_m -Wert des MCTs für Laktat sinkt, also die Affinität steigt. Denselben Effekt hat ein steigender pH-Wert auf der anderen Membranseite (POOLE & HALESTRAP, 1993).

2.5. Regulation

Die Regulation der Monocarboxylattransporter 1 und 4 erfolgt über unterschiedliche Mechanismen, die bisher allerdings noch nicht zur Gänze entschlüsselt werden konnten.

Für beide Transporter konnte bereits eine Interaktion mit dem Protein Basigin/CD147 nachgewiesen werden (HALESTRAP & MEREDITH, 2004). Silencing-Versuche, bei denen MCT1 oder MCT4 inhibiert wurden, hatten eine verminderte Expression von Basigin/CD147 zur Folge. Im Gegenzug hatte eine Inhibition von Basigin/CD147 einen kompletten Verlust der Expression von MCT1 und 4 zur Folge. Es konnte zudem festgestellt werden, dass die mitochondrialen Ribonukleinsäure (mRNS) Level von den Versuchen unbeeinflusst blieben, es sich also um eine translationelle oder posttranslationelle Regulation handelt (GALLAGHER et al., 2009). Des Weiteren demonstrierten Baba et al. mit einem gegen Basigin/CD147 gerichteten Antikörper, dass dieser einen verminderten Laktattransport, intrazelluläre Azidose und folglich den Zelltot auslöst (BABA et al., 2008).

2.5.1. Regulation von MCT1

Die Regulation der Monocarboxylattransporter in der Muskulatur ist bereits gut untersucht. So konnte gezeigt werden, dass Training (BAKER et al., 1998; PILEGAARD et al., 1999) oder chronische elektrische Stimulation von Muskulatur (MCCULLAGH et al., 1996) zu einer vermehrten Expression von MCT1 führt und folglich zu einem erhöhten Laktattransport. Dahingegen führt eine Denervation (MCCULLAGH & BONEN, 1995) oder eine Ruhigstellung

(DUBOUCHAUD et al., 1996) zu einer verminderten MCT1-Expression im Muskel, sowie einem verminderten Laktattransport.

Die Regulation von MCT1 durch Muskularbeit oder -ruhigstellung kommt vermutlich dadurch zustande, dass Laktat nicht nur ein Abbauprodukt und ein Treibstoff ist, sondern ebenso ein Signalgeber. Hashimoto et al. zeigten, dass Laktat bereits innerhalb von einer Stunde die Expression von MCT1 ankurbeln kann (HASHIMOTO et al., 2007).

Ein weiteres Signal für die Stimulation der Expression von MCT1 ist eine verminderte Glukoseverfügbarkeit. Dies konnte in einem *in vitro* Experiment mit oxidativen Tumorzellen gezeigt werden. Wenn den Zellen weniger Glukose zur Verfügung steht, benötigen sie einen anderen Treibstoff. Daher wird die MCT1-Expression, und somit der Laktatimport, gesteigert. Des Weiteren zeigten die Zellen mit verminderter Glukoseverfügbarkeit eine Migration in Richtung Glukose (DE SAEDELEER et al., 2014).

Weitere Substrate, die eine stimulierende Wirkung auf die Expression von MCT1 haben, sind zum einen die Hormone Testosteron (ENOKI et al., 2006) und Thyroid-stimulierendes Hormon (FANELLI et al., 2003) und zum anderen Butyrat, welches bei der bakteriellen Fermentation im Colon entsteht und dort zur vermehrten MCT1-Expression führt (BORTHAKUR et al., 2008).

2.5.2. Regulation von MCT4

MCT4 hingegen wird vornehmlich über Hypoxie reguliert. Unter hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 α stabilisiert, wodurch es sich mit HIF-1 β verbinden kann. Das Heterodimer HIF-1 bindet dann im Zellkern an die DNS Abschnitte mit den HRE-1 und -2 des MCT4-Promotors. Hierdurch kommt es zu einer vermehrten Expression von MCT4. MCT1 bleibt von diesem Mechanismus unbeeinflusst. Es wird angenommen, dass MCT1 keine HRE hat, an die HIF-1 binden könnte (ULLAH et al., 2006). In einer Studie von Wergin et al. wurde gezeigt, dass die Expression von MCT4 bereits zwei Stunden nach Beginn einer Hypoxie gesteigert wird. Ebenso konnte hier ein Effekt von Hypoxie auf die Expression von MCT1, in Form einer verminderten Proteinkonzentration von MCT1, festgestellt werden. Eine deutliche Reduktion zeigte sich bereits nach 18 Stunden (WERGIN, in Review).

Im Gegensatz zu MCT1 stimuliert Laktat die Expression von MCT4 nicht

(HASHIMOTO et al., 2007).

2.6. Monocarboxylattransporter und Tumoren

Wie auch in physiologischem Körpergewebe haben Monocarboxylattransporter essentielle Funktionen in Tumoren und verschaffen Tumorzellen sogar Überlebensvorteile. Sie halten den Energiestoffwechsel aufrecht (SEMENZA, 2008; SONVEAUX et al., 2008), gleichen den pH-Wert aus (DEUTICKE et al., 1982) und fördern ein Milieu, welches die Tumorzellmotilität steigert (EDWARD et al., 2005).

2.6.1. Laktattransport in Tumoren

Lange Zeit wurde Laktat nur als Abfallprodukt angesehen, welches von Zellen unter hypoxischen Bedingungen durch die anaerobe Glykolyse gebildet wird. Mit der Entdeckung des Cori-Zyklus konnte hingegen gezeigt werden, dass Laktat von vielen oxidativen Zellen auch als Energielieferant genutzt werden kann (CORI, 1931; GLADDEN, 2004).

Solide Tumoren bestehen aus hypoxischen Bereichen mit glykolytischen Zellen und normoxischen Bereichen mit vornehmlich oxidativen Zellen. Die Zellen aus den hypoxischen Bereichen sind auf die anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung angewiesen und produzieren dabei Laktat. Das anfallende Laktat wird über MCT4 aus den Zellen transportiert. Erreicht es oxidative Zellen, können diese das Laktat über MCT1 aufnehmen und verstoffwechseln. Indem die Zellen im normoxischen Bereich Laktat statt Glukose als Treibstoff verwenden, kann die Glukose zu den hypoxischen Zellen diffundieren und diese mit Energie versorgen (BOUZIER et al., 1998; SEMENZA, 2008; SONVEAUX et al., 2008).

Das Prinzip des Laktatshuttles wurde außerdem in der Skelett- und Herzmuskulatur, sowie im Zentralen Nervensystem beschrieben (JUEL & HALESTRAP, 1999; HALESTRAP & MEREDITH, 2004; PIERRE & PELLERIN, 2005).

2.6.2. Monocarboxylattransporter und Metastasierung

Wie bereits in II.1.4 beschrieben fördert im besonderen Maße ein niedriger extrazellulärer pH-Wert die Metastasierung von Tumoren. Durch ihre Laktat-Protonen-Symporteraktivität haben die Monocarboxylattransporter einen großen Anteil an der Veränderung des pH-Wertes, weshalb es nicht verwunderlich ist,

dass Korrelationen zwischen Monocarboxylattransportern und der Metastasierung von Tumoren gefunden werden konnten.

Gallagher et al. fanden mit Silencing-Versuchen außerdem heraus, dass Tumorzellen ohne funktionierendes MCT4 eine verminderte Zellmigration zeigen. Sie hatten größere Adhäsionszonen als Zellen mit funktionierendem MCT4 (GALLAGHER et al., 2009). Tumorzellen, die durch die anaerobe Glykolyse Laktat produzieren (WARBURG, 1926), schleusen dieses mittels MCT4 aus den Zellen heraus. Dies geschieht um eine intrazelluläre Azidose zu verhindern, welche die Apoptose der Zelle zur Folge hätte (JUEL & HALESTRAP, 1999). Durch den Export des Laktats entsteht ein saures extrazelluläres Milieu. Edward et al. beobachteten, dass vermehrtes extrazelluläres Laktat zu einer erhöhten Motilität von Zellen führt (EDWARD et al., 2005).

Neben MCT4 spielt allerdings auch MCT1 eine wichtige Rolle bei der Metastasierung und der Invasivität von Tumoren. Durch die Hemmung von MCT1 wurden sowohl die Invasivität, als auch die Migration von humanen Lungentumorzellen vermindert (IZUMI et al., 2011).

3. Kanine orale spindelzellige Sarkome

Die Gruppe der Tumoren der Maulhöhle machen 6 - 7 % aller kaninen Tumore aus (HOYT & WITHROW, 1984). Am häufigsten kommen hier Melanome, Plattenepithelkarzinome und Fibrosarkome vor (TODOROFF & BRODEY, 1979).

3.1. Ätiologie und Inzidenz

Orale spindelzellige Sarkome gehören, wie auch andere Weichteilsarkome, zu den malignen mesenchymalen Tumoren. Die Ursprungszellen dieser Tumore sind Spindelzellen oder Fibroblasten. Sie zeigen ein invasives Wachstum mit Ausläufern, welche selbst bei aggressiven Therapieansätzen häufig nicht komplett entfernt werden können. Daher haben diese Tumoren ein hohes Rezidivierungsrisiko (SALISBURY & LANTZ, 1988).

Orale Fibrosarkome sind die dritthäufigsten Tumore der Maulhöhle des Hundes (HOYT & WITHROW, 1984) und stellen durch das hohe Rezidivierungsrisiko eine prognostische und therapeutische Herausforderung dar.

3.2. Diagnose

Die Diagnostik von mesenchymalen Tumoren gestaltet sich oftmals schwierig. Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass eine exakte Diagnose und Subklassifizierung nur mittels chirurgischer Biopsie gestellt werden kann, wohingegen die Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) nur in 33,3 % der Fällen akkurat ist (KASRAEIAN et al., 2010). Erfahrungsgemäß sind auch in der Veterinärmedizin zytologische Proben, die mittels minimalinvasiver FNAB gewonnen wurden, nur gelegentlich diagnostisch, weshalb für eine definitive Diagnose und Subklassifizierung in den meisten Fällen eine Gewebeprobe benötigt wird (GARDNER et al., 2015).

Bei kaninen Weichteilsarkomen ist das histologische Grading von großer Bedeutung, insbesondere in Bezug auf die Prognose sowie die Therapieentscheidung. McSporrán beschrieb eine Rezidivrate von 7 % für kanine Weichteilsarkome Grad I, 35 % für Grad II Tumore und 75 % für Grad III Tumore nach operativer Entfernung (MCSPORRAN, 2009). Anhand des Gradings kann also entschieden werden ob eine adjuvante Therapie in Form einer postoperativen Strahlentherapie oder einer zweiten, weiträumigeren Operation indiziert ist. Das histologische Gradingssystem hat sich allerdings bei oralen spindelzelligen Sarkomen nicht als prognostisch herausgestellt (KUNTZ et al., 1997). In der Maulhöhle des Hundes wurde sogar eine Sonderform des Fibrosarkoms beschrieben, welches als histologisch low-grade aber biologisch high-grade Fibrosarkom bezeichnet wird. Diese Sonderform zeichnet sich dadurch aus, dass bei der histologischen Untersuchung keine oder kaum Malignitätskriterien festgestellt werden können, weshalb sie häufig als low-grade, benigne oder nicht-neoplastisch eingestuft werden. Dennoch verhalten sich diese Neoplasien wie maligne high-grade Tumoren (CIEKOT et al., 1994).

In der Immunhistologie können Sarkome mit mesenchymalen Markern identifiziert werden. Hierzu zählen unter anderem Vimentin, das meist die erste Wahl zur Detektion mesenchymaler Zellen ist (LEADER et al., 1987), und S100. Da Vimentin allerdings beispielsweise Periphere Nervenscheidentumoren nicht zuverlässig detektiert wird oftmals auch S100 eingesetzt, welches von Zellen mesenchymalen und neuronalen Ursprungs exprimiert wird (KARAMCHANDANI et al., 2012).

Als prognostisch signifikant wurde bei oralen Fibrosarkomen die Lokalisation

beschrieben. Hierbei zeigen Hunde mit dieser Neoplasie im Bereich der Maxilla nicht nur ein längeres progressionsfreies Intervall (PFI), sondern auch eine längere mediane Überlebenszeit (MÜZ) (PFI: 254 Tage, MÜZ: 488 Tage) als Hunde mit einer mandibulären Lokalisation (PFI: 149 Tage, MÜZ: 301 Tage). Die schlechteste Prognose haben Hunde mit Fibrosarkomen im Gaumenbereich (PFI: 1 Tag, MÜZ: 40 Tage). Desweiteren sind, bezüglich der Überlebenszeit, die Größe und das Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnose prognostisch (GARDNER et al., 2015).

3.3. Orale Spindelzellige Sarkome und Hypoxie

Es wurde bereits durch einige Forschungsgruppen nachgewiesen, dass mesenchymale Tumoren bei Mensch, Hund und Mausmodell nicht nur dazu neigen hypoxische Areale zu haben, sondern dass es sich dabei auch oftmals um eine sehr ausgeprägte Hypoxie handelt. Dies konnte mit Hilfe des Eppendorf Histographen gezeigt werden, der mittels einer nadelförmigen Elektrode den pO_2 eines Gewebes bestimmt (BRIZEL et al., 1994; ACHERMANN et al., 2002). Nozue et al. verglichen die über einen Eppendorf Histographen ermittelten pO_2 -Werte von Fibrosarkomen am Mausmodell mit der immunhistochemischen Detektion von EF5, einem etablierten exogenen Hypoxiemarker. Die Ergebnisse zeigten eine gute Korrelation der Untersuchungsmethoden bezüglich des Ausmaßes an Hypoxie in den Tumoren. Außerdem konnte in der Immunhistochemie eine heterogene Verteilung der hypoxischen Zellen und Areale im Tumorgewebe nachgewiesen werden (NOZUE et al., 1997).

Brizel et al. zeigten des Weiteren, dass größere Tumore mesenchymalen Ursprungs beim Menschen eine ausgeprägtere Hypoxie aufweisen (BRIZEL et al., 1994).

Rohrer Bley et al. untersuchten die Vaskularität, das Blutvolumen und die pO_2 -Konzentration von kaninen oralen Tumoren und fanden dabei heraus, dass Sarkome bei allen untersuchten Parametern einen niedrigeren Wert hatten als Plattenepithelkarzinome und Melanome (ROHRER BLEY et al., 2009).

3.4. Therapie

Die chirurgische Entfernung von oralen spindelzelligen Sarkomen ist der erste und effektivste Therapieansatz um eine lokale Kontrolle zu erlangen. Wegen des invasiven Verhaltens von mesenchymalen Tumoren und um die

Rezidivierungsgefahr zu vermindern, sollte bei einer chirurgischen Entfernung auch der angrenzende Knochen mit entfernt werden. Allerdings ist eine weiträumige Exzision aufgrund der anatomischen Gegebenheiten der Maulhöhle in den wenigsten Fällen möglich. Insbesondere radikalere Operationen, wie eine Hemimandibulektomie, Hemimaxillektomie oder Orbitektomie, bedürfen eines erfahrenen Chirurgen (SALISBURY & LANTZ, 1988; KOSOVSKY et al., 1991; WALLACE et al., 1992; KUNTZ et al., 1997; LASCELLES et al., 2004; FRAZIER et al., 2012).

Wegen des hohen Rezidivierungsrisikos, trotz radikaler Operationsmethoden, wird oftmals eine Kombination aus Chirurgie und Strahlentherapie eingesetzt um die lokale Kontrolle zu verbessern. Mesenchymale Tumore gelten als verhältnismäßig resistent gegenüber Strahlentherapie, dennoch kann eine postoperative Bestrahlung die rezidivfreie Zeit verlängern (THRALL, 1981; FORREST et al., 2000; MCKNIGHT et al., 2000).

Systemische Therapieansätze in Form von Chemotherapien sind bei Weichteilsarkomen bisher wenig erforscht (RASSNICK, 2003). In einer Studie von Selting et al. wurde der Effekt von adjuvanter Doxorubicin-Chemotherapie bei high-grade Weichteilsarkomen beim Hund untersucht, wobei die Hunde, die Doxorubicin erhielten, weder eine längere tumorfreie Zeit, noch eine längere Überlebenszeit hatten (SELTING et al., 2005).

Trotz multimodaler Therapieansätze liegt die Rezidivrate bei 32 % (THEON et al., 1997; FORREST et al., 2000), weshalb weitere Forschungen essentiell sind um das Therapieansprechen zu verbessern, sowie neue Therapieansätze zu entwickeln.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Proben

Die Proben wurden aus den Probenbeständen des Pathologischen Institutes der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin aquiriert. Eingeschlossen wurden Tumore, die zwischen 2005 und 2010 als kanine orale spindelzellige Sarkome diagnostiziert wurden.

Die Fixierung der Tumore fand in 10%igem Formalin statt. Anschließend wurden die Proben in Paraffin gebettet und von jeder Gewebeprobe zehn konsekutive Schnitte, von je 5 µm, erstellt.

2. Histologie

Die Proben wurden durch einen examinierten Pathologen des Instituts für Tierpathologie am Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München hinsichtlich der morphologischen Diagnose des spindelzelligen Sarkoms reevaluiert. Eine weitere Subklassifizierung wurde nicht durchgeführt.

Für die histologische Untersuchung wurde jeweils der zehnte Schnitt einer Probe mit einer Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung¹ gefärbt. Die Schnitte wurden hierfür zunächst mit Xylol (SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland) entparaffiniert, mit einer absteigenden Alkoholreihe (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) rehydriert, gefolgt von einem fünfminütigen Waschschrift mit Aqua destillata (Aqua dest.). Anschließend wurden die Schnitte in Hämalun (AppliChemi GmbH, Darmstadt, Deutschland) gefärbt, unter laufendem Leitungswasser gebläut und in Eosin (AppliChemi GmbH, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Es folgte die Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol. Alle Schnitte wurden mit Histokitt (Assistent® Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim v. d. Röhn, Deutschland) eingedeckt.

¹ Protokoll im Anhang

3. Immunhistochemie²

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Proben wurden diese zunächst mit S100 untersucht um den Anteil der mesenchymalen Zellen an der Gewebeprobe zu definieren, welcher als Tumoranteil angesehen wurde. Außerdem wurden die Proben hinsichtlich ihrer immunhistochemischen Expression von MCT1, MCT4, sowie VEGF untersucht.

Die Immunhistochemie wurde in den Räumlichkeiten und mit der Unterstützung des Institutes für Tierpathologie am Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Zur Vorbereitung auf die immunhistochemische Untersuchung wurden alle Schnitte mit Xylol entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert, gefolgt von einem Waschschrift mit Aqua dest.

3.1. S100

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden in der Mikrowelle, bei 700 Watt für 20 Minuten mit zehn millimolarem Citratpuffer (pH 6,0) demaskiert. Nach einem fünfminütigen Waschschrift mit Aqua dest. wurden die Schnitte zur Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität mit 1 % Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) in Methanol (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) für 15 Minuten inkubiert, gefolgt von einem fünfminütigen Waschschrift mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 0,05 % Triton X (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen wurden die Schnitte anschließend in 10%igem normalem Ziegeserum (MP Biomedicals Germany, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Es folgte die einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper (Polyclonal Rabbit Anti-S100, Dako, Carpinteria, USA) in der Verdünnung 1:400. Nach einem weiteren fünfminütigen Waschschrift mit PBS und 0,05 % Triton X wurden die Schnitte mit dem Sekundärantikörper (Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG, Vector, Linaris, Dossenheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:200 über 50 Minuten inkubiert, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Linaris, Dossenheim, Deutschland) und einem erneuten

² Protokolle der Immunhistochemie sind im Anhang aufgeführt

fünfminütigen Waschschrift mit PBS und 0,05 % Triton X. Die Detektion erfolgte mit Diaminobenzidin (DAB) (KEM-EN-TEC Diagnostics, Taastrup, Dänemark), gefolgt von einem Waschschrift mit Aqua dest. und der Gegenfärbung mit Hämalaun, so wie dem Bläuen unter laufendem Leitungswasser. Die Dehydrierung der Schnitte erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mit Histokitt eingedeckt.

Als Positivkontrolle wurden Nebennieren-Schnitte verwendet, als Negativkontrolle wurde der Primärantikörper durch PBS ersetzt. Ein Überblick über alle verwendeten Kontrollen ist in Tabelle 1 dokumentiert.

3.2. MCT1-MCT4-Doppelfärbung

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte erfolgte die Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität mit 3,6 % H₂O₂ in Methanol über 20 Minuten, gefolgt von drei Waschschriften mit PBS und 0,05 % Triton X für je fünf Minuten. Anschließend wurden die Schnitte zunächst mit Normalserum vom Pferd (ImmPRESS™ REAGENT KIT, Vector, Linaris, Dossenheim, Deutschland) für 30 Minuten inkubiert und danach über Nacht bei 4 °C mit dem MCT1-Primärantikörper (Polyclonal Rabbit Anti-MCT1, EMD Millipore Corp., Temecula, USA) in der Verdünnung 1:200 inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur dreimal mit PBS und 0,05 % Triton X für je fünf Minuten gewaschen und anschließend 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper (Polyclonal Horse Anti-Rabbit, ImmPRESS™ REAGENT KIT, Vector, Linaris, Dossenheim, Deutschland) inkubiert. Nach drei fünfminütigen Waschschriften mit PBS und 0,05 % Triton X wurden die Schnitte nun mit DAB behandelt um die Bindungen mit MCT1 sichtbar zu machen. Danach folgten zwei, jeweils fünfminütige, Waschschriften mit Aqua dest. und PBS und schließlich wurden die Antikörper der ersten Färbung mit LinBlock (Linaris, Dossenheim, Deutschland) blockiert. Es folgte wiederum ein Waschschrift mit PBS und 0,05 % Triton X über fünf Minuten, sowie die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem MCT4-Primärantikörper (Polyclonal Rabbit Anti-MCT4, EMD Millipore Corp., Temecula, USA) in einer Verdünnung von 1:300.

Am dritten Tag wurden die Schnitte nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur dreimalig mit PBS und 0,05 % Triton X für je fünf Minuten

gewaschen, mit dem Sekundärantikörper (Polyclonal Horse Anti-Rabbit, ImmPRESS™ REAGENT KIT, Vector, Linaris, Dossenheim, Deutschland) für 30 Minuten inkubiert, erneut dreimal über jeweils fünf Minuten mit PBS und 0,05 % Triton X gewaschen und die Bindungen mit MCT4 mittels HistoGreen (Linaris, Dossenheim, Deutschland) detektiert. Anschließend wurden die Schnitte für fünf Minuten mit Aqua dest. gewaschen, mit Hämalaun gegengefärbt und unter laufendem Leitungswasser gebläut. Zum Schluss wurden die Schitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe gefolgt von Xylol dehydriert und schließlich mit Histokitt eingedeckt.

Als Positivkontrolle dienten für MCT1 quergestreifte Muskulatur und Leber, für MCT4 quergestreifte Muskulatur. Für die Negativkontrollen wurden die Primärantikörper durch PBS ersetzt. Alle verwendeten Kontrollen wurden in Tabelle 1 aufgelistet.

3.3. VEGF

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden nach einem fünfminütigen PBS-Waschschritt mit Trypsin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) bei 37 °C über 20 Minuten demaskiert. Es folgte nach zwei Waschsritten mit PBS und 0,05 % Triton X über je fünf Minuten die Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität mit 1 % H₂O₂ in Methanol über 30 Minuten, und nach weiteren drei fünfminütigen Waschsritten mit PBS und 0,05 % Triton X die 20-minütige Inkubation mit Normalserum vom Pferd (ImmPRESS™ REAGENT KIT, Vector, Linaris, Dossenheim, Deutschland). Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Polyclonal Rabbit Anti-VEGF, Linaris, Dossenheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:50 inkubiert.

Nach einer kurzen Inkubationszeit von zehn Minuten bei Raumtemperatur wurden am zweiten Tag die Schnitte nach drei Waschsritten mit PBS und 0,05 % Triton X, über jeweils fünf Minuten, mit dem Sekundärantikörper (Polyclonal Horse Anti-Rabbit, ImmPRESS™ REAGENT KIT, Vector, Linaris, Dossenheim, Deutschland) für 30 Minuten inkubiert, gefolgt von weiteren drei Waschsritten mit PBS und 0,05 % Triton X, je fünf Minuten, und der Detektion der Bindungen mit DAB. Nach einem fünfminütigen Waschschritt mit Aqua dest. und der Gegenfärbung mit Hämalaun wurden die Schnitte unter laufendem Leitungswasser gebläut, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol

dehydriert und schließlich mit Histokitt eingedeckt.

Als Positivkontrolle dienten Schnitte einer Leber, die bekanntermaßen VEGF exprimiert, sowie Gefäßendothel. Bei den Negativkontrollen wurde der Primärantikörper durch PBS ersetzt. Die verwendeten Kontrollen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

	Positiv Kontrolle	Negativ Kontrolle
S100	Nebenniere	PBS statt Primärantikörper
MCT1	Leber, quergestreifte Muskulatur	PBS statt Primärantikörper
MCT4	quergestreifte Muskulatur	PBS statt Primärantikörper
VEGF	Gefäßendothel, Leber (die VEGF exprimiert)	PBS statt Primärantikörper

Tabelle 1. Überblick über die verwendeten Kontrollen bei den immunhistochemischen Untersuchungen. Für die Positivkontrollen wurden Gewebe verwendet, die das gesuchte Antigen exprimieren. Für die Negativkontrollen wurde der Primärantikörper durch Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ersetzt.

4. Quantitative morphologische Bestimmung

Für die Bestimmung der Volumendichte (V_V) der S100-positiven Zellen ($V_{V(S100/Gewebe)}$), der MCT1-positiven Zellen ($V_{V(MCT1/Tumorgewebe)}$), der MCT4-positiven Zellen ($V_{V(MCT4/Tumorgewebe)}$), der MCT1 und MCT4-positiven Zellen ($V_{V(MCT1 \& MCT4/Tumorgewebe)}$) und der VEGF-positiven Zellen ($V_{V(VEGF/Tumorgewebe)}$) in den Gewebeproben wurde das Prinzip nach Delesse (ROYET, 1991) herangezogen. Dabei wird durch die Bestimmung der Flächenanteile der jeweiligen Kompartimente an der Gesamtfläche der Gewebestücke der Volumenanteil ermittelt. Die Flächenanteile der Kompartimente wiederum werden durch eine Punktezählung bestimmt (WEIBEL, 1979). Demnach entspricht die Punktedichte der Volumendichte:

$$V_V = A_A = P_P$$

V_V :	Volumendichte einer Struktur im Referenzkompartiment
A_A :	Flächendichte einer Struktur im Referenzkompartiment
P_P :	Punktedichte einer Struktur im Referenzkompartiment

$$V_{V(X/Gewebe)} = \sum P_{(X)} / \sum P_{(Gewebe)}$$

X :	Kompartiment
$V_{V(X/Gewebe)}$:	Volumendichte des Kompartimentes X am Gewebe
$\sum P_{(X)}$:	Summe der Trefferpunkte des Kompartimentes X in den ausgewerteten Gewebeschnitten
$\sum P_{(Gewebe)}$:	Summe der Trefferpunkte des Gewebes in den ausgewerteten Gewebeschnitte

Mit dem Nomogramm nach Weibel (WEIBEL, 1979) wurde für jedes zu untersuchende Kompartiment die Anzahl der zu zählenden Punkte ermittelt.

Die Durchführung der quantitativen morphologischen Bestimmung fand in den Räumlichkeiten und mit der Unterstützung des Institutes für Tierpathologie am Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München statt.

4.1. Ermittlung der Volumenanteile des Mesenchyms, der MCT1- und MCT4-positiven Zellen, sowie der VEGF-positiven Zellen in den Gewebeproben

Die Volumendichte wurde über die Punktezzählung an den immunhistochemisch gefärbten Präparaten mit dem Visiopharm-Visiomorph V/S© Stereologieprogramm (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark) bestimmt. Bei einer 12,5-fachen Vergrößerung wurden hierfür die Gewebestücke markiert. Mit Hilfe der newCAST®-Software des Stereologieprogrammes wurden anschließend systematisch zufällige Testfelder in den zu untersuchenden Gewebestücken ermittelt, wie in Abbildung 1, B dargestellt.

Bei einer 200-fachen Vergrößerung wurden die Testfelder auf einem Monitor abgebildet und mit einem Punkteraster überlagert (Abbildung 1, A). Nun folgte die Ermittlung der Summe der Trefferpunkte der jeweiligen Kompartimente in den Testfeldern. Als Trefferpunkte galten alle Punkte des Rasters, die auf dem Anschnitt einer immunohistochemisch-positiven Zelle lagen.

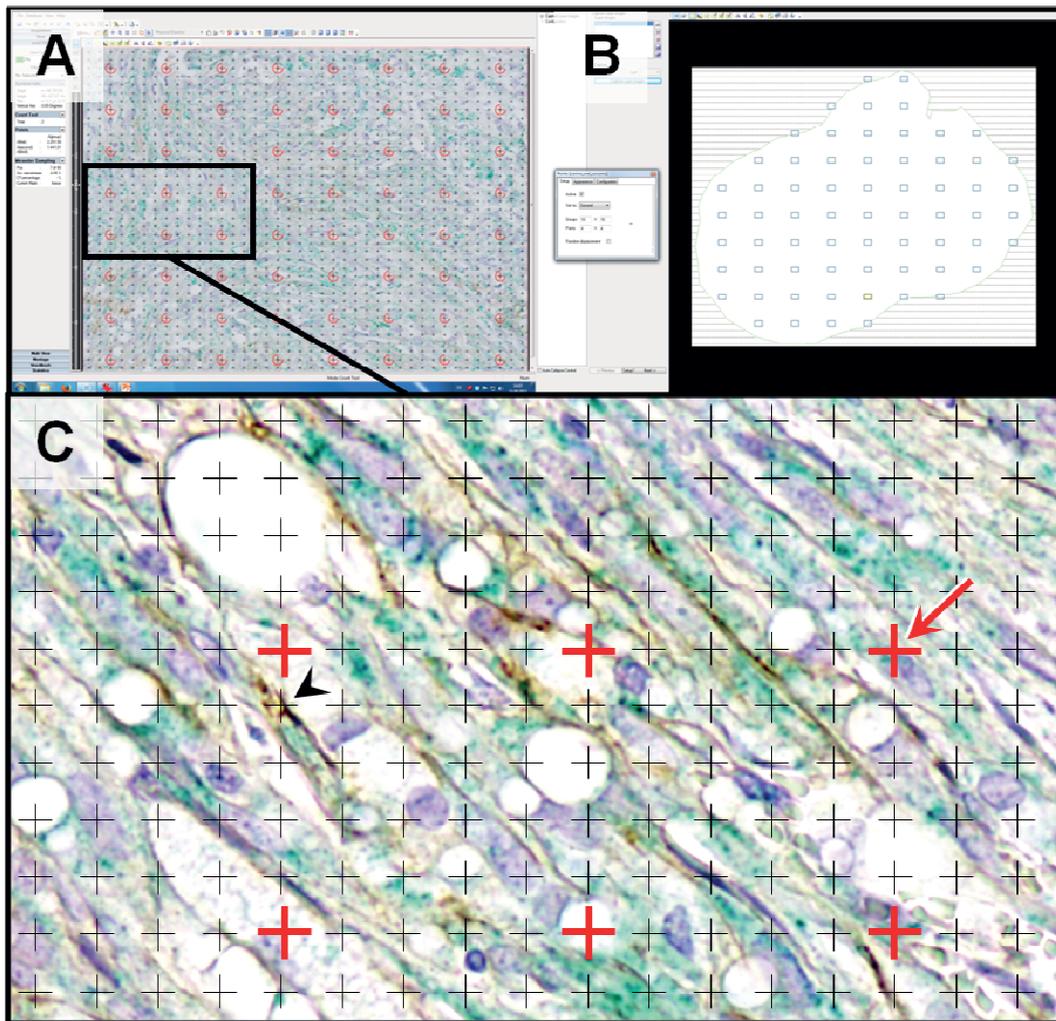


Abbildung 1. Ermittlung der Volumendichte von immunhistochemisch MCT1- und MCT4-positiven Zellen in kaninen oralen spindelzelligen Sarkomen. *A, B:* Systematisch zufällige Auswahl von auszuwertenden Gesichtsfeldern (GF) innerhalb der Anschnittsfläche eines kaninen oralen spindelzelligen Sarkoms im immunhistologischen Schnittpräparat (MCT1-MCT4-Doppelfärbung) mit Hilfe des computerbasierten Stereologiesystems newCASTTM (Visiopharm, Hoersholm, Dänemark). Das rechte Bild (B) zeigt den Umriss des Gewebeanschnitts sowie die Lokalisationen der systematisch zufällig ausgewählten GF (200-fache Endvergrößerung). *C:* Ausschnittsvergrößerung aus A. Ermittlung von $V_{V(MCT1/Tumorgewebe)}$, bzw. $V_{V(MCT4/Tumorgewebe)}$ und $V_{V(MCT1 \& MCT4/Tumorgewebe)}$ durch Punktzählung. Punkte des Rasters erster Ordnung (rote Kreuze), welche auf immunhistochemisch MCT4 positive Zellanschnitte (grüne Färbung) treffen (roter Pfeil), bzw. Punkte des Rasters zweiter Ordnung (schwarze Kreuze), welche auf immunhistochemisch MCT1 positive Zellanschnitte (braune Färbung) treffen (schwarze Pfeilspitze), werden gezählt.

Über die Gleichung aus Kapitel III.4 wurde anschließend mit einem computergestützten Tabellenkalkulationsprogramm (Excel™ (Microsoft, Redmond, USA)) die Volumendichte des Mesenchyms, der MCT1-, MCT4-, und MCT1 und MCT4-positiven Zellen sowie der VEGF-positiven Zellen errechnet.

5. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden mit dem Programm Excel™ (Microsoft, Redmond, USA) die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Volumendichten ermittelt. Die grafischen Darstellungen wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes Graphpad Prism 6 (Graphpad Software, San Diego, USA) erstellt.

6. Liste der verwendeten Materialien

6.1. Geräte

Brutschrank 37°C Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach

Computer K&R Computersysteme GmbH,
München

Digestorium

Elektronischer Timer und Stoppuhr TFA Dostmann GmbH & Co.KG,
Wertheim

Kamera Olympus DP72 Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Kühl-Gefrier-Kombi AEG Öko Santo Electrolux Hausgeräte GmbH, Nürnberg
Electronic

Laborwaage Sartorius AG, Göttingen

Magnetrührer IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen

Mikroskopisch und Steuerung Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co.KG,
Wetzlar

Mikrowelle MW 800 SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern

Objektiv, 1,25-fach Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Objektiv, 4-fach	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Objektiv, 10-fach	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Objektiv, 20-fach	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Pipette PIPETMAN®, einstellbar (200-1000 µl)	Gilson S.A.S., Villiers le Bel, Frankreich
Pipette PIPETMAN®, einstellbar (30-200 µl)	Gilson S.A.S., Villiers le Bel, Frankreich
Pipette PIPETMAN®, einstellbar (20-100 µl)	Gilson S.A.S., Villiers le Bel, Frankreich
Pipette PIPETMAN®, einstellbar (0,5-10 µl)	Gilson S.A.S., Villiers le Bel, Frankreich
Pipette PIPETMAN®, einstellbar (0,1-2 µl)	Gilson S.A.S., Villiers le Bel, Frankreich
Software newCAST	Visiopharm®, Hoersholm, Dänemark
Statistik Programm Graphpad Prism 6	Graphpad Software, San Diego, USA
Stereologieprogramm Visiomorph	Visiopharm®, Hoersholm, Dänemark
Systemmikroskop Olympus BX41	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Tabellenkalkulationsprogramm Excel™	Microsoft, Redmond, USA
Tischzentrifuge	Abbott Laboratories GmbH, Hannover
6.2. Ge- und Verbrauchsmaterial	
Blaubrand® Messkolben 50 ml, 100 ml	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Deckgläschen	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Einmalhandschuhe Sterling Nitrile	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz
Färbeglasbox	Duran Group GmbH, Wertheim
Färbeschaukel	Duran Group GmbH, Wertheim
Glaspipette 10 ml	witeg Labortechnik GmbH, Wertheim

Glasreagenzgläser 10 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Glastrichter	Duran Group GmbH, Wertheim
Laborflasche 1000 ml	Duran Group GmbH, Wertheim
Messzylinder 250 ml	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Objektträger StarFrost®	Engelbrecht, München
Pasteurpipetten aus Glas, 150 mm	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Peleusball	Assistent® Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim v. d. Röhn
Parafilm M®	Pechiney Deutschland GmbH, Düsseldorf
Pipettenspitzen Standard (50-1200 µl)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen Standard Universal (1-200 µl)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen Standard Kristall (0,5-10 µl)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen Standard Mikro (0,1-10 µl)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Reagenzgläser Greiner Bio-One	Altmann Analytik GmbH & Co.KG, München
Reaktionsgefäß Eppi	Eppendorf AG, Hamburg
Rundfilter, 70 mm	Altmann Analytik GmbH & Co.KG, München

6.3. Reagenzien

Aqua dest.

Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG-Antikörper, Vector	Linaris, Dossenheim
Citronensäure	AppliChem GmbH, Darmstadt

DAB, pH 7,0	KEM-EN-TEC Diagnostics, Taastrup, Dänemark
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eosin B	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Kälberserum	MP Biomedicals Germany, Heidelberg
HistoGreen	Linaris, Dossenheim
Histokitt	Assistent® Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim v. d. Röhn
ImmPRESS™ REAGENT KIT, Vector	Linaris, Dossenheim
Kaliumhydrogenphosphat	AppliChem GmbH, Darmstadt
LinBlock	Linaris, Dossenheim
Mayer`s Häkalaun	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol p.A. CH ₄ O	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumcitrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Polyclonal Rabbit Anti-MCT1-Antikörper	EMD Millipore Corp., Temecula, USA
Polyclonal Rabbit Anti-MCT4-Antikörper	EMD Millipore Corp., Temecula, USA
Polyclonal Rabbit Anti-S100-Antikörper	Dako, Carpinteria, USA
Polyclonal Rabbit Anti-VEGF-Antikörper	Linaris, Dossenheim
Triton X	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Wasserstoffperoxid reinst, 30%	AppliChem GmbH, Darmstadt

Xylol reinst

SAV Liquid Production GmbH,
Flintsbach am Inn

Ziegenserum

MP Biomedicals Germany, Heidelberg

6.4. Lösungen

Citratpuffer (10 mM, pH 6,0)

9 ml Stamm-Lösung A (0,1 M
Citronensäure (21,01 g $C_6H_8O_7 \times H_2O$) in
1 l Aqua dest.) +
41 ml Stamm-Lösung B (0,1 M
Natriumcitrat (29,41 g $C_6H_5O_7 \times 2H_2O$)
in 1 l Aqua dest.) + 450 ml Aqua dest.

PBS

16 g Natriumchlorid + 7,4 g
Natriumhydrogenphosphat + 2,15 g
Kaliumhydrogenphosphat auf 5 l Aqua
dest. aufgefüllt

IV. ERGEBNISSE

1. Proben

Die Proben stammten aus den Probenbeständen des Pathologischen Institutes der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin. In die Studie eingeschlossen wurden Tumore, welche histologisch und immunhistochemisch als kanine orale spindelzellige Sarkome diagnostiziert wurden. Diese Einschlusskriterien erfüllten 28 Proben, welche in den Jahren zwischen 2005 und 2010 zur pathologischen Untersuchung eingesendet wurden.

Alle 28 Tumoren wurden auch bei der histologischen Reevaluierung im Institut für Tierpathologie am Zentrum für klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München als kanine orale spindelzellige Sarkome diagnostiziert. Zwei der Proben wurden allerdings im Folgenden ausgeschlossen, da sie sich bei der immunhistochemischen Untersuchung als S100-negativ herausstellten.

2. Qualitative Auswertung

Bei der qualitativen Auswertung wurden die immunhistochemisch bearbeiteten Schnitte mikroskopisch untersucht. Hierbei wurde evaluiert ob die untersuchten Tumore eine Expression der beiden Monocarboxylattransporter zeigten, sowie auf spezifische Expressionsmuster geachtet.

2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung wird sehr häufig eingesetzt für die Unterscheidung von Gewebestrukturen und um anhand der morphologischen Kriterien Diagnosen zu stellen. Dabei färbt das Hämatoxylin die sauren Gewebeanteile, wie Nukleinsäuren, blau-violett und Eosin die basische Anteile rot an (FISCHER et al., 2008).

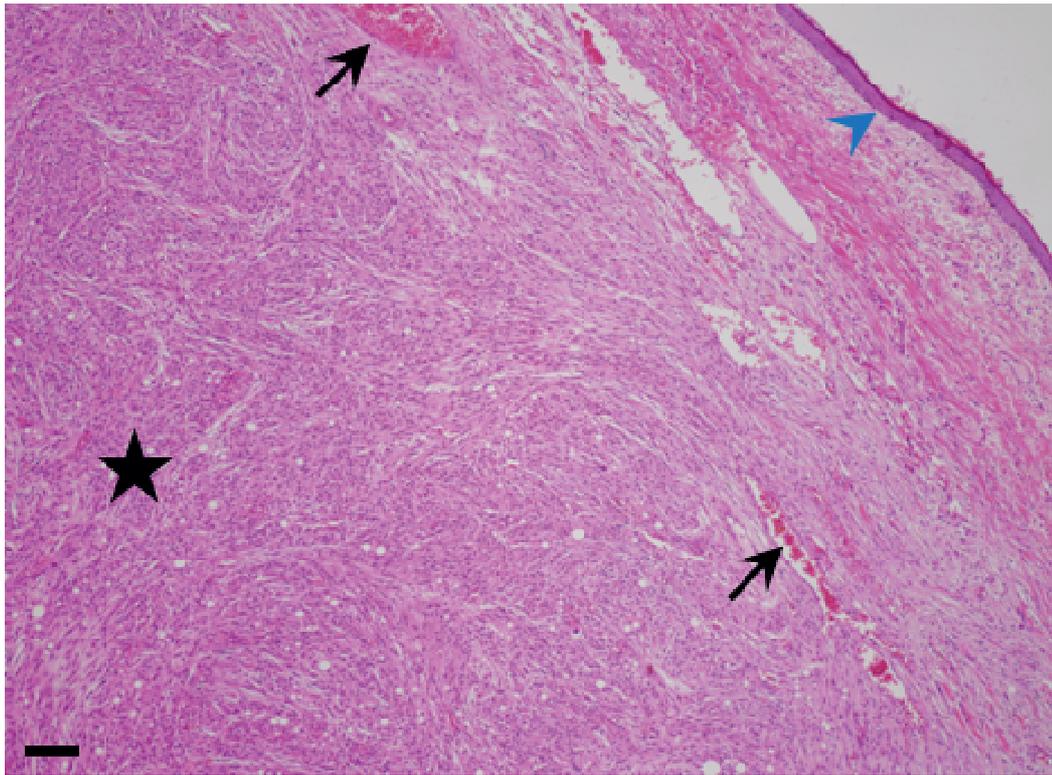


Abbildung 2. Übersicht eines kaninen oralen spindelzelligen Sarkoms, mit **Hämatoxylin-Eosin (HE)** gefärbt. Zu erkennen sind die Maulschleimhaut (blaue Pfeilspitze), sowie einige Gefäße (schwarze Pfeile). Das darunterliegende Tumorgewebe (schwarzer Stern) zeigt eine, für mesenchymale Tumoren typische, wirbelige Anordnung und es können einige Fettvakuolen gefunden werden, welche auf einen schnellen Zelluntergang hindeuten. Maßstabsleiste = 100 μ m.

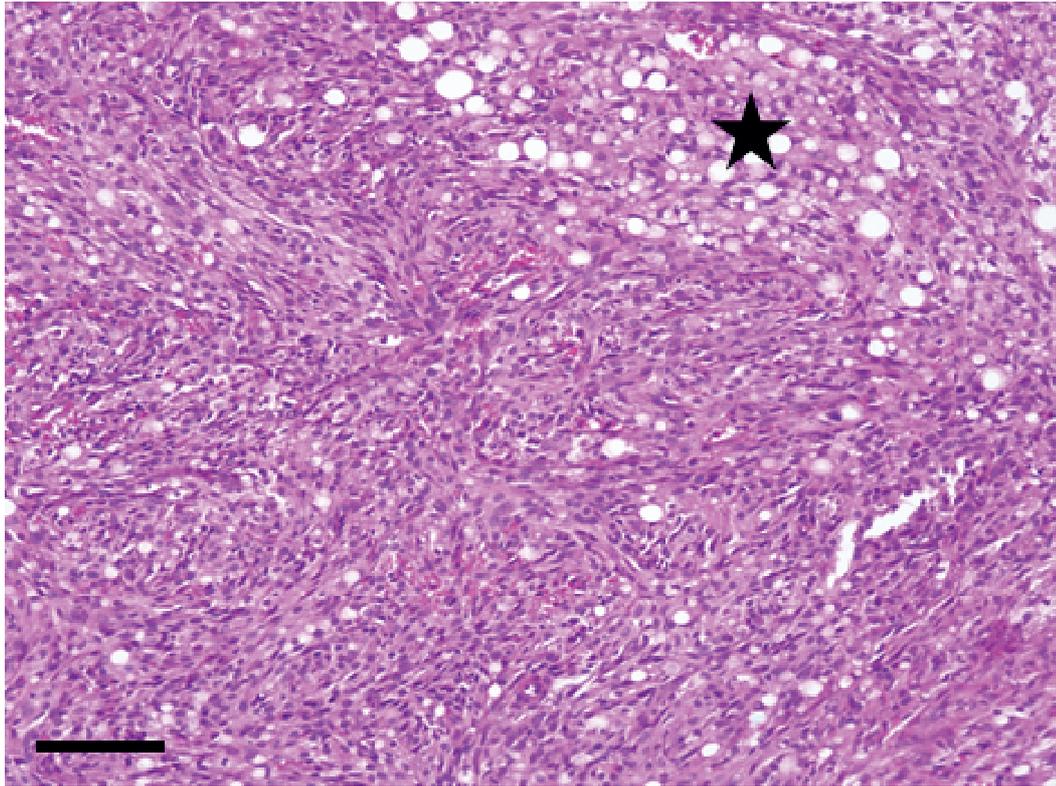


Abbildung 3. Kanines orales spindelzelliges Sarkom, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. *Spindelzelliger Tumor mit vielen Fettvakuolen (Stern).* Maßstabsleiste = 100µm.

2.2. S100

S100 ist ein immunhistochemischer Marker, der im Besonderen Zellen mesenchymalen und neuronalen Ursprungs anfärbt. Er wurde hier verwendet um den mesenchymalen Gewebeanteil der Proben zu bestimmen. Dieser Anteil wurde schließlich als Tumoranteil definiert.

Zwei der 28 untersuchten Proben hatten ein negatives Ergebnis für S100 und wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Bei den restlichen 26 Proben konnte ein deutliches positives Signal, in Form von zytoplasmatischer Braunfärbung, festgestellt werden. Als Kontrollgewebe wurden Nebennierenschnitte verwendet.

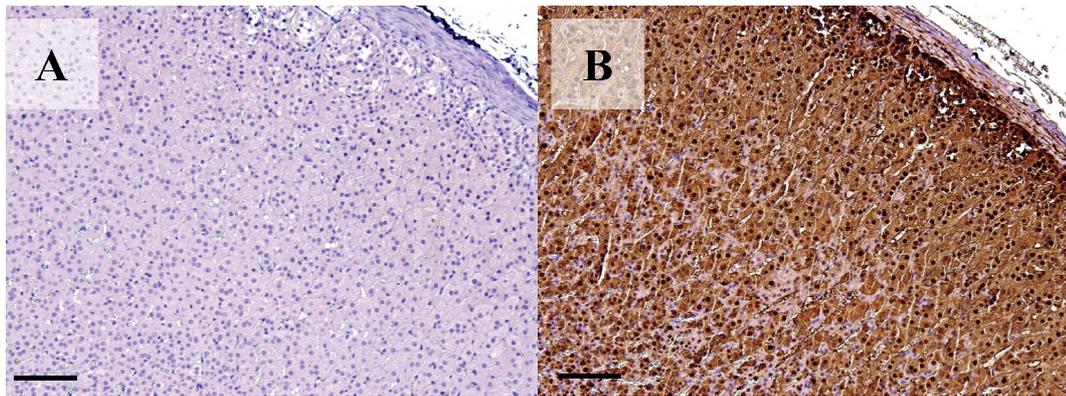


Abbildung 6. Negativ- (A) und Positivkontrolle (B) der S100 Immunhistochemie. *A und B zeigen Nebennierenschnitte. Bei der Positivkontrolle (B) kann eine deutliche immunoreaktivität, in Form einer zytoplasmatischen Braunfärbung, gesehen werden, wohingegen die Negativkontrolle kein Signal zeigt. Maßstabsleisten = 100 μ m.*

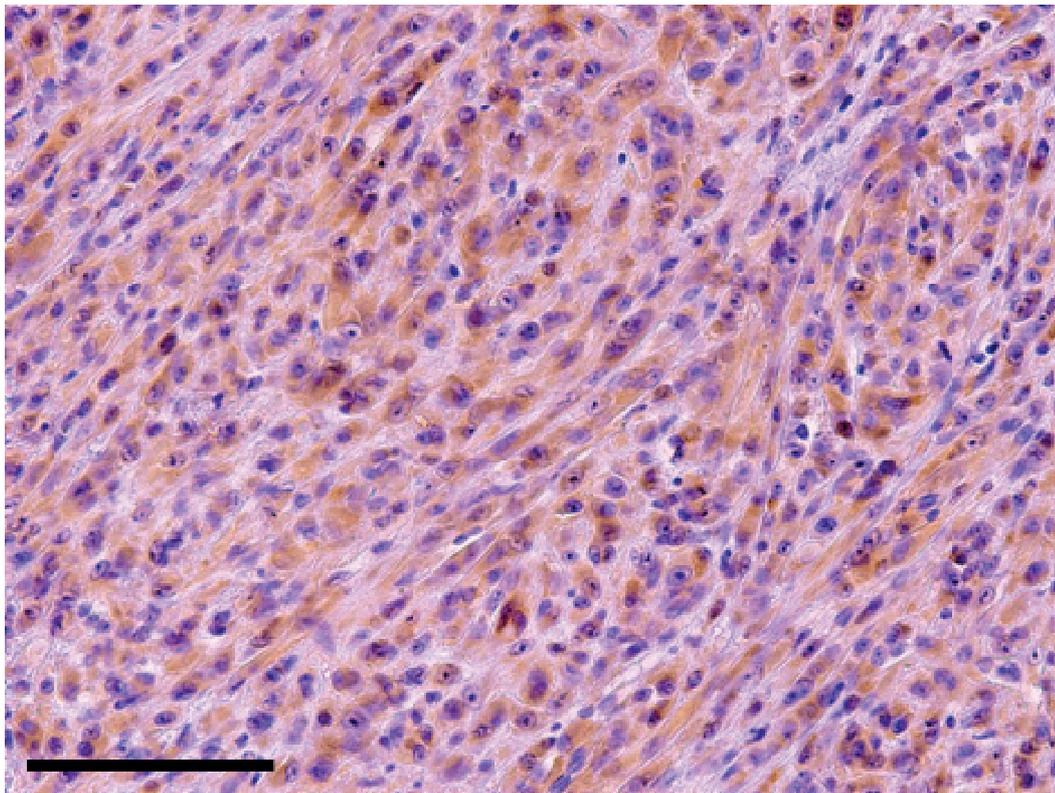


Abbildung 4. Immunhistochemische Darstellung der S100 Expression bei einem kaninen oralen spindelzelligen Sarkom. *Bei 200-facher Vergrößerung ist eine deutliche zytoplasmatische Braunfärbung des mesenchymalen Tumorgewebes sichtbar. Maßstabsleiste = 100 μ m.*

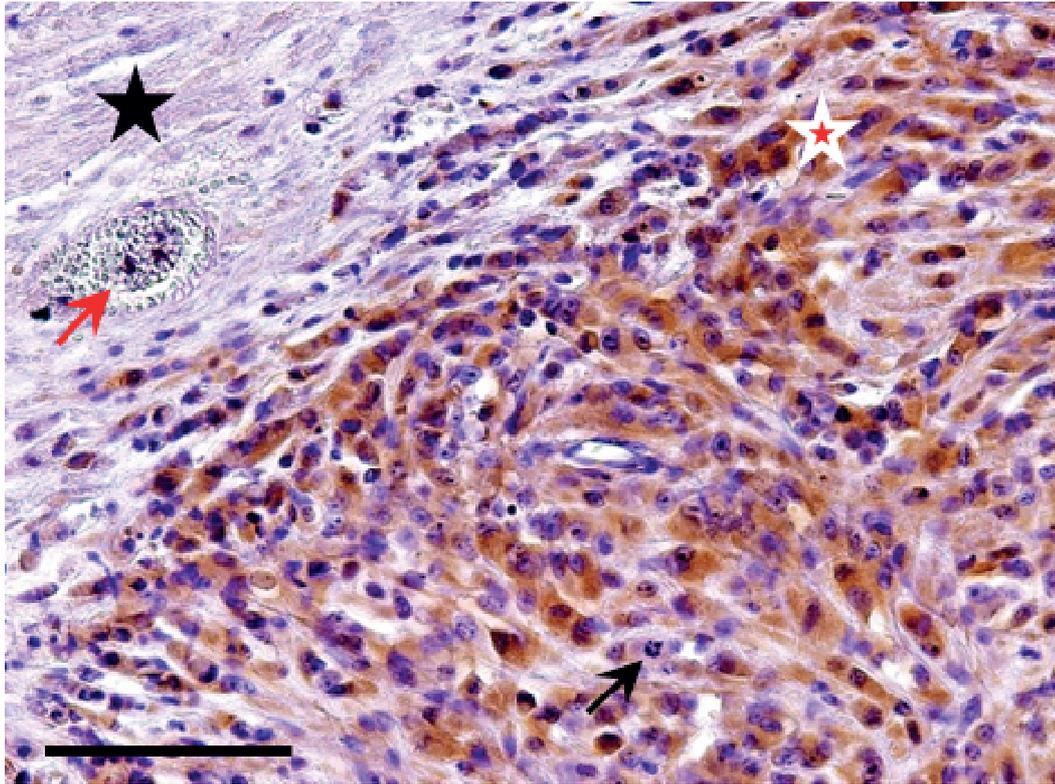


Abbildung 5. S100 Expression bei einem kaninen oralen spindelzelligen Sarkom. Bei 200-facher Vergrößerung ist eine deutliche Unterscheidung des mesenchymalen Tumorgewebes, welches S100 exprimiert (weiß-roter Stern,) und des Gewebes, welches kein S100 exprimiert (schwarzer Stern). Im Grenzbereich findet sich ein Gefäß (roter Pfeil), dessen Endothel keine S100 Reaktivität aufweist. Der schwarze Pfeil markiert eine Mitose. Maßstabsleiste = 100µm.

2.3. MCT1-MCT4-Doppelfärbung

Ein Ziel dieser Studie war herauszufinden ob eine MCT1-MCT4-Doppelfärbung bei kaninen oralen spindelzelligen Sarkomen möglich ist, da bisher bei Hunden nur eine immunhistochemische Darstellung von MCT1 bei kaninen oralen und okulären Melanomen beschrieben wurde (SHIMOYAMA et al., 2007).

Mit der durchgeführten Doppelfärbung konnten bei 100 % (n = 26) der Tumoren MCT4 detektiert werden und bei 92,3 % (n = 24) MCT1. Als Kontrollgewebe wurde für MCT1 quergestreifte Muskulatur und Leber verwendet. Für MCT4 diente auch quergestreifte Muskulatur als Kontrolle.

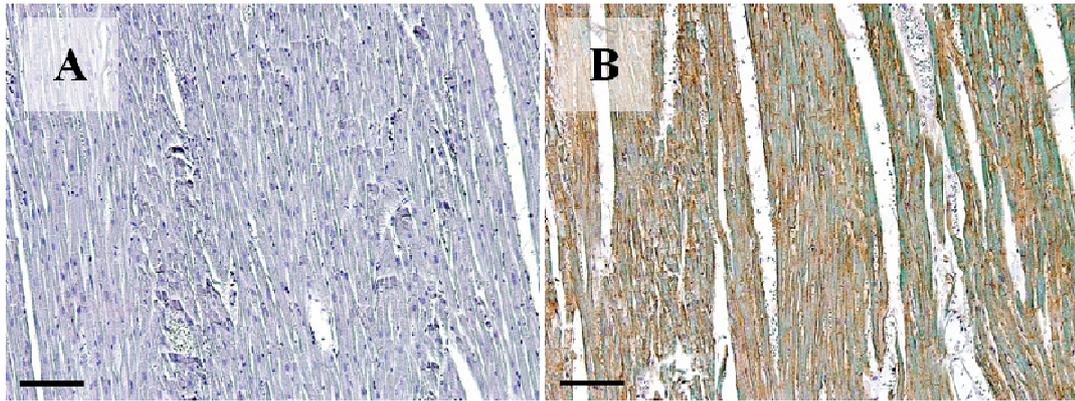


Abbildung 10. Negativ- (A) und Positivkontrolle (B) der Monocarboxylattransporter (MCT) Immunhistochemie. A und B zeigen Schnitte von quergestreifter Muskulatur. Bei der Positivkontrolle (B) kann eine deutliche Immunreaktivität, in Form einer membranären Braunfärbung (MCT1 - Signal) und einer zytoplasmatischen Grünfärbung (MCT4-Signal), gesehen werden, wohingegen die Negativkontrolle kein Signal zeigt. Maßstabsleiste = 100 μ m.

In den immunhistochemischen Untersuchungen zeigten sich MCT1-positive Zellen mit einer vorwiegend membranären Braunfärbung. MCT4-positive Zellen erkennt man an der zytoplasmatischen Grünfärbung, welche oftmals klumpig erscheint. Zellen, welche sowohl MCT1- als auch MCT4-positiv sind, hatten sowohl die membranäre Braunfärbung, als auch die zytoplasmatische Grünfärbung.

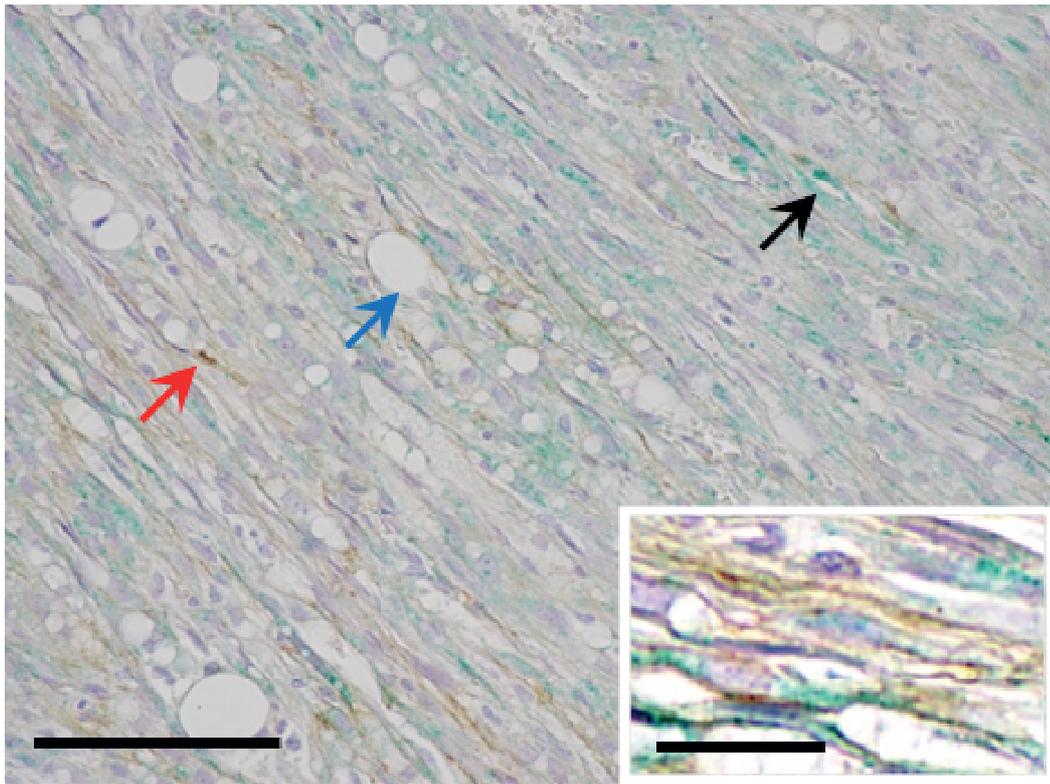


Abbildung 7. Monocarboxylattransporter 1 und 4 (MCT1 und 4)-Doppelfärbung eines kaninen oralen spindelzelligen Sarkoms. Die Braunfärbung des MCT1 Signals findet sich vornehmlich membranär (roter Pfeil), wohingegen die Grünfärbung des MCT4 Signals zytoplasmatisch gefunden wird und oftmals klumpig erscheint (schwarzer Pfeil). In diesem Tumor sind auch viele Fettvakuolen (blauer Pfeil) zu finden, welche auf schnellen Zelluntergang hindeuten. Maßstabsleiste = 100µm (großes Bild), und 25 µm (kleines Bild).

Die untersuchten spindelzelligen Sarkome zeigten allesamt eine deutliche MCT4-Immunoreaktivität. Dahingegen erwies sich nur ein kleiner Anteil der Tumorzellen als MCT1-positiv, von denen die Mehrheit MCT1 und MCT4-positiv war.

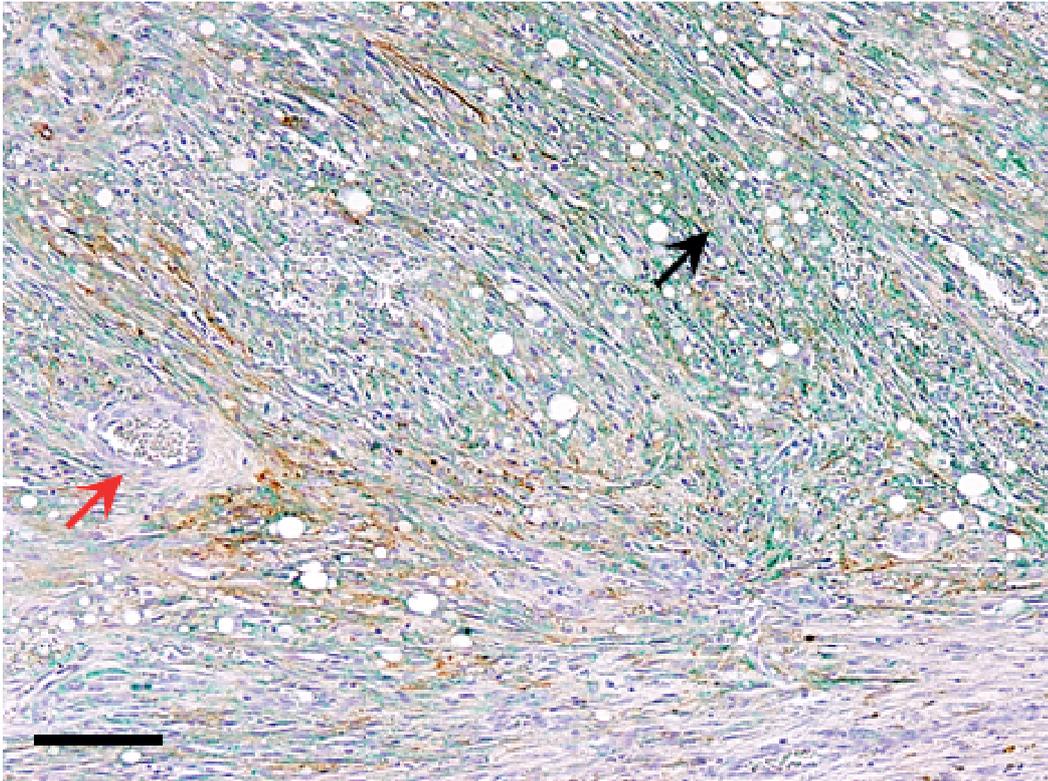


Abbildung 8. Monocarboxylattransporter 1 und 4 (MCT1 und 4)-Doppelfärbung eines kaninen oralen spindelzelligen Sarkoms. *Tumorgewebe mit deutlichem MCT4-Signal (blaue Pfeilspitze), das an der zytoplasmatischen Grünfärbung erkannt werden kann. MCT1 wird nur in einigen Bereichen, vornehmlich in Gefäßnähe (schwarzer Pfeil) und oftmals in Co-Expression mit MCT4. Maßstabsleiste = 100µm.*

Wie bereits durch Shimoyama et al. beschrieben, zeigten auch in dieser Studie die Basalzellen der oralen Schleimhaut eine stark positive Reaktion auf MCT1 (Abbildung 9) (SHIMOYAMA et al., 2007).

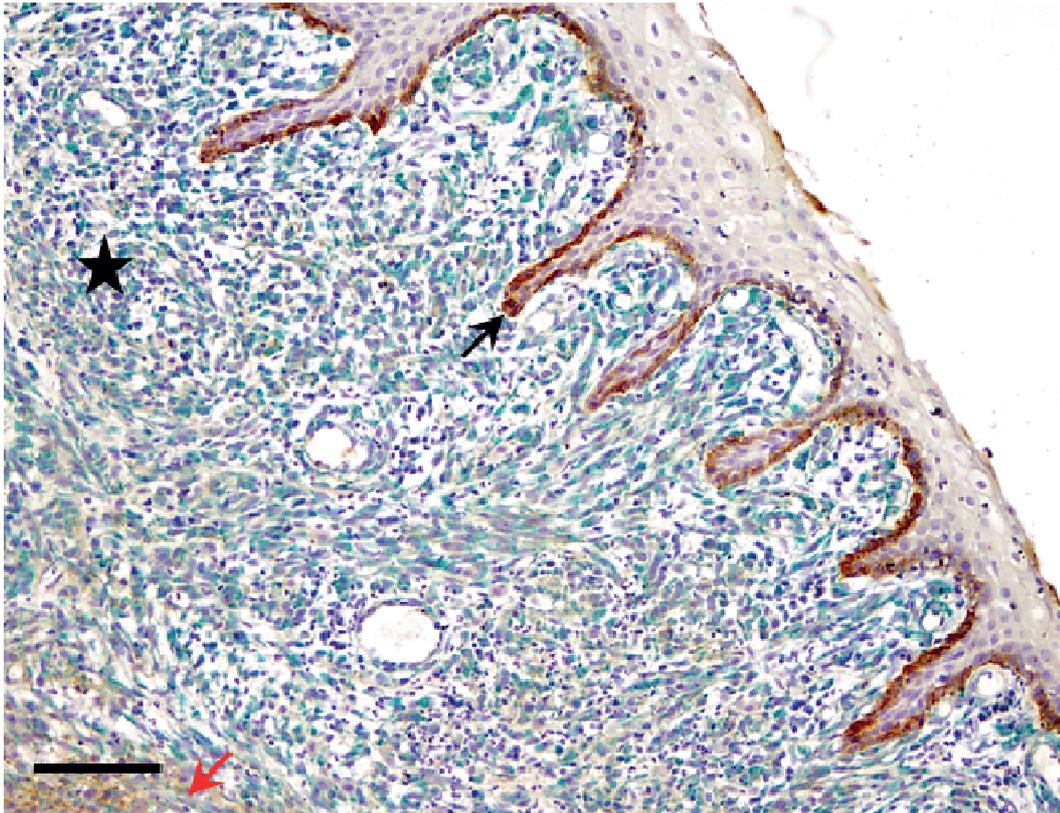


Abbildung 9. Monocarboxylattransporter 1 (MCT1) Immunoreaktivität der Basalzellen der Maulschleimhaut. *Deutliche MCT1-Positivität der Basalzellen in Form von vornehmlich membranärer Braunfärbung (schwarzer Pfeil). Darunterliegendes spindelzelliges Tumorgewebe exprimiert überwiegend MCT4 (Stern). Der rote Pfeil markiert einen Bereich der Co-Expression von MCT1 und MCT4. Maßstabsleiste = 100µm.*

2.4. VEGF

Der Vascular Endothelial Growth Factor wird von hypoxischen Zellen unter Einfluss von HIF-1 gebildet und exprimiert. Er kann daher sowohl intrazytoplasmatisch als Braunfärbung, wie auch als wolkige Braunfärbung außerhalb von Zellen gefunden werden.

Als Kontrollgewebe wurden Schnitte einer Leber verwendet, welche bekanntermaßen VEGF exprimiert.

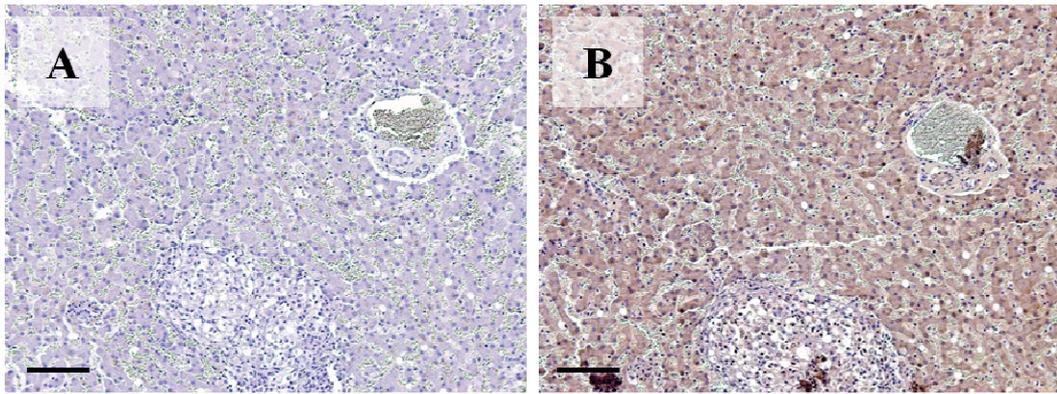


Abbildung 13. Negativ- (A) und Positivkontrolle (B) der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Immunhistochemie. *A und B zeigen Schnitte einer VEGF-exprimierenden Leber. Bei der Positivkontrolle (B) kann eine deutliche Immunreaktivität, in Form einer zytoplasmatischen Braunfärbung, gesehen werden, wohingegen die Negativkontrolle kein Signal zeigt. Maßstabsleisten = 100 μ m.*

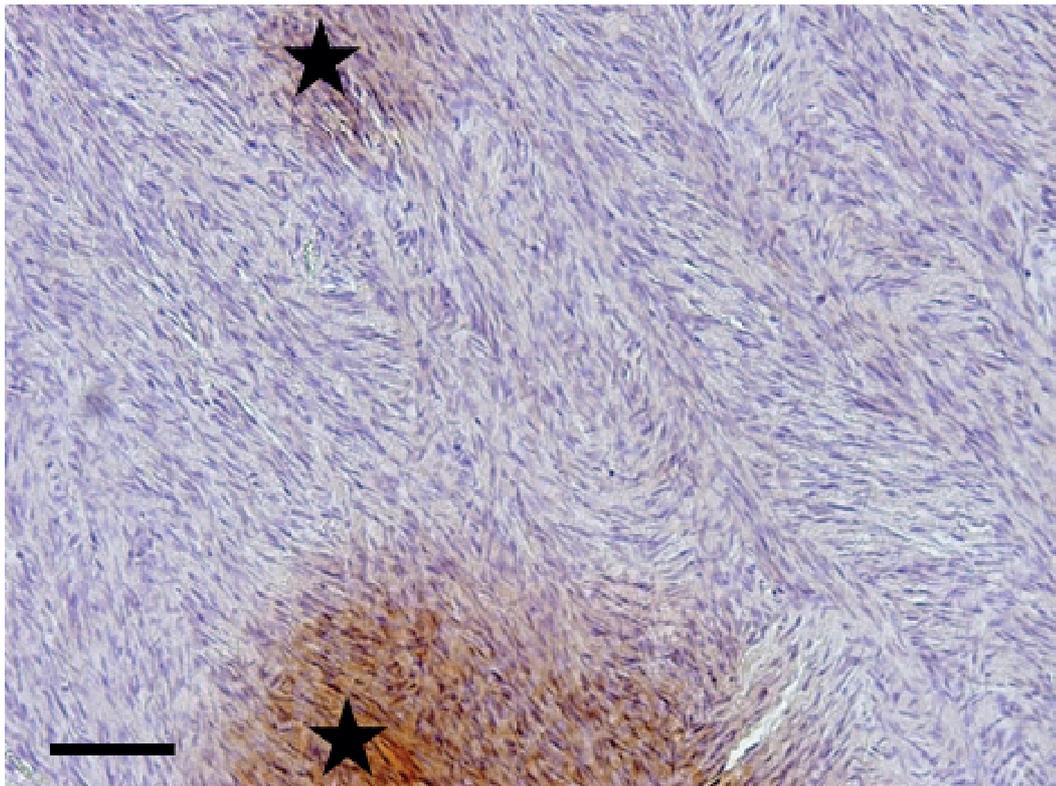


Abbildung 11. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in einem kaninen oralen spindelzelligen Sarkom. *Die Sterne markieren Bereiche, in denen die Tumorzellen VEGF produzieren und exkretieren. Dieser wird durch die Braunfärbung detektiert. Maßstabsleiste = 100 μ m.*

VEGF wiederum stimuliert die Gefäßneubildung indem er an seinen Rezeptor

bindet, welcher sich am Gefäßendothel befindet. Daher zeigt auch das Gefäßendothel eine Immunreaktivität.

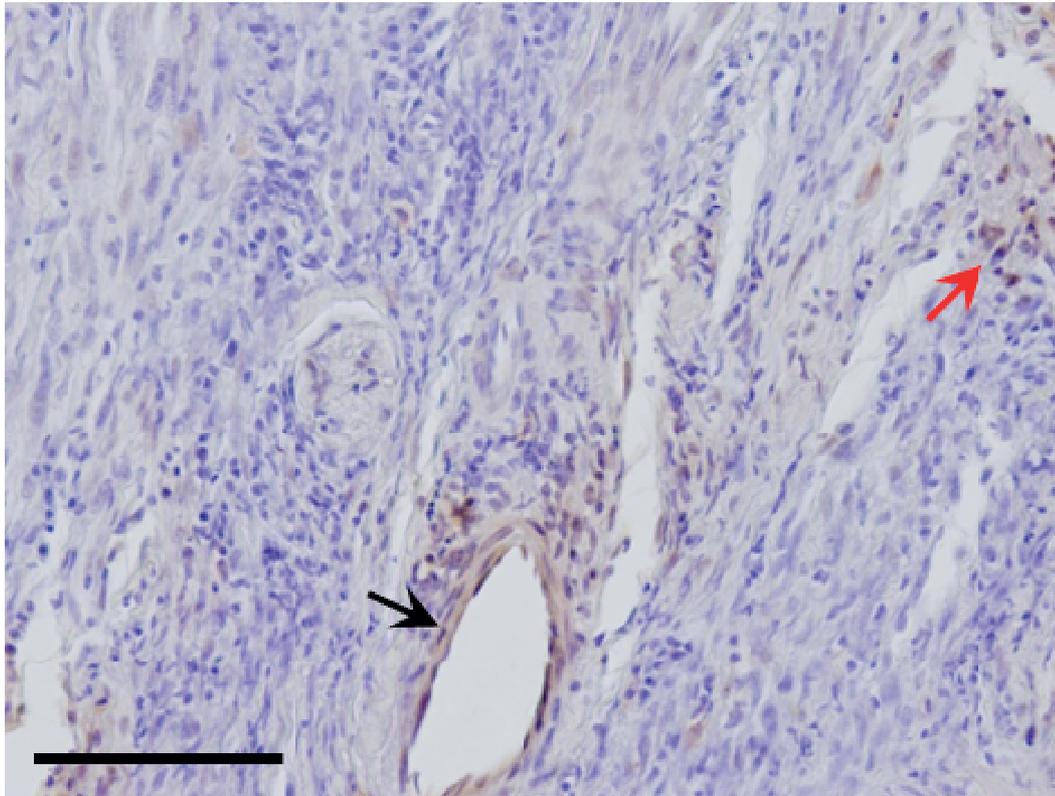


Abbildung 12. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-positives Gefäßendothel in kaninem oralen spindelzelligem Sarkom. *Der schwarze Pfeil markiert ein Gefäß im Tumorgewebe, dessen Endothel VEGF-positiv ist. Benachbarte Tumorzellen produzieren und exkretieren den Faktor (roter Pfeil). Maßstabsleiste = 100µm.*

3. Quantitative Auswertung

Für die quantitative Auswertung der immunhistochemisch behandelten Schnitte wurde das Visiopharm-Visiomorph V/S© Stereologieprogramm verwendet. Es wurden die Volumenanteile der S100-, MCT1-, MCT4-, MCT1 und MCT4- und der VEGF-positiven Zellen bestimmt.³

3.1. S100

Für die Auswertung wurde zunächst der Volumenanteil der S100-positiven Zellen auf 80 % geschätzt. Mit Hilfe des Weibel Nomogramms und unter Einbeziehung des Standardfehlers von 5 %, der zu erwarten ist, ergab sich

³ Tabelle mit den jeweiligen Volumendichten aller 26 untersuchten Tumorproben im Anhang

hierdurch, die Anzahl der auszuwertenden Punkte von 200 pro Gewebeprobe.

Bei 200-facher Vergrößerung wurde ein Raster mit 64 Punkten pro Gesichtsfeld gewählt. Durchschnittlich wurden $13,5 \pm 1,6$ Gesichtsfelder pro Gewebeprobe evaluiert. Innerhalb dieser Gesichtsfelder ergab sich im Mittel eine Anzahl von 660 Punkten pro Gewebe, die Tumor trafen, und somit ausgewertet werden konnten. Somit wurden dreimal mehr Punkte ausgewertet, als nötig gewesen wären.

Für die S100-positiven Zellanschnitte ergab sich ein Volumenanteil von $71,6 \pm 19,5$ %, welcher in Abbildung 14 grafisch dargestellt ist.

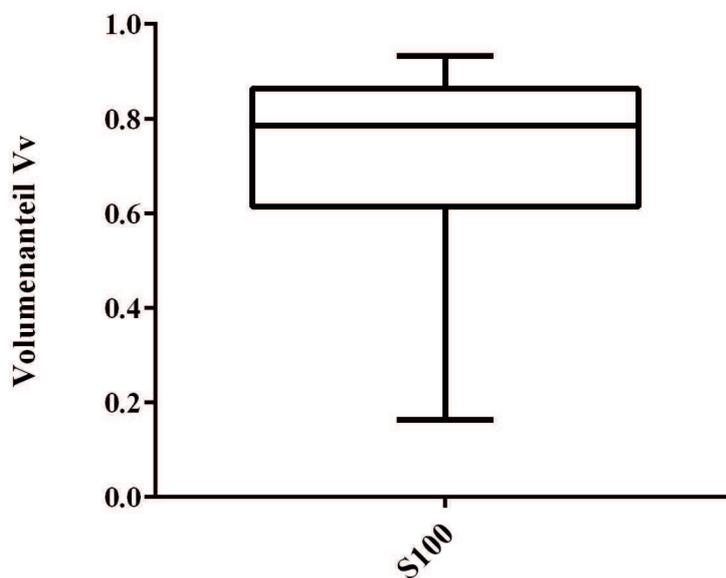


Abbildung 14. Verteilung der $V_{V(S100/Gewebe)}$. Box- und Whiskerplot Analyse der Volumendichte der S100-positiven Zellen aller 26 Proben.

3.2. MCT1-MCT4- Doppelfärbung

Um die Anzahl der auszuwertenden Punkte zu bestimmen wurde zunächst der Anteil der MCT1-positiven Zellen auf 5 % geschätzt. Laut Weibel-Nomogramm, und mit Berücksichtigung des 5%igen zu erwartenden Standardfehlers, ergab sich hieraus eine Anzahl von 4000 auszuwertenden Punkten. Der Anteil der MCT4-positiven Zellen wurde auf 70 % geschätzt wodurch sich eine Anzahl von 200 auszuwertenden Punkten ergab.

Bei 200-facher Vergrößerung wurde ein Raster mit 1600 Punkten pro Gesichtsfeld für die Auswertung der MCT1-positiven Zellen ausgewählt, sowie ein Raster mit

64 Punkten pro Gesichtsfeld für die Auswertung der MCT4-positiven Zellen. Durchschnittlich wurden $17,3 \pm 3,1$ Gesichtsfelder pro Tumor evaluiert. Innerhalb dieser Gesichtsfelder ergab sich für MCT1 im Mittel eine Anzahl von 20905,2 Punkten pro Gewebeprobe und für MCT4 im Mittel eine Anzahl von 836,2 Punkten pro Gewebeprobe, die Tumorgewebe trafen, und somit ausgewertet werden konnten. Somit wurden für MCT1 mehr als fünfmal so viele Punkte und für MCT4 viermal so viele Punkte ausgewertet, als nötig gewesen wären.

Zwei der Tumore hatten keine MCT1-positiven Zellen in den ausgewerteten Gesichtsfeldern. Da die Basalzellen der Maulschleimhaut allerdings eine Immunreaktivität auf MCT1 zeigten, hat die simultane immunhistochemische Darstellung von MCT1 und MCT4 auch bei diesen beiden Proben funktioniert.

Der Volumenanteil der MCT1-positiven Zellen lag bei $6,4 \pm 11,0$ %. Für die MCT4-positiven Zellen war dieser Wert bei $81,0 \pm 15,4$ % und die MCT1 und MCT4-positiven Zellen machten $5,4 \pm 9,2$ % aus (Abbildung 15). Damit ergibt sich ein Anteil von 1,1 % der Tumorzellen, die ausschließlich MCT1-positiv sind, sowie 75,6 % ausschließlich MCT4-positiv Tumorzellen. Vergleicht man den Anteil der MCT1 und MCT4-positiven Tumorzellen mit den MCT4-positiven Tumorzellen, entsprachen die MCT1 und MCT4-positiven Zellen 6,7 % der MCT4-positiven Zellen. Betrachtet man dahingegen das Verhältnis der MCT1 und MCT4-positiven Tumorzellen zu den MCT1-positiven Tumorzellen, ergab sich ein Anteil von 84,4 %.

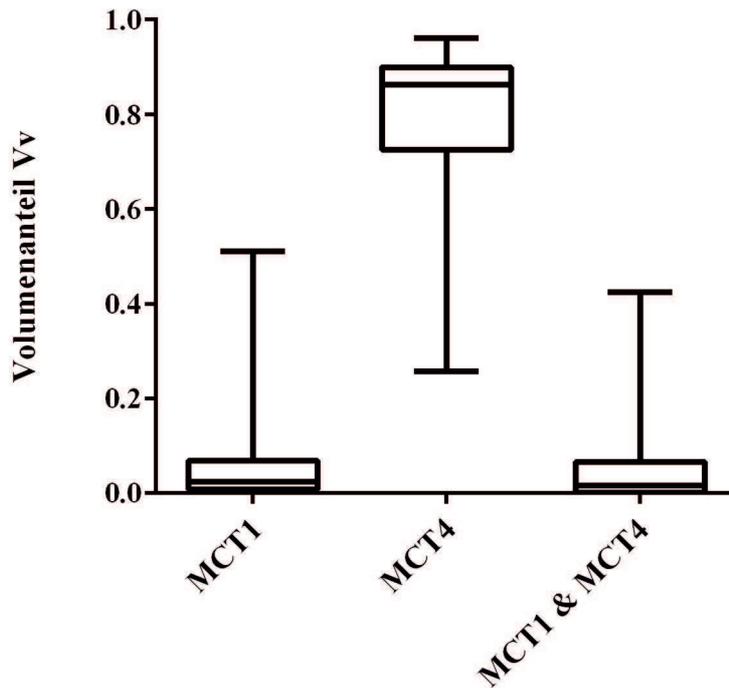


Abbildung 15. Verteilung der $V_{V(MCT1/Tumorgewebe)}$, $V_{V(MCT4/Tumorgewebe)}$, $V_{V(MCT1 \& MCT4/Tumorgewebe)}$. Box- und Whiskerplot Analyse der jeweiligen Volumenanteile der MCT1-positiven Zellen, MCT4-positiven Zellen, sowie der MCT1 und MCT4-positiven Zellen aller 26 Proben.

3.3. VEGF

Der VEGF-positive Volumenanteil wurde auf 20 % geschätzt wodurch sich mit dem Weibel-Nomogramm eine Anzahl von 1000 Punkten ergibt, die ausgewertet werden mussten. Der zu erwartende Standardfehler von 5 % wurde auch hier berücksichtigt.

Bei 200-facher Vergrößerung wurde ein Raster mit 256 Punkten pro Gesichtsfeld ausgewählt. Durchschnittlich wurden $16,2 \pm 2,0$ Gesichtsfelder evaluiert. Innerhalb dieser Gesichtsfelder trafen im Durchschnitt 3312 Punkte Tumorgewebe und konnten ausgewertet werden, womit mehr als dreimal so viele Punkte ausgewertet wurden, als nötig gewesen wären.

Für VEGF-positive Zellanschnitte ergab sich, wie in Abbildung 16 dargestellt, ein Volumenanteil von $18,3 \pm 17,8$ %.

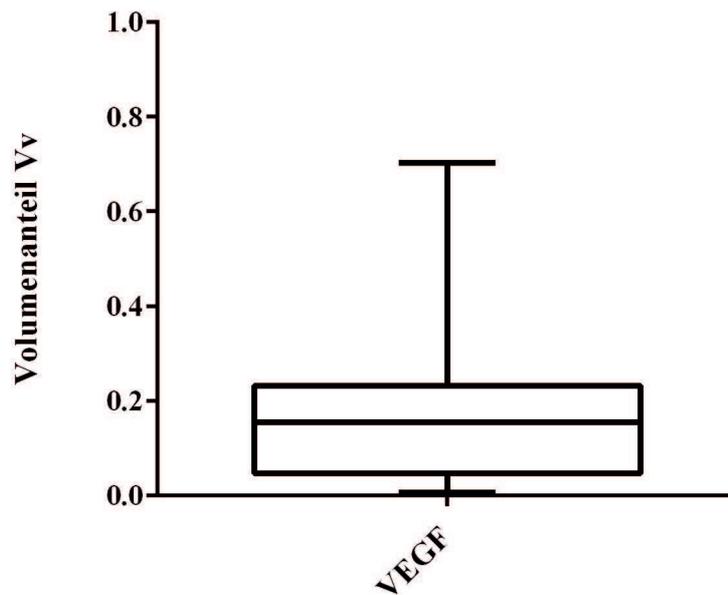


Abbildung 16. Verteilung der $V_V(\text{VEGF/Tumorgewebe})$. Box- und Whiskerplot Analyse der Volumenanteile der VEGF-positiven Zellen aller 26 Proben.

Weder in der qualitativen, noch in der quantitativen Auswertung konnte eine Verbindung der Expressionen von VEGF und MCT nachvollzogen werden.

V. DISKUSSION

Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass kanine orale spindelzellige Sarkome die Monocarboxylattransporter 1 und 4 exprimieren und dass eine immunhistochemische Darstellung der Co-Expression der beiden Transporter durchführbar ist. Außerdem eignen sich MCT1 und MCT4 um chronische und zyklische Hypoxie zu unterscheiden, weshalb mit der MCT1-MCT4-Doppelfärbung Areale von chronischer Hypoxie, zyklischer Hypoxie und Normoxie auf einem Schnittpräparat eines Tumors unterschieden werden können. Die Erstellung einer solchen Hypoxiekarte bei Neoplasien kann in der Zukunft ein hilfreiches Untersuchungswerkzeug sein, insbesondere für die Prognosenstellung und als Grundlage für künftige Therapieansätze.

Da Tumorhypoxie bekanntermaßen mit Therapieresistenzen, erhöhter Metastasierungsrate und schlechteren Prognosen in Verbindung gebracht werden kann (TEICHER, 1994; BRIZEL et al., 1996; HOCKEL et al., 1996a ; HOCKEL et al., 1996b; BRIZEL et al., 1997; TATUM et al., 2006) und insbesondere auch zyklische Hypoxie vermehrt zu Mutationen (REYNOLDS et al., 1996) und spontanen Metastasierungen (CAIRNS & HILL, 2004) führt, ist die Möglichkeit der Identifizierung und Quantifizierung von chronischer und zyklischer Hypoxie in malignen Tumoren ein wichtiger Schritt. Die Untersuchung von Tumoren auf deren Ausmaß an Hypoxie und auf das Verteilungsmuster der Hypoxiearten könnte in Zukunft in der Routinediagnostik eingesetzt werden um eine individuelle Metastasierungswahrscheinlichkeit zu ermitteln und eine präzisere Prognose zu stellen. Dies wiederum beeinflusst die Entscheidung ob bei einem Patienten der Einsatz einer Therapie sinnvoll ist und welche Therapie oder Therapiekombination für diesen Patienten am aussichtsreichsten ist um den jeweiligen Tumor kurativ zu behandeln.

In einer bisher unveröffentlichten Studie von Wergin et al. wurde mit *in vitro* Versuchen gezeigt, dass unter hypoxischen Bedingungen die Expression von MCT1 innerhalb von 18 Stunden reduziert wird, MCT4 allerdings schon nach zwei Stunden vermehrt exprimiert wird. Hierdurch entsteht eine zeitliche Überlappung, in der es zu einer Co-Expression der beiden Monocarboxylattransporter kommen kann. In dieser Studie wurde außerdem die

Co-Expression von EF5, einem exogenen Hypoxiemarker, sowie MCT1 und MCT4 als mögliche endogene Hypoxiemarker bei eingefrorenen humane Kopf- und Halstumoren untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine starke Korrelation von Normoxie und der Expression von MCT1, sowie Hypoxie und der Expression von MCT4. Außerdem wurden bei allen Proben überlappende Bereiche mit der Co-Expression von MCT1 und MCT4 beschrieben, die sich ebenso durch eine leichte bis mittelgradige EF5-Positivität auszeichneten. Die Autoren schlossen daraus, dass es sich bei der Co-Expression von MCT1 und MCT4 um zyklische Hypoxie handelt (WERGIN et al., in Review).

Die Annahme, dass Zellen bei zyklischer Hypoxie sowohl MCT1 als auch MCT4 exprimieren, wurde für diese Studie übernommen. Die Ergebnisse zeigten eine deutlich stärkere Expression von MCT4 mit 81 % positiven Zellen, von denen 75,6 % ausschließlich MCT4 und 5,4 % sowohl MCT4 als auch MCT1 exprimierten. Nur 1,1 % der Zellen exprimierten ausschließlich MCT1. Wenn also die Co-Expression von MCT1 und MCT4 auf zyklische Hypoxie hindeutet, macht diese bei den kaninen oralen spindelzelligen Sarkomen nur einen Anteil von 6,7 % der hypoxischen Zellen aus. Die große Mehrheit von 93,3 % der hypoxischen Zellen ist somit chronisch hypoxisch. Die Erkenntnis, dass durchschnittlich über 80 % der Tumorzellen in kaninen oralen spindelzelligen Sarkomen hypoxisch sind und 75,6 % chronisch hypoxisch, ist vergleichbar mit den Daten einer Studie von Rohrer Bley et al., bei der unter anderem Messungen des Sauerstoffpartialdruckes und der Vaskularisierung bei kaninen oralen Tumoren durchgeführt wurden. Hierbei hatten orale Sarkome deutlich geringere pO_2 -Werte und eine geringere Vaskularität als orale Plattenepithelkarziome oder orale Melanome (ROHRER BLEY et al., 2009). Bei einem geringeren Sauerstoffpartialdruck wird in Tumoren die von den Zellen benötigte Energie über die anaeroben Glykolyse produziert (WARBURG, 1926). Das dabei entstehende Laktat muss aus den Tumorzellen exportiert werden, was vornehmlich über den Monocarboxylattransporter 4 geschieht (JUEL & HALESTRAP, 1999). Daher ist es nicht verwunderlich, dass in der aktuellen Studie ein Großteil der Sarkomzellen MCT4 exprimierten. Die geringere Vaskularität bei oralen Sarkomen, im Vergleich zu anderen oralen Tumoren, erklärt den großen Anteil chronisch hypoxischer Zellen. Tumorzellen, welche sich weiter als 170 μm von einem Gefäß befinden werden dauerhaft mit Sauerstoff unterversorgt (THOMLINSON & GRAY, 1955). Je weniger Gefäße in

einem Tumor vorhanden sind, desto größer ist der Anteil der Tumorzellen, die chronisch hypoxisch sind. Dies kann in der vorliegenden Studie durch den hohen Anteil der Sarkomzellen, die ausschließlich MCT4 exprimierten, nachvollzogen werden.

Mit dieser Studie konnte nicht nur gezeigt werden, dass kanine orale spindelzellige Sarkome die Monocarboxylattransporter 1 und 4 exprimieren, sondern es konnte auch erfolgreich eine Doppelfärbung der beiden Transporter durchgeführt werden. Möchte man in der Immunhistochemie mehrere Antigene in einem Gewebe nachweisen besteht die Möglichkeit bei konsekutiven Schnitten jeweils ein Antigen pro Schnitt darzustellen und anschließend die Schnitte übereinanderzulegen. Eine deutlich elegantere und präzisere Variante hingegen ist, mehrere Antigene auf einem Schnitt darzustellen. Dabei kann die Co-Expression zweier oder mehrerer Antigene in einer Zelle sicher und exakt detektiert werden. Voraussetzung für eine immunhistochemische Darstellung mehrerer Antigene auf einem Schnitt ist die unterschiedliche Lokalisation der Antigene in den Zellen. Da MCT1 vornehmlich membranär exprimiert wird und MCT4 zytoplasmatisch, wird diese Prämisse von den beiden Transportern erfüllt. Nachdem es mit dem, in dieser Studie verwendeten, immunhistochemischen Protokoll nun gelungen ist MCT1 und MCT4 auf nur einem Schnitt darzustellen, eröffnet dies für künftige Studien die Möglichkeit die Co-Expression der MCTs exakt darzustellen und deren Bedeutung weiter zu untersuchen.

Da die Proben für diese Studie nicht prospektiv gesammelt wurden, sondern aus dem Probenbestand des Pathologischen Institutes der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin stammen, konnte kein exogener Hypoxiemarker eingesetzt werden um die hypoxischen Areale zu verifizieren. Exogene Hypoxiemarker, wie EF5, werden dem Patienten vor einer chirurgischen Tumorentfernung infundiert. Liegt der Sauerstoffpartialdruck unter 10 mmHg kommt es zu einer Bioreduktion des Markers und die Bindung ans Gewebe wird ermöglicht. Nachdem der Tumor entfernt wurde, kann der exogene Hypoxiemarker mit dem passenden Antikörper angefärbt werden (VARGHESE et al., 1976; RALEIGH & KOCH, 1990). Das Ziel der aktuellen Studie war auf die Durchführbarkeit einer MCT1-MCT4-Doppelfärbung und deren Auswertung ausgelegt. Hierfür wurden die Ergebnisse der Studie von Wergin et al., die eine Korrelation von Hypoxie (EF5 positiv) und MCT4 sowie Normoxie (EF5 negativ)

und MCT1 zeigten (WERGIN et al., in Review), als kausal erachtet. Zudem wurde neben den Monocarboxylattransportern ein bekannter endogener Hypoxiemarker, der Vascular Endothelial Growth Factor, detektiert.

Der Vascular Endothelial Growth Factor gehört zu den proangiogenetischen Faktoren und wird durch HIF-1 stimuliert (SHWEIKI et al., 1992). Er wird von Zellen, die hypoxischem Stress ausgesetzt sind, produziert und sekretiert. Durch die Bindung an seinen Rezeptor, der sich am Gefäßendothel befindet, wird die Gefäßneubildung gefördert mit dem Ziel die hypoxischen Zellen wieder mit Sauerstoff zu versorgen. Angesichts dessen wurde zu Beginn dieser Studie die Hypothese gestellt, dass es bei den kaninen oralen spindelzelligen Sarkomen eine Verbindung zwischen der Detektion von VEGF mit der Expression von MCT4 und der Co-Expression von MCT1 und MCT4 gibt. Zwar zeigten 100 % der untersuchten Sarkome eine Expression von VEGF, allerdings lag die durchschnittliche Volumendichte nur bei 18,3 %. Mit einer 82%igen Volumendichte von MCT4 und da bereits bekannt ist, dass orale Sarkome stark hypoxisch sind, wäre eine höhere Volumendichte von VEGF zu erwarten gewesen. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die Detektion von VEGF in Formalin-fixiertem Gewebe schwierig ist, da es sich um einen instabilen Faktor handelt. Eine weitere Ursache könnte sein, dass für die immunhistochemische Untersuchung nur Gewebe aus jeweils einem Bereich der Tumoren zur Verfügung stand, wodurch keine akkurate Ermittlung der Volumenanteile möglich war. Um das Verhältnis der Expressionen von MCT und VEGF darzulegen, bedarf es weiterer Studien, bei denen mehrere Bereiche der Tumoren beprobt und untersucht werden.

Aufgrund der sich ständig verändernden Sauerstoffversorgung im Tumorgewebe (CARDENAS-NAVIA et al., 2008) verändern sich insbesondere die Areale der zyklischen Hypoxie fortlaufend. In einer folgenden Studie könnte die Untersuchung unterschiedlicher Tumorbereiche einen guten Überblick über die aktuelle hypoxische Situation des zu untersuchenden Tumors darstellen, nachdem mit der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, dass kanine orale spindelzellige Sarkome mit einer MCT1-MCT4-Doppelfärbung untersucht werden können. Obwohl das untersuchte Tumolvolumen nur klein war, gehen wir von einem signifikanten Ergebnis aus. Bereits vorangegangene Studien konnten zeigen, dass die Analyse eines nur sehr geringen Volumens einen Einfluss auf die

Prognose hatte. Weitere Studien zur Untersuchung eines größeren Volumens zur genauen quantitativen Evaluierung der Expression von MCT1 und MCT4 in kaninen oralen spindelzelligen Sarkomen sind in Planung.

Die vorliegenden positiven Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit von Folgestudien um die Expression und Verteilung der Monocarboxylattransporter in Tumoren und deren Bedeutung weiter zu erforschen. Die Kombination der MCT1-MCT4-Doppelfärbung mit der Untersuchung eines exogenen Hypoxiemarkers wäre erstrebenswert, um die Ergebnisse der MCT-Expression bei den kaninen oralen spindelzelligen Sarkomen zu validieren. Mit Hilfe der simultanen Detektion von MCT1 und MCT4 können auch weitere Faktoren auf deren Korrelation mit den Monocarboxylattransportern hin untersucht werden. Des Weiteren sind Untersuchungen bezüglich der klinischen Bedeutung der Monocarboxylattransporter unerlässlich. MCT1 und MCT4 bieten ein interessantes prognostisches Potential, insbesondere in Hinsicht auf die Aggressivität von Tumoren, die Metastasierungswahrscheinlichkeit und die Wahrscheinlichkeit von Therapieresistenzen. Daher wären künftige Studien, die die Bedeutung der Monocarboxylattransporter untersuchen wünschenswert.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es konnte mit dieser Studie nachgewiesen werden, dass kanine orale spindelzellige Sarkome die Monocarboxylattransporter 1 und 4 exprimieren. Aufgrund ihrer Funktion als Laktattransporter eignen sich MCT1 und MCT4 nicht nur zur Detektion von Hypoxie im Tumorgewebe, sondern auch zur Unterscheidung von chronischer Hypoxie, zyklischer Hypoxie und Normoxie. Mit dem hier vorgestellten Protokoll zur simultanen Darstellung von MCT1 und MCT4 ist insbesondere eine exakte Detektion der Zellfraktion möglich, welche sowohl MCT1 als auch MCT4 exprimiert und somit zyklisch hypoxisch ist.

Die untersuchten Gewebeproben der kaninen oralen spindelzelligen Sarkome zeigten allesamt eine starke Immunreaktivität auf MCT4, welche sich als zytoplasmatische, meist klumpig erscheinende, Grünfärbung in den Schnitten darstellte. Die Volumendichte dieser MCT4-positiven Zellen lag bei 81 % des Tumorgewebes, was bedeutet, dass 81 % der Zellen in den untersuchten Tumoren hypoxisch waren. Die Volumendichte der MCT1- und MCT4-positiven Zellen lag bei 5,4 % des Tumorgewebes. Die Co-Expression der beiden Transporter zeigte sich sowohl durch eine zytoplasmatische Grünfärbung (MCT4-Immunreaktivität), als auch eine membranäre Braunfärbung (MCT1-Immunreaktivität). Von den MCT4-positiven Zellen waren daher 6,7 % auch MCT1-positiv, was auf eine zyklische Hypoxie dieser Zellen hindeutet. Die restlichen 93,3 % der hypoxischen, MCT4-positiven, Zellen ist damit chronisch hypoxisch. Die Volumendichte der Zellen, die ausschließlich MCT1-positiv waren, sich also durch eine vorwiegend membranäre Braunfärbung darstellten und die normoxische Zellfraktion detektierten, lag nur bei 1,1 % des Tumorgewebes. Diese Ergebnisse korrelieren mit einer Studie von Rohrer Bley et al., die bei kaninen oralen Sarkomen eine geringe Vaskularität und einen sehr niedrigen Sauerstoffpartialdruck beschreibt. Insbesondere auch im Vergleich mit kaninen oralen Plattenepithelkarzinomen und kaninen oralen Melanomen erwiesen sich die Sarkome als stark hypoxisch (ROHRER BLEY et al., 2009).

Eine Verbindung der Expression des proangiogenetischen Faktors VEGF und des hypoxischen Volumenanteils konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Da VEGF bekanntermaßen von hypoxischen Zellen überexprimiert wird

(SHWEIKI et al., 1992), wäre eine Verbindung der MCT4-positiven Zellen und der MCT1- und MCT4-positiven Zellen mit der Expression von VEGF zu erwarten. Dies konnte in der aktuellen Studie nicht nachvollzogen werden, was daran gelegen haben könnte, dass VEGF ein instabiler Faktor ist und daher in Formalin-fixiertem Gewebe schwierig zu detektieren ist. Ein weiterer Grund für die fehlende Verbindung könnte gewesen sein, dass für die Studie nur konsekutive Schnitte aus einem Bereich des jeweiligen Tumorgewebes zur Verfügung standen, wodurch insbesondere die quantitative Auswertung nur eine begrenzte Aussagekraft besitzt.

Nachdem mit dieser Studie erfolgreich die Expression von MCT1 und MCT4 bei kaninen oralen spindelzelligen Sarkomen nachgewiesen wurde und mit dem vorgestellten immunhistochemischen Protokoll eine probate Methode zur Detektion der Co-Expression der beiden Transporter zur Verfügung steht, wäre eine prospektive Folgestudie sinnvoll. Hierbei könnte neben MCT1 und MCT4 auch ein exogener Hypoxiemarker, wie beispielsweise EF5, untersucht werden, womit man die Ergebnisse der MCT-Expression validieren würde. Außerdem wäre die Probengewinnung aus unterschiedlichen Bereichen eines Tumors von Vorteil. Da sich die Sauerstoffversorgung innerhalb des Tumors bekanntermaßen ständig ändert (CARDENAS-NAVIA et al., 2008) spiegeln die Ergebnisse von einer Untersuchung aus einem Bereich eines Tumors nur eine Momentaufnahme wieder. Dies könnte durch eine Mehrfachbeprobung umgangen werden. Auch die Aussagekraft der quantitativen Auswertung steigt mit der Untersuchung mehrerer Bereiche eines Tumors.

In Zukunft könnte die MCT1-MCT4-Doppelfärbung in der Routinediagnostik eingesetzt werden um eine Hypoxiekarte eines Tumors zu erstellen und das Ausmaß der zyklischen und chronischen Hypoxie zu bestimmen. Hierdurch könnte eine individuelle Metastasierungswahrscheinlichkeit ermittelt und eine präzise Prognose gestellt werden, was wiederum die Entscheidung für eine individuelle Therapie des Patienten beeinflusst.

VII. SUMMARY

With this study we were able to show that canine orale spindle cell-like sarcoma express the monocarboxylate transporters 1 and 4. Because of their function as lactate transporters they are not only useful to detect hypoxia in tumor tissue, but also to differentiate between chronic hypoxia, cyclic hypoxia and normoxia. The presented double-staining protocol for MCT1 and MCT4 allows to identify exactly the fraction of tumor cells that expresses MCT1 and MCT4 and therefor is cyclic hypoxic.

All examined canine oral spindle cell-like sarcoma sections showed a significant immunoreactivity for MCT4. The positive signal can be seen as cytoplasmatic, often clumpy, green staining. The volume density of the MCT4-positive cells was 81 % of tumor tissue and reflects the hypoxic volume of the tumor. The volume density of the MCT1 and MCT4-positive cells was 5.4 % of tumor tissue. Cells that did co-express MCT1 and MCT4 showed cytoplasmatic green staining (MCT4-positivity) and membranary brown staining (MCT1-positivity). Out of the MCT4-positive cells, 6.7 % were also MCT1 positive, which means they were cyclic hypoxic. The remaining 93.3 % of the MCT4-positive cells was therefore chronic hypoxic. The volume density of the tumor cells that showed immunoreactivity for MCT1 was only 1.1 %. This fraction was detected by the mainly membranary brown stainig and is considered normoxic. These results correlate with a study by Rohrer Bley et al. that describes a low vascularity and a very low oxygen pressure in canine oral sarcomas. Especially, compared to canine oral squamous cell carcinoma and canine oral melanoma, the examined sarcomas showed strong hypoxia (ROHRER BLEY et al., 2009).

In this study we could not show a correlation between the expression of the proangiogenetic factor VEGF and the hypoxic cell fraction. It is known that hypoxic cells overexpress VEGF, so we expected a correlation between the immunoreactivity for VEGF and the expression of MCT4 and the co-expression of MCT1 and MCT4. An explanation for the missing correlation between the expression of VEGF and MCT could be due to the fact that VEGF is an instable factor that is difficult to detect in formalin fixed tissue. Another reason for these results could be that we only examined consecutive samples from one area of each

tumor. This is a limitation of the quantitative analysis.

We were able to show that canine oral spindle cell-like sarcomas express MCT1 and MCT4, and we presented a double-staining protocol for these markers, which allows an exact detection of cell fractions that co-express both transporters. Therefore a prospective follow-up study would be the next step and would allow the comparison of the MCT1 and MCT4 expression with an exogenic hypoxia marker, for example EF5, to validate the presented data. Furthermore it would be possible to take samples from hypoxic and oxygenated areas to further validate the results. As it is known that the oxygen delivery in solid tumors constantly changes (CARDENAS-NAVIA et al., 2008), the results from just one tumor area reflect only a short moment of the real situation in the tumor.

In the future, the MCT1-MCT4-double-staining could be used routinely as a diagnostic tool to create a hypoxia mapping of a tumor and to detect the extend of cyclic and chronic hypoxia. This would help to determine an individual probability of metastasis and to predict a precise prognosis, which influences the decision for an individual therapy.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Achermann R, Ohlerth S, Fidel J, Gardelle O, Gassmann M, Roos M, Saunders HM, Scheid A, Wergin M, Kaser-Hotz B. Ultrasound guided, pre-radiation oxygen measurements using polarographic oxygen needle electrodes in spontaneous canine soft tissue sarcomas. *In Vivo* 2002; 16: 431-7.

Baba M, Inoue M, Itoh K, Nishizawa Y. Blocking CD147 induces cell death in cancer cells through impairment of glycolytic energy metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 111-6.

Baker SK, McCullagh KJ, Bonen A. Training intensity-dependent and tissue-specific increases in lactate uptake and MCT-1 in heart and muscle. *J Appl Physiol* (1985) 1998; 84: 987-94.

Bashan N, Burdett E, Hundal HS, Klip A. Regulation of glucose transport and GLUT1 glucose transporter expression by O₂ in muscle cells in culture. *Am J Physiol* 1992; 262: C682-90.

Bonen A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur J Appl Physiol* 2001; 86: 6-11.

Borthakur A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K, Dudeja PK. Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: involvement of NF-kappaB pathway. *J Cell Biochem* 2008; 103: 1452-63.

Bouzier AK, Goodwin R, de Gannes FM, Valeins H, Voisin P, Canioni P, Merle M. Compartmentation of lactate and glucose metabolism in C6 glioma cells. A ¹³c and ¹H NMR study. *J Biol Chem* 1998; 273: 27162-9.

Brizel DM, Rosner GL, Harrelson J, Prosnitz LR, Dewhirst MW. Pretreatment oxygenation profiles of human soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30: 635-42.

Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 1996; 56: 941-3.

Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 38: 285-9.

Brown JM. Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. *Br J Radiol* 1979; 52: 650-6.

Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Water L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992; 176: 1375-9.

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993a; 53: 4727-35.

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF, Senger DR. Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol* 1993b; 143: 1255-62.

Cairns RA, Kalliomaki T, Hill RP. Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 8903-8.

Cairns RA, Hill RP. Acute hypoxia enhances spontaneous lymph node metastasis in an orthotopic murine model of human cervical carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 2054-61.

Cao Y, Li CY, Moeller BJ, Yu D, Zhao Y, Dreher MR, Shan S, Dewhirst MW.

Observation of incipient tumor angiogenesis that is independent of hypoxia and hypoxia inducible factor-1 activation. *Cancer Res* 2005; 65: 5498-505.

Cardenas-Navia LI, Mace D, Richardson RA, Wilson DF, Shan S, Dewhirst MW. The pervasive presence of fluctuating oxygenation in tumors. *Cancer Res* 2008; 68: 5812-9.

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394: 485-90.

Ciekot PA, Powers BE, Withrow SJ, Straw RC, Ogilvie GK, LaRue SM. Histologically low-grade, yet biologically high-grade, fibrosarcomas of the mandible and maxilla in dogs: 25 cases (1982-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1994; 204: 610-5.

Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, Louis NA, Montalto MC, Colgan SP. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 2002; 62: 3387-94.

Cori CF (1931) Mammalian carbohydrate metabolism. *Am Physiological Soc*

De Saedeleer CJ, Porporato PE, Copetti T, Perez-Escuredo J, Payen VL, Brisson L, Feron O, Sonveaux P. Glucose deprivation increases monocarboxylate transporter 1 (MCT1) expression and MCT1-dependent tumor cell migration. *Oncogene* 2014; 33: 4060-8.

Debatin K-M, Poncet D, Kroemer G. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2002; 21: 8786-803.

Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvorak HF. Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial

growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med* 1994; 180: 1141-6.

Deuticke B, Beyer E, Forst B. Discrimination of three parallel pathways of lactate transport in the human erythrocyte membrane by inhibitors and kinetic properties. *Biochim Biophys Acta* 1982; 684: 96-110.

Deuticke B. Monocarboxylate transport in erythrocytes. *J Membr Biol* 1982; 70: 89-103.

Deuticke B. Monocarboxylate transport in red blood cells: kinetics and chemical modification. *Methods Enzymol* 1989; 173: 300-29.

Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 425-37.

Dietz A, Rudat V, Vanselow B, Wollensack P, Bettscheider C, Conradt C, Eble MJ. Rise of oxygenation in cervical lymph node metastasis during the initial course of radiochemotherapy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 121: 789-96.

Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Broer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* 2000; 350 Pt 1: 219-27.

Dubouchaud H, Granier P, Mercier J, Le Peuch C, Prefaut C. Lactate uptake by skeletal muscle sarcolemmal vesicles decreases after 4 wk of hindlimb unweighting in rats. *J Appl Physiol* (1985) 1996; 80: 416-21.

Durand RE. Intermittent blood flow in solid tumours--an under-appreciated source of 'drug resistance'. *Cancer Metastasis Rev* 2001; 20: 57-61.

Dvorak HF, Dvorak AM, Manseau EJ, Wiberg L, Churchill WH. Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts,

microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J Natl Cancer Inst* 1979a; 62: 1459-72.

Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, Churchill WH, Dvorak AM, Galli SJ, Feder J, Bitzer AM, Rypysc J, Giovinco P. Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *J Immunol* 1979b; 122: 166-74.

Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 97-132.

Edward M, Gillan C, Micha D, Tammi RH. Tumour regulation of fibroblast hyaluronan expression: a mechanism to facilitate tumour growth and invasion. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1215-23.

Enoki T, Yoshida Y, Lally J, Hatta H, Bonen A. Testosterone increases lactate transport, monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in rat skeletal muscle. *J Physiol* 2006; 577: 433-43.

Fanelli A, Grollman EF, Wang D, Philp NJ. MCT1 and its accessory protein CD147 are differentially regulated by TSH in rat thyroid cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E1223-9.

Fang J, Quinones QJ, Holman TL, Morowitz MJ, Wang Q, Zhao H, Sivo F, Maris JM, Wahl ML. The H⁺-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma. *Mol Pharmacol* 2006; 70: 2108-15.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3: 453-8.

Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. Cold Spring Harbor Protocols 2008; 2008: pdb. prot4986.

Folkman J, Cole P, Zimmerman S. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. Annals of surgery 1966; 164: 491.

Folkman J. The intestine as an organ culture. Carcinoma of the colon and antecedent epithelium. Springfield IL, Charles C Thomas 1970: 113-27.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 1971; 285: 1182-6.

Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J Exp Med 1971; 133: 275-88.

Forrest LJ, Chun R, Adams WM, Cooley AJ, Vail DM. Postoperative radiotherapy for canine soft tissue sarcoma. J Vet Intern Med 2000; 14: 578-82.

Frazier SA, Johns SM, Ortega J, Zwingenberger AL, Kent MS, Hammond GM, Rodriguez CO, Jr., Steffey MA, Skorupski KA. Outcome in dogs with surgically resected oral fibrosarcoma (1997-2008). Vet Comp Oncol 2012; 10: 33-43.

Froberg MK, Gerhart DZ, Enerson BE, Manivel C, Guzman-Paz M, Seacotte N, Drewes LR. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 in normal and neoplastic human CNS tissues. Neuroreport 2001; 12: 761-5.

Gallagher SM, Castorino JJ, Philp NJ. Interaction of monocarboxylate transporter 4 with beta1-integrin and its role in cell migration. Am J Physiol Cell Physiol 2009; 296: C414-21.

Gardner H, Fidel J, Haldorson G, Dernell W, Wheeler B. Canine oral fibrosarcomas: a retrospective analysis of 65 cases (1998-2010). Vet Comp Oncol

2015; 13: 40-7.

Gerhart DZ, Enerson BE, Zhdankina OY, Leino RL, Drewes LR. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am J Physiol* 1997; 273: E207-13.

Gladden L. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *The Journal of physiology* 2004; 558: 5-30.

Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379: 88-91.

Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1237-45.

Halestrap AP, Wang X, Poole RC, Jackson VN, Price NT. Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1997; 80: 17A-25A.

Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 1999; 343 Pt 2: 281-99.

Halestrap AP, Meredith D. The SLC16 gene family--from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 2004; 447: 619-28.

Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life* 2012; 64: 109-19.

Hall EJ, Giaccia AJ (2006) *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins

Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 38-47.

Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K, Brooks GA. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J* 2007; 21: 2602-12.

Hockel M, Schlenger K, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Hypoxia and Radiation Response in Human Tumors. *Semin Radiat Oncol* 1996a; 6: 3-9.

Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996b; 56: 4509-15.

Hoyt R, Withrow S. Oral malignancy in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1984; 20: 83-92.

Izumi H, Takahashi M, Uramoto H, Nakayama Y, Oyama T, Wang KY, Sasaguri Y, Nishizawa S, Kohno K. Monocarboxylate transporters 1 and 4 are involved in the invasion activity of human lung cancer cells. *Cancer Sci* 2011; 102: 1007-13.

Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; 271: 17771-8.

Juel C, Halestrap AP. Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol* 1999; 517 (Pt 3): 633-42.

Karamchandani JR, Nielsen TO, van de Rijn M, West RB. Sox10 and S100 in the diagnosis of soft-tissue neoplasms. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2012; 20: 445-50.

Kasraeian S, Allison DC, Ahlmann ER, Fedenko AN, Menendez LR. A

comparison of fine-needle aspiration, core biopsy, and surgical biopsy in the diagnosis of extremity soft tissue masses. *Clinical Orthopaedics and Related Research*® 2010; 468: 2992-3002.

Kimura H, Braun RD, Ong ET, Hsu R, Secomb TW, Papahadjopoulos D, Hong K, Dewhirst MW. Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer Res* 1996; 56: 5522-8.

Kosovsky JK, Matthiesen DT, Marretta SM, Patnaik AK. Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs. *Vet Surg* 1991; 20: 397-401.

Kumar P. Tumor hypoxia and anemia: impact on the efficacy of radiation therapy. *Semin Hematol* 2000; 37: 4-8.

Kuntz CA, Dernel WS, Powers BE, Devitt C, Straw RC, Withrow SJ. Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986-1996). *J Am Vet Med Assoc* 1997; 211: 1147-51.

Lardner A. The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 522-30.

Lascelles BD, Henderson RA, Seguin B, Liptak JM, Withrow SJ. Bilateral rostral maxillectomy and nasal planectomy for large rostral maxillofacial neoplasms in six dogs and one cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004; 40: 137-46.

Leader M, Collins M, Patel J, Henry K. Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker. *Histopathology* 1987; 11: 63-72.

Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wycoff CC, Pastorek J, Ratcliffe PJ, Stratford IJ, West CM. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor

oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res* 2001; 61: 6394-9.

Martinive P, Defresne F, Bouzin C, Saliez J, Lair F, Gregoire V, Michiels C, Dessy C, Feron O. Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies. *Cancer Res* 2006; 66: 11736-44.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399: 271-5.

McCullagh KJ, Bonen A. Reduced lactate transport in denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1995; 268: R884-8.

McCullagh KJ, Juel C, O'Brien M, Bonen A. Chronic muscle stimulation increases lactate transport in rat skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1996; 156: 51-7.

McKnight JA, Mauldin GN, McEntee MC, Meleo KA, Patnaik AK. Radiation treatment for incompletely resected soft-tissue sarcomas in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217: 205-10.

McSporran K. Histologic grade predicts recurrence for marginally excised canine subcutaneous soft tissue sarcomas. *Veterinary Pathology Online* 2009; 46: 928-33.

Molls M, Stadler P, Becker A, Feldmann HJ, Dunst J. Relevance of oxygen in radiation oncology. Mechanisms of action, correlation to low hemoglobin levels. *Strahlenther Onkol* 1998; 174 Suppl 4: 13-6.

Nelson DA, Tan TT, Rabson AB, Anderson D, Degenhardt K, White E. Hypoxia

and defective apoptosis drive genomic instability and tumorigenesis. *Genes Dev* 2004; 18: 2095-107.

Nordsmark M, Bentzen SM, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, Becker A, Adam M, Molls M, Dunst J, Terris DJ, Overgaard J. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol* 2005; 77: 18-24.

Nozue M, Lee I, Yuan F, Teicher BA, Brizel DM, Dewhirst MW, Milross CG, Milas L, Song CW, Thomas CD. Interlaboratory variation in oxygen tension measurement by Eppendorf "Histogram" and comparison with hypoxic marker. *Journal of surgical oncology* 1997; 66: 30-8.

Okunieff P, de Bie J, Dunphy EP, Terris DJ, Hockel M. Oxygen distributions partly explain the radiation response of human squamous cell carcinomas. *Br J Cancer Suppl* 1996; 27: S185-90.

Pierre K, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* 2005; 94: 1-14.

Pilegaard H, Domino K, Noland T, Juel C, Hellsten Y, Halestrap AP, Bangsbo J. Effect of high-intensity exercise training on lactate/H⁺ transport capacity in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999; 276: E255-61.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359: 845-8.

Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 1993; 264: C761-82.

Raleigh JA, Koch CJ. Importance of thiols in the reductive binding of 2-nitroimidazoles to macromolecules. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 2457-64.

Rassnick KM. Medical management of soft tissue sarcomas. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33: 517-31.

Reinhold HS, Blachiwiecz B, Blok A. Oxygenation and reoxygenation in 'sandwich' tumours. *Bibl Anat* 1977: 270-2.

Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res* 1996; 56: 5754-7.

Rohrer Bley C, Luluhova D, Roos M, Kaser-Hotz B, Ohlerth S. Correlation of pretreatment polarographically measured oxygen pressures with quantified contrast-enhanced power doppler ultrasonography in spontaneous canine tumors and their impact on outcome after radiation therapy. *Strahlenther Onkol* 2009; 185: 756-62.

Royet JP. Stereology: a method for analyzing images. *Prog Neurobiol* 1991; 37: 433-74.

Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res* 1994; 54: 6517-25.

Saier MH, Jr. Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleanings concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol Rev* 1994; 58: 71-93.

Salisbury SK, Lantz GC. Long-term results of partial mandibulectomy for treatment of oral tumors in 30 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1988; 24: 285-94.

Selting KA, Powers BE, Thompson LJ, Mittleman E, Tyler JW, Lafferty MH, Withrow SJ. Outcome of dogs with high-grade soft tissue sarcomas treated with and without adjuvant doxorubicin chemotherapy: 39 cases (1996-2004). *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227: 1442-8.

Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 5680-4.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-32.

Semenza GL. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J Clin Invest* 2008; 118: 3835-7.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-5.

Sharkey AM, Charnock-Jones DS, Boocock CA, Brown KD, Smith SK. Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 609-15.

Shi Q, Abbruzzese JL, Huang S, Fidler IJ, Xiong Q, Xie K. Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3711-21.

Shi Q, Le X, Wang B, Abbruzzese JL, Xiong Q, He Y, Xie K. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 3751-6.

Shifren JL, Doldi N, Ferrara N, Mesiano S, Jaffe RB. In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implications for mode of action. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 316-22.

Shimoyama Y, Akihara Y, Kirat D, Iwano H, Hirayama K, Kagawa Y, Ohmachi

T, Matsuda K, Okamoto M, Kadosawa T, Yokota H, Taniyama H. Expression of monocarboxylate transporter 1 in oral and ocular canine melanocytic tumors. *Vet Pathol* 2007; 44: 449-57.

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-5.

Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 768-72.

Sloane BF, Moin K, Krepela E, Rozhin J. Cathepsin B and its endogenous inhibitors: the role in tumor malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 9: 333-52.

Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 3930-42.

Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, Arbeit JM, Brown JM, Chao KS, Chapman JD, Eckelman WC, Fyles AW, Giaccia AJ, Hill RP, Koch CJ, Krishna MC, Krohn KA, Lewis JS, Mason RP, Melillo G, Padhani AR, Powis G, Rajendran JG, Reba R, Robinson SP, Semenza GL, Swartz HM, Vaupel P, Yang D, Croft B, Hoffman J, Liu G, Stone H, Sullivan D. Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *Int J Radiat Biol* 2006; 82: 699-757.

Teicher BA, Lazo JS, Sartorelli AC. Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 1981; 41: 73-81.

Teicher BA. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13: 139-68.

Teicher BA. Physiologic mechanisms of therapeutic resistance. Blood flow and hypoxia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995; 9: 475-506.

Theon AP, Rodriguez C, Madewell BR. Analysis of prognostic factors and patterns of failure in dogs with malignant oral tumors treated with megavoltage irradiation. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210: 778-84.

Thomlinson R, Gray L. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British journal of cancer* 1955; 9: 539.

Thrall DE. Orthovoltage radiotherapy of oral fibrosarcomas in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1981; 179: 159-62.

Todoroff RJ, Brodey RS. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1979; 175: 567-71.

Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006; 281: 9030-7.

Varghese AJ, Gulyas S, Mohindra JK. Hypoxia-dependent reduction of 1-(2-nitro-1-imidazolyl)-3-methoxy-2-propanol by Chinese hamster ovary cells and KHT tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1976; 36: 3761-5.

Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001; 18: 243-59.

Walker LJ, Craig RB, Harris AL, Hickson ID. A role for the human DNA repair enzyme HAP1 in cellular protection against DNA damaging agents and hypoxic stress. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4884-9.

Wallace J, Matthiesen DT, Patnaik AK. Hemimaxillectomy for the treatment of

oral tumors in 69 dogs. *Vet Surg* 1992; 21: 337-41.

Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 4304-8.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5510-4.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123: 309-14.

Warburg OH (1926) über den Stoffwechsel der Tumoren. J. Springer

Ward J. DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 1988; 35: 95.

Weaver BA, Cleveland DW. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer cell* 2005; 8: 7-12.

Weibel ER (1979) *Stereological Methods: Vol.: 1.: Practical Methods for Biological Morphometry*. Academic press

Wergin MC, Kennedy K, Geradts J, Schroeder T, Sonveaux P, Feron O, Brizel DM, Dewhirst MW. MCT1 vs. MCT4 expression patterns in tumors: Potential Markers of Cycling Hypoxia. *Clin Canc Res*. In Review.

Withers HR. The four R's of radiotherapy. *Adv Radiat Biol* 1975; 5: 241-71.

Wu R, Racker E. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. *J. Biol. Chem* 1959; 234: 1029-35.

Yamaura H, Matsuzawa T. Tumor regrowth after irradiation; an experimental

approach. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1979; 35: 201-19.

Yuan G, Adhikary G, McCormick AA, Holcroft JJ, Kumar GK, Prabhakar NR. Role of oxidative stress in intermittent hypoxia-induced immediate early gene activation in rat PC12 cells. *J Physiol* 2004; 557: 773-83.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5.

IX. ANHANG

1. HE-Färbung

- | | |
|--|----------------------|
| 1. Brutschrank | 10 min (37 °C) |
| 2. Xylol | 3 x je minimum 5 min |
| 3. Alkoholreihe absteigend
(100 %, 100 %, 96 %, 80 %, 70 %, 50 %, 30 %) | je 5 min |
| 4. Aqua dest. | 5 min |
| 5. Hämalaun | 10 min |
| 6. Bläuen (laufendes Wasser) | |
| 7. Eosin | 5 min |
| 8. Alkoholreihe aufsteigend | |
| a. 70 %, 80 %, 96 %, 96 % | je 20 sek |
| b. 100 %, 100 %, 100 % | je 2 min |
| 9. Xylol | 3 x je 5 min |
| 10. Eindecken | |

2. S100-Färbung

- | | |
|---|----------------------|
| 1. Brutschrank | 10 min (37 °C) |
| 2. Xylol | 3 x je minimum 5 min |
| 3. Alkoholreihe absteigend
(100 %, 100 %, 96 %, 70 %) | je 3 min |
| 4. Aqua dest. | 5 min |
| 5. Demaskieren: Mikrowelle (700 W)
10 mM Citratpuffer pH 6,0 (9 ml Stamm-Lsg. A +
41 ml Stamm-Lsg. B + 450 ml Aqua Dest.) | 4 x 5 min |
| 6. Abkühlen bei Raumtemperatur | 20 min |
| 7. Aqua dest. | 5 min |
| 8. H ₂ O ₂ (1 % in Methanol) | 15 min |
| 9. PBS/Triton X (0,05 %) | 2 x je 5 min |
| 10. Normalserum: Ziege (in PBS 1:10) | 30 min |
| 11. Primär-Atk (1:400 in PBS) | 60 min |
| 12. PBS/Triton X (0,05 %) | 5 min |
| 13. Sekundär-Atk (1:200 in PBS) | 50 min |
| 14. PBS/Triton X (0,05 %) | 5 min |
| 15. ABC (Avidin-Biotin-Komplex) (1:100 in PBS) | 30 min |
| 16. PBS/Triton X (0,05 %) | 5 min |
| 17. DAB | bis Braunfärbung |
| 18. Aqua dest. | 5 min |
| 19. Counter Stain (Hämalaun) | 0,5 -1,5 min |
| 20. Bläuen (laufendes Wasser) | |
| 21. Aqua dest. | |
| 22. Alkoholreihe aufsteigend
(70 %, 96 %, 100 %, 100 %) | je 1 min |
| 23. Xylol | 3 x je 5 min |
| 24. Eindecken | |

3. MCT1-MCT4-Doppelfärbung

3.1. Tag 1

1. Brutschrank	10 min (37 °C)
2. Xylol	3 x je minimum 5 min
3. Alkoholreihe absteigend (100 %, 100 %, 96 %, 70 %)	je 3 min
4. Aqua dest.	5 min
5. H ₂ O ₂ (3,6 % in Methanol)	20 min
6. PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 min
7. Horse Serum (Impress)	20 - 30 min
8. Primär-Atk MCT 1 (1:200 in PBS)	über Nacht (4 °C)

3.2. Tag 2

9. Raumtemperatur	60 min
10. PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 min
11. Horse Anti-Rabbit (Impress)	30 min
12. PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 min
13. DAB	bis Braunfärbung
14. Aqua dest.	5 min
15. PBS	5 min
16. LinBlock	2 x 2 min
17. PBS/Triton X (0,05 %)	5 min
18. Primär-Atk MCT 4 (1:300 in PBS)	über Nacht (4 °C)

3.3. Tag 3

19. Raumtemperatur	60 min
20. PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 min
21. Horse Anti-Rabbit (Impress)	30 min
22. PBS/Triton X (0,05%)	3 x je 5 min
23. Histogreen	bis Grünfärbung
24. Aqua dest.	5 min
25. Counter Stain (Hämalaun)	0,5 -1,5 min
26. Bläuen (laufendes Wasser)	
27. Aqua dest.	
28. Alkoholreihe aufsteigend	

(70%, 96%, 100%, 100%)	je 1 min
29. Xylol	3 x je 5 min
30. Eindecken	

4. VEGF-Färbung

4.1. Tag 1

1. Brutschrank	10 min (37 °C)
2. Xylol	3 x je minimum 5 min
3. Alkoholreihe absteigend (100 %, 100 %, 96 %, 70 %)	je 3 min
4. Aqua dest.	5 min
5. PBS/Triton X (0,05 %)	5 min
6. Trypsin	20 min (37 °C)
7. PBS/Triton X (0,05 %)	2 x je 5 min
8. H ₂ O ₂ (1% in Methanol)	30 min
9. PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 min
10. Horse Serum (Impress)	20 min
11. Primär-Atk VEGF (1:50 in PBS)	über Nacht (4 °C)

4.2. Tag 2

12. Raumtemperatur	10 min
13. PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 min
14. Horse Anti-Rabbit (Impress)	30 min
15. PBS/Triton X (0,05 %)	3 x je 5 min
16. DAB	bis Braunfärbung
17. Aqua dest.	5 min
18. Counter Stain (Hämalaun)	0,5 -1,5 min
19. Bläuen (laufendes Wasser)	
20. Aqua dest.	
21. Alkoholreihe aufsteigend (70%, 96%, 100%, 100%)	je 1 min
22. Xylol	3 x je 5 min
23. Eindecken	

5. Volumendichten aller untersuchter kaninen oralen spindelzelligen Sarkomen

Probe	$V_{V(MCT1/Tumor)}$	$V_{V(MCT4/Tumor)}$	$V_{V(MCT1\&MCT4/Tumor)}$	$V_{V(VEGF/Tumor)}$
1	0,000222928	0,935016441	0,000222928	0,097826087
2	0,010091236	0,691503087	0,004838264	0,702964307
3	0	0,726491818	0	0,006535948
4	0,034423949	0,721511602	0,016650958	0,21569943
5	0,072834427	0,827421328	0,061825865	0,199821853
6	0,025742068	0,872927329	0,025742068	0,101120283
7	0,092912379	0,889993604	0,092912379	0,049012061
8	0,510362515	0,891245581	0,424897761	0,287481591
9	0,004410653	0,854112409	0,000756112	0,207121364
10	0,032387734	0,835764328	0,02371655	0,131755563
11	0,054187834	0,839303547	0,051669489	0,032700848
12	0,065404684	0,936658173	0,065404684	0,282748538
13	0,00971343	0,817522834	0,004349297	0,273636104
14	0,216898654	0,566030139	0,183711032	0,139101862
15	0	0,880283672	0	0,009661836
16	0,022604057	0,925104932	0,010493179	0,679705215
17	0,010117146	0,636095972	0,000689094	0,168871944
18	0,009780086	0,655100011	0,000386783	0,187947494
19	0,10207431	0,890813768	0,101116936	0,35685295
20	0,007833675	0,875123951	0,00228069	0,062463852
21	0,240284106	0,881711784	0,181854731	0,169297431
22	0,06526902	0,961141594	0,058021456	0,01097973
23	0,015630088	0,955334853	0,015630088	0,039638387
24	0,005745981	0,256476684	0,000464993	0,217052314
25	0,005911404	0,804100569	0,003442083	0,020648122
26	0,066782912	0,939232781	0,065387969	0,112027928

X. DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Johannes Hirschberger, für die Unterstützung und Betreuung während der gesamten Zeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Melanie Wergin bedanken, die mir dieses interessante Thema anvertraut hat und unter deren Betreuung ich diese Arbeit anfertigen durfte.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Kaspar Matiasek für die fachliche Unterstützung der pathologischen Aspekte, bei Dr. Andreas Blutke für die Unterstützung bei der morphometrischen Auswertung, sowie bei Karin Stingl, die jederzeit ein offenes Ohr hatte, insbesondere bei Fragen bezüglich der Immunhistochemie.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Achim Gruber vom Pathologischen Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin, der mir die Proben zur Verfügung gestellt hat.

Ein besonderer Dank gebührt auch meinen Mit-Doktoranden und den Residents aus der Onkologie, die mir nicht nur zwei äußerst interessante und lehrreiche Jahre beschert haben, sondern daraus auch eine unvergessliche Zeit gemacht haben. Lisi, Miri und Camille, dank euch wurde selbst der Prozess des Schreibens zur amüsanten Achterbahnfahrt mit Eiskaffee und Keksröllchen. Karin, Franzi und Katja, eure Unterstützung und Motivation hat geholfen so manches Tief zu überwinden. Und alle zusammen habt ihr mir durch das "Rahmenprogramm" die nötige Ablenkung verschafft und damit besondere Erinnerungen geschaffen.

Zu guter Letzt möchte ich noch meiner Mutter herzlich danken, die immer an mich geglaubt hat, mich unterstützt und angetrieben hat meine Träume zu verwirklichen und die mir all dies überhaupt erst ermöglicht hat.