

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß-
und Kinderchirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Das Phänomen der »differential stress resistance« bei
humanen kolorektalen Karzinomzelllinien: Steigerung des
antiproliferativen Effektes von 5-Fluoruracil bei
Glukoserestriktion und tumorphysiologischer
Sauerstoffkonzentration**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Carolina Jeanne Maria Barth
aus München

Würzburg, Juli 2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto

Korreferentin: Prof. Dr. Almut Schulze

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2018

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Das kolorektale Karzinom.....	- 1 -
1.2	Nebenwirkungen von Chemotherapeutika und supportive Maßnahmen	- 2 -
1.3	Fasten zur Vermeidung von Chemotherapie-Nebenwirkungen	- 4 -
1.4	Bedingungen malignen Wachstums <i>in vivo</i>	- 6 -
1.5	Ziel.....	- 8 -
2	Fragen	- 9 -
3	Material und Methoden	- 10 -
3.1	Zelllinien	- 10 -
3.2	Zellkultur und Zellernte	- 10 -
3.3	Kulturmedien und Pufferlösung.....	- 11 -
3.4	Kristallviolett-Assay.....	- 12 -
3.5	Zellproliferation	- 12 -
3.6	Der antiproliferative Effekt von 5-FU	- 13 -
3.7	Glukoseverbrauch und Laktatbildung.....	- 13 -
3.8	Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}).....	- 13 -
3.9	Datenauswertung.....	- 13 -
4	Ergebnisse	- 14 -
4.1	Charakterisierung der Zelllinien.....	- 14 -
4.2	Antiproliferativer Effekt definierter Kulturbedingungen	- 19 -
4.3	Der antiproliferative Effekt von 5-FU in Abhängigkeit von der Konzentration an Glukose und Wachstumsfaktoren bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen	- 23 -
5	Beantwortung der Fragen	- 30 -
6	Diskussion	- 32 -
6.1	Biologische Effekte einer Kalorienrestriktion	- 32 -
6.2	Grundlagen der »differential stress resistance« (DSR) bei transformierten und nicht-transformierten Zellen	- 34 -
6.3	Regulatorische Effekte tumorphysiologischer Sauerstoffkonzentrationen	- 38 -
7	Ausblick	- 40 -
8	Zusammenfassung	- 42 -
9	Literaturverzeichnis	- 44 -
10	Appendix	- 51 -
	Danksagung, Lebenslauf	

1 Einleitung

Krebserkrankungen stellen nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen dar. So wurden 2012 weltweit 8,2 Millionen Krebstote und 14 Millionen Neuerkrankungen gezählt. Torre und Mitautoren gehen davon aus, dass durch Bevölkerungswachstum, steigende Lebenserwartung und veränderte Lebensgewohnheiten¹ die Anzahl an Neuerkrankungen in den nächsten zwei Jahrzehnten weltweit um ca. 70 % ansteigen wird (Torre LA et al., 2015).

1.1 Das kolorektale Karzinom

Mehr als die Hälfte der in Deutschland von einem kolorektalen Karzinom Betroffenen erkranken jenseits des 70. Lebensjahres (www.krebsdaten.de). Das kolorektale Karzinom hat in Industrieländern bei Männern die dritthöchste Mortalität unter den Krebsentitäten, bei Frauen stellt es die zweithäufigste Todesursache dar (Torre LA et al., 2015). Insgesamt versterben weltweit ca. 700.000 Menschen jährlich an einem kolorektalen Karzinom (Torre LA et al. 2015).

Die Standardtherapie beim kolorektalen Karzinom stellt die operative Sanierung dar in Kombination mit einer adjuvanten bzw. neoadjuvanten Chemotherapie mit 5-Fluoruracil (5-FU)² oder Capecitabin, einer Vorstufe (Prodrug) von 5-FU, die um Oxaliplatin und/oder Irinotecan³ erweitert werden kann (Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2017; Aschele C et al., 2009). Die zytostatische Wirkung von 5-FU lässt sich durch Kombination mit Folsäure (Leucovorin) verstärken bzw. durch Verwendung von Capecitabin gezielter auf die Krebszelle begrenzen. Capecitabin, das für den Patienten verträglicher ist, wird erst unter dem Einfluss der Thymidinphosphorylase, ein Enzym, das in

¹ Rauchen, Übergewicht, mangelnde Bewegung.

² 5-FU ist ein häufig verwendetes Chemotherapeutikum zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms (Brenner H et al., 2014). Es wurde vom amerikanischen Chemiker Charles Heidelberger synthetisiert und ist seit 1962 auf dem Markt (Duschinsky R et al., 1957; Heidelberger C et al., 1957; Currier AR et al., 1958).

³ Irinotecan ist ein Zytostatikum, das als Topoisomerase-Hemmer die Zellteilung bremst und Apoptose auslöst.

besonders hoher Konzentration im Tumorgewebe vorkommt, in das wirksame 5-FU umgewandelt (*Schüller J et al., 2000; Carrillo E et al., 2015*).

Die sogenannte gezielte Krebstherapie (engl. »targeted therapy«), auch als personalisierte Therapie bezeichnet, wird seit einiger Zeit als eine neue Form der Therapie in der Klinik eingesetzt, um eine auf die maligne Erkrankung stärker abgestimmte und damit wirksamere Behandlung durchzuführen (*Pohl M, Schmiegel W, 2016*). Die hierfür eingesetzten Medikamente nutzen bestimmte molekulare Eigenschaften der Krebszellen, die nicht-transformierte Körperzellen nicht oder kaum aufweisen (*Grady WM et al., 2014*). So werden Rezeptoren an der Zelloberfläche der Krebszelle mit monoklonalen Antikörpern blockiert, um die Wirkung von Wachstumsfaktoren zu hemmen. Hierzu gehören zum Beispiel Cetuximab und Panitumumab, die an VEGF und am VEGF-Rezeptor⁴ binden und das Tumorwachstum hemmen, oder Bevacizumab und Ramucirumab, die am VEGF⁵-Rezeptor binden und die Tumorangiogenese blockieren (*Willett CG et al., 2004; Douillard JY et al., 2014; Li XX et al., 2015; Verdaguer H et al., 2016*).

1.2 Nebenwirkungen von Chemotherapeutika und supportive Maßnahmen

Ein wesentlicher Nachteil von Chemotherapeutika ist ihr nicht auf maligne Zellen begrenzter antiproliferativer Effekt. Da auch nicht-transformierte Körperzellen geschädigt werden, bedeutet dies für den Patienten eine Vielzahl an Nebenwirkungen, die sowohl akut als auch chronisch auftreten können.

Die durch Chemotherapeutika ausgelösten Nebenwirkungen lassen sich in akute und chronische einteilen. Das Spektrum der akuten Nebenwirkungen reicht von Schwindel, Haarausfall, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Bauchkrämpfen, schweren Schleimhautentzündungen, Ulzerationen und Blutungen im Magen-Darm-Bereich bis hin zur Knochenmarkdepression mit Anämie, Thrombozytopenie, Leukozytopenie und Agranulozytose (*Thrall MM et al., 2000; Newman NB*

⁴ EGF: epidermal growth factor.

⁵ VEGF: vascular epidermal growth factor.

et al., 2016)⁶. Bei der Behandlung mit 5-FU können zudem schmerzhaftes Rötungen und Schwellungen an Handflächen und Fußsohlen, die palmar-plantare Erythrodyssästhesie, auftreten. Eine der durch Chemotherapeutika verursachten schwerwiegendsten chronischen Nebenwirkungen ist die Polyneuropathie in Händen und Füßen (*Werbrouck BF et al., 2008*). Zusätzlich kann es zur zentralen Neurotoxizität kommen in der Regel in Form eines akuten Kleinhirnsyndroms und einer generellen motorischen Schwäche (*Stein ME et al., 1998*). Auch Kardiotoxizität, Erschöpfungssyndrom (Fatigue), Unfruchtbarkeit und Zweitmalignome, auch lange Zeit nach einer Chemotherapie, können auftreten (*Zahner J, 2000; Van Kuilenburg AB, 2004; Marhhom E, Cohen I, 2007; Morton LM et al., 2014*).

Akute und chronische Nebenwirkungen schränken die Lebensqualität der Patienten erheblich ein und führen häufig zu einer Dosislimitierung oder sogar zum Therapieabbruch (*Khanna R et al., 2014*). Da sämtliche Chemotherapien zu bleibenden Schäden führen können, sind supportive Maßnahmen notwendig, um die schädlichen Auswirkungen der Chemotherapeutika für den Patienten zu begrenzen und zu mildern. So können durch Chemotherapie ausgelöste Übelkeit und Erbrechen durch Gabe von antiemetischen Medikamenten wie zum Beispiel 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten, NK₁-Rezeptor-Antagonisten und Dexamethason abgemildert werden (*Lau TK et al., 2016*). Ein weiterer sehr erfolgreicher Ansatz zur Verminderung von schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Erythrodyssästhesien und Polyneuropathien stellt die regionale Kühlung von Kopfhaut, Händen und Füßen dar während der Verabreichung der Chemotherapeutika (*Mangili G et al., 2008; van den Hurk CJ et al., 2012*). Auch auf medikamentöser Ebene gibt es Möglichkeiten, die Nebenwirkungen von Zytostatika zu begrenzen. So wird nach hochdosierter Methotrexat-Anwendung Folsäure (Leucovorin)⁷ zwingend verabreicht, um schwere Komplikationen wie Knochenmarkdepression und Mukositis zu verhindern.

⁶ Zusätzlich: www.fachinfo.de; Rote Liste.

⁷ In Kombination mit 5-FU verstärkt Leucovorin die Wirkung von 5-FU. Leucovorin hemmt die Thymidylat-Synthase und damit die Thymidin-Biosynthese.

1.3 Fasten zur Vermeidung von Chemotherapie-Nebenwirkungen

Bereits ein kurzzeitiges Fasten von 72 Stunden lässt die Blutglukose von 3,8-5,5 mmol/l⁸ (Nüchternwert) auf 2,8-3,3 mmol/l⁹ abfallen. Zusätzlich sinkt auch der Spiegel an Wachstumsfaktoren wie von IGF-1¹⁰ (Unger RH et al., 1963; Isley WL et al., 1983; Thissen JP et al., 1994; Møller N, Jørgensen JO, 2009). IGF-1, ein so genanntes Peptidhormon, das in seiner Struktur dem Insulin ähnelt, spielt als Wachstumsfaktor eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation durch seine Funktion als Aktivator mitogener intrazellulärer Signalwege¹¹. Zusätzlich zu seinen antiapoptotischen Eigenschaften wirkt IGF-1, das nach Aufnahme von Nährstoffen vom Körper ausgeschüttet wird, wie Insulin stark anabol.

Die nicht-transformierte Zelle passt sich einem mangelnden Angebot an Nährstoffen und Wachstumsfaktoren durch Einschränkung zahlreicher Zellfunktionen an; gut sichtbar an der Zellproliferation (Longo VD, Mattson MP, 2014). Die in den Zellen vorhandenen Energiereserven werden dann ausschließlich zum Erhalt der lebensnotwendigen strukturellen Integrität eingesetzt. Mit einer verringerten Zellproliferation nimmt der antiproliferative Effekt von Zytostatika deutlich ab (Shanley DP et al., 2000; Bishop NA, Guarente L, 2007; Fontana L et al., 2010). Dagegen werden Krebszellen durch eine Mangelsituation nicht in ihren Zellfunktionen eingeschränkt und sprechen weiter auf Zytostatika an. Dieses unterschiedliche Ansprechen von normalen und malignen Zellen auf Zytostatika (Chemotherapeutika) in einer Mangelsituation wird in der Literatur als »*differential stress resistance*« (DSR) bezeichnet (Lee C et al., 2012). Ein wesentlicher Faktor für DSR stellt nicht nur der Mangel an Nährstoffen dar, sondern ein mit der Mangelsituation einhergehender Verlust an Wachstumsfaktoren und mitogener Stimuli, der zur Deregulierung wachstumsfördernder Signalwege in den Zellen führt (Blagosklonny MV, Darzynkiewicz Z, 2002; Murakami S, 2006; Madia F et al., 2008; Longo VD, Mattson MP, 2014). Während die nicht-transformierte Zelle auf eine Mangelsituation mit einem Zellzyklusarrest reagiert, behält die

⁸ 70-99 mg/dl; nach: <https://www.diabetesdaily.com> [abgerufen am: 06.07.2018].

⁹ 50-60 mg/dl; nach: Ciampolini M, Bianchi R. Training to estimate blood glucose and to form associations with initial hunger. *Nutr Metab (Lond)*. 2006; 3: 42.

¹⁰ IGF-1: Insulin-like growth factor 1.

¹¹ wie zum Beispiel Akt und Ras.

Krebszelle, die in aller Regel nicht auf exogene Wachstumsfaktoren angewiesen ist, ihren pro-proliferativen Phänotyp bei (*Bhowmick NA et al., 2004; Cheng N et al., 2008; Nickerson NK, 2013*).

Insbesondere das bereits angesprochene IGF-1 scheint für DSR eine entscheidende Rolle zu spielen (*Lee C et al., 2012*). So führt ein systemischer Abfall des IGF-1-Spiegels bei Tumorzellen im Ggs. zu normalen Zellen nicht zu einer Abnahme des chemotherapeutischen Effektes. Von klinischer Relevanz ist zweifelsohne, dass auch bei Nahrungsrestriktion Chemotherapeutika ihre zytostatische Wirkung gegenüber Krebszellen beibehalten. So reagierten in Mäuse injizierte Karzinomzellen auch dann auf das Chemotherapeutikum Etoposid, wenn die Tiere zuvor für 72 Stunden bei einem verringerten Nahrungsangebot gehalten wurden (*Raffaghello L et al., 2008*). Darüber hinaus ist an der Untersuchung interessant, dass diese Mäuse die Behandlung mit Etoposid deutlich länger überlebten als Mäuse, die *ad libitum* ernährt wurden.

Bereits in klinischen Studien mit Bluthochdruck-Patienten konnte für das Kurzzeitfasten von mindestens vier Tagen neben einer guten Verträglichkeit eine deutliche Verbesserung der Hypertension gezeigt werden (*Goldhamer A et al., 2001*). Für die onkologische Situation führten Raffaghello et al. eine klinische Studie mit 10 Krebspatienten durch, die an unterschiedlichen Karzinomen¹² erkrankt waren (*Raffaghello L et al., 2010*). Diese nahmen zwischen 48 und 140 Stunden vor und 5 bis 56 Stunden nach Chemotherapeutika-Gabe ausschließlich Flüssigkeit in Form von Wasser, Tee oder Kaffee zu sich. Abgesehen von einem (nachvollziehbaren) Hungergefühl und Benommenheit berichteten die Probanden über keine schwerwiegenden körperlichen Probleme durch das Fasten. Dafür nahmen einige Nebenwirkungen¹³ der Chemotherapie wie Müdigkeit, gastrointestinale Nebenwirkungen und Schwäche deutlich ab, und andere Nebenwirkungen wie Schwindel, Erbrechen, Diarrhoe, Bauchkrämpfe und Schleimhautentzündungen traten nicht in Erscheinung. Dagegen zeigte sich bei

¹² Brustkrebs in Stadium II, Oesophaguskarzinom in Stadium IV, Lungen- und Prostatakrebs.

¹³ Die Nebenwirkungen wurden nach der »Common Terminology Criteria for Adverse Events of the National Cancer Institute« klassifiziert.

nicht-fastenden Patienten zumindest eines der genannten Symptome. Erstaunlich ist, dass sich die meisten dieser Nebenwirkungen deutlich abschwächten, wenn die Patienten sich beim nächsten Chemotherapie-Zyklus für das Kurzzeitfasten entschieden hatten. Diese Beobachtung ist interessant, da die Toxizität der Chemotherapeutika normalerweise mit jedem Behandlungszyklus kumuliert (Kapitel 1.2).

Erwähnenswert ist ein weiteres Ergebnis der Raffaghello-Studie, wonach der durch Kurzzeitfasten ausgelöste Gewichtsverlust rascher kompensiert wird als der durch Chemotherapie ausgelöste Gewichtsverlust¹⁴ bei normaler Ernährung. Auch stieg mit Kurzzeitfasten die Anzahl an Erythrozyten nach einer Chemotherapie schneller wieder an, während Lymphozyten und Thrombozyten weniger stark abfielen als bei nicht-fastenden Patienten. Alles in allem zeigen die Daten der Raffaghello-Studie, dass Fasten die Nebenwirkungen der Chemotherapie reduzieren kann.¹⁵

1.4 Bedingungen malignen Wachstums *in vivo*

Für malignes Wachstum *in vivo* stellen die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen wichtige lokale Parameter dar. Da in der vorliegenden Arbeit tumorphysiologische Sauerstoffkonzentrationen ein Untersuchungsparameter darstellen, soll ein kurzer Überblick über die Bedingungen malignen Wachstums *in vivo* gegeben werden.

Die atmosphärische Konzentration an Sauerstoff liegt bei 21 % (Bertout JA et al., 2008). Je nach Gewebe herrscht eine physiologische Sauerstoffkonzentration von 1 % bis 11 % vor (Carreau A et al., 2011), im intestinalen Gewebe von $7,6 \pm 0,3$ % (Thermann M et al., 1985; Müller M et al. 2002). Dagegen sind bis zu 60 % der soliden Tumoren mit Sauerstoff unterversorgt (Evans SM et al., 2001; Vaupel

¹⁴ Hierbei handelt es sich um eine Reaktion des Körpers auf die Wirkung der Chemotherapie verursacht durch Übelkeit, Erbrechen und Appetitlosigkeit, sowie angegriffene Schleimhäute und dadurch schlechtere Resorption von Nährstoffen im Dünndarm.

¹⁵ Eine randomisierte kontrollierte Studie zeigte ebenfalls eine bessere Verträglichkeit der Chemotherapie unter Kurzzeitfasten von 60 Stunden bei Mamma- und Ovarialkarzinompatientinnen (Bauersfeld SP et al., 2018).

P, Mayer A, 2007), was als Tumorphypoxie bezeichnet wird (Brown JM, Giaccia AJ, 1998). Eine Ursache für Hypoxie ist in dem starken Wachstum von Tumoren zu sehen, wodurch die Versorgung mit Blutgefäßen nicht mehr nachkommt (Abbildung 1.1.) bzw. die Durchgängigkeit der Gefäße durch einen erhöhten interstitiellen Druck im Tumorgewebe begrenzt wird (Vaupel P et al., 1989);

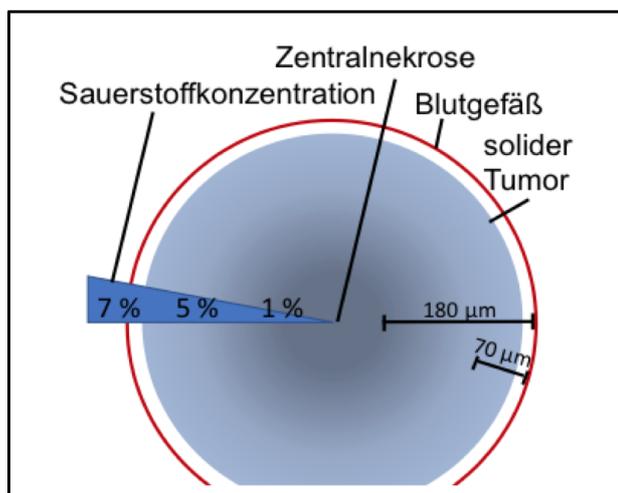


Abbildung 1.1: Die Sauerstoffversorgung in soliden Tumoren. Tumorzellen befinden sich ab einem Abstand von 70 µm zu einem Blutgefäß bereits in Hypoxie. Ab einem Abstand von 180 µm kommt zur Hypoxie noch ein Mangel an Glukose hinzu, was in diesem Bereich, der als Zentralnekrose bekannt ist, zum Absterben der Tumorzellen führt. Die im Tumorgewebe neugebildeten Gefäße weisen häufig zusätzlich strukturelle und funktionelle Anomalitäten auf (Vaupel P, Mayer A, 2007). Stark vereinfachte Darstellung der Sauerstoffversorgung in soliden Tumoren. Eigene Entwurf basierend auf Literaturdaten.

Mit abnehmender Sauerstoffkonzentration und in Hypoxie geraten Tumorzellen (aber auch normale Zellen) immer stärker in die Abhängigkeit von der Versorgung mit Glukose, dem einzigen Energieträger, mit dem eukaryotische Zellen auch ohne Sauerstoff Energie gewinnen können (Krebs HA, 1972; Racker E, 1974). Mit abnehmender Sauerstoffkonzentration und in Hypoxie¹⁶ wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 α ¹⁷ stabilisiert, was unter anderem zur Hochregulierung einiger glykolytischer Enzyme¹⁸ sowie von Glukosetransportern (wie GLUT1 und GLUT3) führt (Semenza GL, 2002; Kumar H, Choi DK, 2015). Diese Anpassung erlaubt Tumorzellen, mehr Glukose aufzunehmen und zu verstoffwechseln als normale Zellen, was als hyperaktive Glykolyse bezeichnet wird

¹⁶ Für Hypoxie kann keine eindeutige Konzentration an Sauerstoff definiert werden; dies ist sicherlich auch abhängig vom Zelltyp. Ab 1 % Sauerstoff kann aber sehr wahrscheinlich von Hypoxie gesprochen werden, da auch dann die oxidative Phosphorylierung an der Atmungskette der Mitochondrien nicht mehr möglich sein wird (Carreau A et al., 2011).

¹⁷ Hypoxie-induzierter Faktor-1 α .

¹⁸ Diese sind Aldolase A und C, Enolase 1, Hexokinase 1 und 3, Laktatdehydrogenase A, Phosphofruktokinase L und Phosphoglyceratkinase 1.

(Mathupala SP et al., 2006; Calvo MB et al. 2010; Mayer A, Vaupel P, 2013; Barron CC et al., 2016). In dieser Situation ist Glukose nicht nur der wichtigste Energieträger für maligne Zellen, sie ist ebenfalls ein wichtiger Lieferant von Intermediärsubstanzen für den anabolen Stoffwechsel und damit für ihre Proliferation (Gatenby RA, Gillies RJ, 2004; DeBerardinis RJ et al., 2008).

1.5 Ziele

Ein Ziel der Arbeit war zu untersuchen, ob eine Restriktion von Glukose und Wachstumsfaktoren den antiproliferativen Effekt des Chemotherapeutikums 5-FU im Sinne einer »*differential stress resistance*« oder DSR (Kapitel 1.3) beeinflusst. Hierzu wurden fünf humane kolorektale Karzinomzelllinien und humane dermale Fibroblasten als Kontrollzellen ausgewählt (Kapitel 3.1). Die Kultivierung von Tumorzellen *in vitro* wird in aller Regel bei 21 % Sauerstoff durchgeführt und nicht bei in soliden Tumoren vorherrschenden Sauerstoffkonzentrationen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war somit, für die Untersuchungen auch tumorphysiologische Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 %¹⁹ zu berücksichtigen, die ebenfalls beim kolorektalen Karzinom nachzuweisen sind (Vaupel P, Mayer A, 2007; Bertout JA et al., 2008; Solaini G et al., 2010). Zusätzlich wurden die Zellen auch bei 21 % Sauerstoff kultiviert, um die Möglichkeit zu wahren, Ergebnisse dieser Arbeit mit bereits publizierten Daten vergleichen zu können.

Als optimale Bedingung für die Proliferation von Tumorzellen *in vitro* wurden 11 mmol/l Glukose und 10 % fetales Kälberserum (FCS)²⁰ als Quelle für Wachstumsfaktoren gewählt. Beim Fasten sinkt nicht nur der Anteil an Glukose, sondern auch der an Wachstumsfaktoren im Blut ab (Raffaghello L et al., 2008). Um für die Untersuchungen *in vitro* Fastenzeiten von 72 Stunden simulieren zu können, wurden auf Basis von Literaturdaten die Konzentrationen an Glukose auf 3 mmol/l und an FCS auf 1 % verringert (Unger RH et al., 1963; Raffaghello L et al., 2008 & 2010).

¹⁹ Ab einer Sauerstoffkonzentration von 1 % kann sicherlich von Hypoxie gesprochen werden (siehe auch Anmerkung 16).

²⁰ FCS enthält eine Vielzahl an biologisch wirksamen Substanzen wie Aminosäuren, Proteine, Vitamine, Hormone, Wachstumsfaktoren u. s. w. Zudem trägt FCS zur pH-Pufferung des Kulturmediums bei (Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media. *Reprod Med Biol.* 2017; 16(2):99-117. doi: 10.1002/rmb2.12024).

2 Fragen

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Glukoserestriktion kombiniert mit einem begrenzten Angebot an Wachstumsfaktoren, hierzu wurde die Konzentration an FCS auf 1 % verringert (Lee C et al., 2012), den antiproliferativen Effekt von 5-FU auf nicht-malignen Kontrollzellen (Fibroblasten) *in vitro* verringern kann, im Vergleich zu fünf verschiedenen humanen kolorektalen Karzinomzelllinien. Folgende Fragen sollten hierzu beantwortet werden:

- 1. Wie reagieren kolorektale Karzinomzellen und Kontrollzellen auf verschiedene Konzentrationen an Glukose und Wachstumsfaktoren bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 %?**
- 2. Wie wird der antiproliferative Effekt von 5-FU bei 21 % und 1 % Sauerstoff durch eine Restriktion von Glukose und Wachstumsfaktoren beeinflusst?**
- 3. Welche Bedeutung kommt der tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentration von 5 % bei einer Restriktion von Glukose und Wachstumsfaktoren für den antiproliferativen Effekt von 5-FU zu?**

3 Material und Methoden

3.1 Zelllinien

Die in Tabelle 3.1 aufgeführten Tumorzelllinien wachsen adhärent und waren frei von Mykoplasmen. Zusätzlich wurden auch Fibroblasten als Kontrollzellen („Normal Human Dermal Fibroblasts“ oder NHDF-p) der Firma PromoCell® GmbH verwendet.

Tabelle 3.1: Die in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen Karzinomzelllinien und Kontrollzellen. Alle Zelllinien sind humanen Ursprungs. ¹NHDF-p: Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) juvenile foreskin (NHDF-p). ²Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (www.dsmz.de). ³Universität Würzburg, Hubland.

Zelllinie	Gewebe	Bezugsquelle
Colo741	Kolon	SIGMA, Kat.-Nr.: 93052621
HCT116	Kolon	DSMZ ² , Kat.-Nr.: ACC 581
HT29	Kolon	DSMZ, Kat.-Nr.: ACC 299
LS174T	Kolon	Prof. Dr. Martin Eilers ³
SW620	Kolon	SIGMA, Kat.-Nr.: 87051203
NHDF-p ¹	Haut	PromoCell, Kat.-Nr.: C-12302

3.2 Zellkultur und Zellernte

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit 10 ml des entsprechenden Mediums in einem CO₂-Inkubator (NU-5500 DH Duraflow CO₂, NuAire Inc., Plymouth, U.S.A.) mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei 37°C kultiviert. Unter sterilen Bedingungen wurde alle drei bis vier Tage das Medium gewechselt. Zur Passage wurden die etwa 60-80 % konfluent gewachsenen Zellen alle drei bis vier Tage mit 5 ml 0,05 % Trypsin in HBSS (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, Kat.-Nr.: SH30236.01) für ca. 5-8 Minuten inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 50 ml PBS (»phosphate buffered saline«; Gibco, ThermoFisher Scientific, Kat.-Nr.: 70013-016) aufgenommen und für 6 Minuten bei 397 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in PBS resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) bestimmt; hierzu wurden die Zellen mit Trypanblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gefärbt (0,04 % Endkonzentration).

3.3 Kulturmedien und Pufferlösung

Zur Kultivierung der kolorektalen Zelllinien wurden folgende Medien verwendet: **RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 in „Dutch Modifikation“** für die Kultivierung von Colo741 und LS174T (Gibco). **McCoy's 5A (Modified) Medium** für die Kultivierung von HCT116 und HT29 (Gibco). **Leibovitz's L-15 Medium** für die Kultivierung von SW620 (Gibco). Die Medien wurden um folgende Zusätze (in Klammern die jeweilige Endkonzentration) ergänzt: Penicillin G (100U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), β-Mercaptoethanol (50 µmol/l), Natriumpyruvat (1 mmol/l), nicht essenzielle Aminosäuren (1 %), Glutamin (2 mmol/l), Glukose (11 mmol/l) sowie 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (alle Zusätze von ThermoFisher Scientific, Invitrogen).

Für die Kultivierung von humanen Fibroblasten (NHDF; PromoCell, Heidelberg) wurde das »**Fibroblast Growth Medium**« mit folgenden Zusätze (in Klammern die jeweilige Endkonzentration) verwendet: fetales Kälberserum (2 %), rekombinanter humaner Fibroblastenwachstumsfaktor (1 ng/ml), insulinähnlicher Wachstumsfaktor (5 µg/ml).

Im glukosefreien RPMI 1640-Medium wurde eine Glukosekonzentration von 3 mmol/l und eine FCS-Konzentration von 1 % eingestellt (**Mangelmedium**). Diese Konzentration an Glukose kann durch Kurzzeitfasten für ca. 48 Stunden auch im peripheren Blut gemessen werden (Kapitel 1.5). Im **Mangelmedium II** wurde der Anteil an Glukose auf 0,03 mmol/l (bei 1 % FCS) reduziert. Die Konzentrationen der anderen Zusätze blieben unverändert.

PBS („Phosphate buffered saline“). PBS als 10-fach Konzentrat (ThermoFisher Scientific, Gibco, Katalog Nr.: 70011-016) wurde mit sterilem Wasser verdünnt: 115,2 mmol/l Natriumchlorid, 1,54 mmol/l KH_2PO_4 und 2,71 mmol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH-Wert 7,2 (Angaben der Firma).

3.4 Kristallviolett-Assay

Beim Kristallviolett-Assay handelt es sich um einen kolorimetrischen Test zum quantitativen Nachweis vitaler Zellen, wobei sich der Anteil an gebundenem Farbstoff (Kristallviolett bindet an die DNA der Zellen) proportional zur Zellzahl verhält. Hierzu wurden die Zellen mit 100 µl Methanol pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen (Greiner Bio-One, Kat.-Nr.: 655180) fixiert. Nach 10 Minuten wurde der Überstand entfernt und 100 µl Kristallviolett-Lösung (0,25 % (w/v) in PBS mit 25 % (v/v) Methanol; Sigma-Aldrich, Kat.-Nr.: C32675-25g) pro Vertiefung für 10 Minuten hinzugegeben. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch viermaliges Spülen der Zellkulturschale mit destilliertem Wasser aus den Vertiefungen ausgewaschen und die Zellkulturschale anschließend 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet. Mit 200 µl 10 % Essigsäure (Sigma-Aldrich) pro Vertiefung wurde der gebundene Farbstoff in Lösung gebracht (30 Minuten auf einem Wippschüttler). Die optische Dichte wurde mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt.

3.5 Zellproliferation

Jeweils 1×10^4 Zellen wurden pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen (Greiner Bio-One) in 200 µl Standardmedium ausgesät und über Nacht im CO₂-Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und durch 200 µl frisches Standardmedium, Mangelmedium oder Mangelmedium II (Kapitel 3.3) ersetzt. Die Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden im CO₂-Inkubator oder in einer Hypoxie-Kammer (Coy Laboratory Products über Toepffer Laborsysteme, Göppingen, Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg) inkubiert. Die Versuche in der Hypoxie-Kammer wurden bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % durchgeführt. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt.

3.5.1 Berechnung der Verdopplungszeiten

Die Verdopplungszeiten wurden mit folgender Formel berechnet:

$$v = \frac{\log 2 * \Delta t}{\log N - \log N_0}$$

v = Verdopplungszeit, Δt = Zeitspanne der Zellen in Kultur, N = Zellzahl zum Ablesezeitpunkt, N_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt 0).

3.6 Der antiproliferative Effekt von 5-FU

Jeweils 1×10^4 Zellen wurden pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen (Greiner Bio-One) in 100 μ l Standardmedium ausgesät und über Nacht im CO₂-Inkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Endkonzentrationen von 10^{-9} mol/l bis 10^{-1} mol/l 5-FU für 24, 48 und 72 Stunden kultiviert. Es wurden bis zu vier unabhängige Versuche (»biologische« Replikate) mit bis zu sechs Parallelwerten (»technische« Replikate) durchgeführt. Kontrollzellen wurden nicht mit 5-FU inkubiert.

3.7 Glukoseverbrauch und Laktatbildung

Glukose und Laktat wurden in Zellkulturüberständen durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg photometrisch bestimmt. Hieraus wurde die Menge an verbrauchter Glukose und gebildetem Laktat berechnet.

3.8 Halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀)

Der IC₅₀ gibt die Konzentration an, bei der 50 % der maximalen Wirkstärke erreicht wird. Der IC₅₀ mit dem dazugehörigen 95 % Konfidenzintervall wurde mit einer nicht linearen Regression (»log (inhibitor) vs. normalized response«) berechnet (GraphPad Prism 6.0).

3.9 Datenauswertung

Die Daten (Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen) wurden mit Excel 2007 (Microsoft) ausgewertet. Für die statistischen Tests zur Signifikanzberechnung wurde das Programm GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) genutzt. Die Daten wurden auf Normalverteilung überprüft. Lag diese vor, wurden Vergleiche zwischen zwei Gruppen mit dem zweiseitigen t-Test und Vergleiche zwischen mehreren Gruppen mit ANOVA und einer post-hoc-Analyse nach Bonferroni durchgeführt. Wiesen die Datensätze keine Normalverteilung auf, wurden der Mann-Whitney-U-Test bzw. der Kruskal-Wallis-Test mit einer post-hoc-Analyse nach Dunn durchgeführt. In allen Fällen wurde ein Fehler 1. Art von 0,05 angenommen. Die grafische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 6.0 und 7.0.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob ein Mangel an Glukose und Wachstumsfaktoren den antiproliferativen Effekt von 5-FU bei kolorektalen Karzinomzellen und nicht transformierten Zellen verändert. Zusätzlich zu den für *In-vitro*-Kulturen üblichen 21 % Sauerstoff wurden Untersuchungen auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff durchgeführt (Kapitel 1.4).

4.1 Charakterisierung der Zelllinien

4.1.1 Zellproliferation

Die Zellproliferation wurde im Standardmedium (11 mmol/l Glukose, 10 % FCS) bei Sauerstoffkonzentrationen von 21 %, 5 % und 1 % untersucht (Abbildung 4.1). Bei 21 % Sauerstoff zeigten die Zellen der fünf kolorektalen Karzinomzelllinien (Kapitel 3.1) eine Zunahme der Zellzahl auf über 500 % (HT29) bzw. knapp 800 % (Colo741) innerhalb von 72 Stunden, während bei Fibroblasten die Zunahme der Zellzahl auf 200 % deutlich geringer ausfiel. Bei 5 % Sauerstoff war die Zunahme der Zellzahl bei allen Karzinomzelllinien zwar signifikant geringer als bei 21 % Sauerstoff, doch lag diese immer noch zwischen 250 % (Colo741) und 330 % (HCT116). Bei Fibroblasten war die Zunahme der Zellzahl erheblich geringer (auf max. 150 %). Bei 1 % Sauerstoff verringerte sich bei allen Zelllinien die Anzahl vitaler Zellen entweder weiter oder blieb nahezu auf dem Niveau der Zellzahlen bei 5 % Sauerstoff.

Die kolorektalen Karzinomzellen zeigten ihren proliferativen Phänotyp auch bei tumorphysiologischen Konzentrationen von 5 % und 1 % Sauerstoff. Ein wichtiger Faktor hierfür stellt sicherlich die optimale Versorgung der Zellen mit Glukose dar. Fibroblasten dagegen schienen auch bei optimaler Versorgung (»Fibroblast Growth Medium«, Kapitel 3.3) mit einer verringerten Zellproliferation auf abnehmende Konzentrationen an Sauerstoff zu reagieren. Während bei 5 % Sauerstoff der Anstieg an Fibroblasten den Faktor 1,5 im Vergleich zur Aussaat nicht überstieg und damit moderat blieb, nahm bei kolorektalen Zellen die Zellzahl mit einem Faktor von 4 zu (Abbildung 4.1).

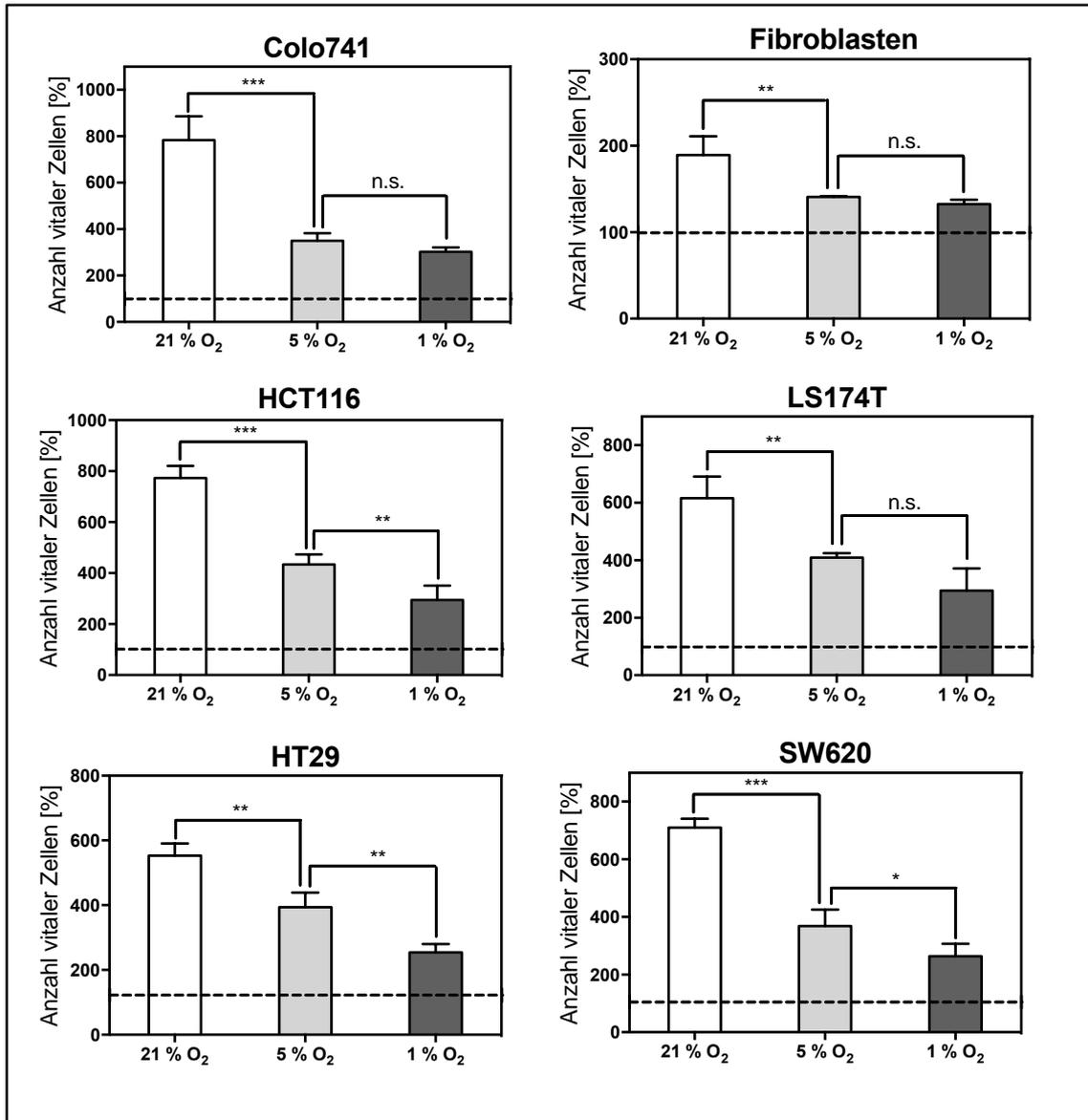


Abbildung 4.1: Bestimmung der Zellproliferation im Standardmedium bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff (O₂). Kolorektale Karzinomzellen und Fibroblasten wurden für 72 Stunden inkubiert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und als Mittelwert ± Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Aussaat (=100%, angedeutet durch die gestrichelte Linie) angegeben. Die Daten basieren auf bis zu vier unabhängigen Versuchen mit sechs Parallelwerten pro Zelllinie und Bedingung. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.1.2 Zellteilungsraten

Bei 21 % Sauerstoff wiesen die kolorektalen Karzinomzellen Verdopplungszeiten zwischen 24,3 Stunden (Colo741) und 28,6 Stunden (HT29) im Standardmedium (11 mmol/l Glukose, 10 % FCS) auf. Bei 5 % Sauerstoff verlängerten sich die Verdopplungszeiten für LS174T, HCT116 und HT29 auf bis zu 36,5 Stunden und für Colo741 und SW620 auf bis zu 39,7 Stunden. Bei 1 % Sauerstoff verlängerten

sich die Verdopplungszeiten bei allen Karzinomzellen nochmals deutlich auf bis zu 59 Stunden (Tabelle 4.1). Die Verdopplungszeiten von kolorektalen Karzinomzellen bei 5 % deuten, wie bereits die Zellproliferation (Abbildung 4.1), darauf hin, dass bei dieser tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentration eine Zellproliferation im Standardmedium möglich ist. Eine Zellproliferation ist ebenso bei 1 % Sauerstoff nachzuweisen, wird aber im Mangelmedium und bei verringerter Sauerstoffkonzentration stark eingeschränkt (Abbildung 4.4). Die Verdopplungszeiten für Fibroblasten betragen bei 21 % Sauerstoff 74,3 Stunden, bei 5 % Sauerstoff 147 Stunden und bei 1 % Sauerstoff 181 Stunden. Die Fibroblasten wuchsen im Vergleich zu den kolorektalen Karzinomzelllinien signifikant langsamer ($p < 0,01$).

Tabelle 4.1: Die Zellteilungsrate im Standardmedium in Abhängigkeit von der Sauerstoffversorgung. Die Verdopplungszeiten in Stunden (Mittelwert \pm Standardabweichung) wurden berechnet wie beschrieben (Kapitel 3.5.1). Hierzu wurden die Zellen für 72 Stunden inkubiert und die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay (Kapitel 3.4) bestimmt. Die Werte basieren auf mindestens drei unabhängigen Versuchen mit jeweils sechs Parallelwerten pro Zelllinie.

Zelllinie	21 % O ₂	5 % O ₂	1 % O ₂
Colo741	24,3 \pm 1,7	39,7 \pm 3,0	45,0 \pm 2,6
HCT116	24,4 \pm 0,8	33,3 \pm 2,0	52,6 \pm 13,2
HT29	28,6 \pm 0,2	36,5 \pm 3,6	58,8 \pm 5,6
LS174T	27,6 \pm 2,3	35,4 \pm 1,2	46,7 \pm 12,6
SW620	25,4 \pm 0,5	38,1 \pm 4,8	51,6 \pm 10,0
Fibroblasten	74,3 \pm 8,9	147,3 \pm 6,0	181,2 \pm 30,2

4.1.3 Glukoseverbrauch und Laktatbildung

Zusätzlich zur Zellproliferation wurde der zelluläre Verbrauch an Glukose bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ermittelt, um die Stoffwechselaktivität der Zellen zu beurteilen. Hierzu gehörte auch die Bestimmung der Laktatproduktion. Zehntausend Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen (Greiner Bio-One) wurden 18 Stunden nach Aussaat mit Standardmedium oder Mangelmedium für 72 Stunden bei 5 % bzw. 1 % Sauerstoff kultiviert. Anschließend wurde im Überstand die Menge an unverbrauchter Glukose und entstandenem Laktat bestimmt (Tabelle 4.2) und der Verbrauch an Glukose

bzw. die Produktion an Laktat pro Zelle berechnet. Hierzu wurde die Anzahl vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Die kolorektalen Karzinomzellen verbrauchten sowohl im Standard- als auch Mangelmedium mehr Glukose bei 1 % als bei 5 % Sauerstoff und zwar um bis zu 700 % für z. B. HT29 im Standardmedium (Tabelle 4.2). Die Werte für den Glukoseverbrauch und die Laktatbildung bei 21 % Sauerstoff sind im Appendix zu finden (Tabelle 10.1 und 10.2).

Tabelle 4.2: Glukoseverbrauch und Laktatbildung durch Karzinomzellen im Standard (SM)- und Mangel (MM)-Medium bei 5 % und 1 % Sauerstoff. Die Daten sind in $\mu\text{mol/l}$ pro Zelle angegeben für einen Versuch mit zwei technischen Replikaten pro Zelllinie und Bedingung. Die Messwerte wurden auf die Anzahl vitaler Zellen bei Versuchsende nach 72 Stunden mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Siehe auch Tabelle 10.1 und 10.2.

Zelllinie		Glukoseverbrauch		Laktatbildung	
		5 % O ₂	1 % O ₂	5 % O ₂	1 % O ₂
Colo741	SM	54,4 ± 4,1	139,1 ± 9,40	123,2 ± 4,1	304,6 ± 4,7
	MM	48,3 ± 6,8	127,8 ± 7,9	111,1 ± 13,7	294,4 ± 7,9
HCT116	SM	59,9 ± 3,3	142,9 ± 4,8	124,4 ± 6,5	302,7 ± 4,8
	MM	22,3 ± 5,3	116,0 ± 15,6	66,9 ± 5,3	270,7 ± 7,8
HT29	SM	10,2 ± 3,6	78,7 ± 5,6	35,6 ± 3,6	181,1 ± 11,1
	MM	30,7 ± 6,2	132,9 ± 9,9	78,9 ± 6,2	300,7 ± 9,9
LS174T	SM	51,3 ± 3,5	146,0 ± 4,5	124,7 ± 3,5	290,1 ± 4,8
	MM	34,3 ± 6,1	160,6 ± 10,3	77,3 ± 6,1	372,3 ± 10,3
SW620	SM	37,9 ± 3,8	95,1 ± 5,4	70,5 ± 3,8	228,1 ± 5,4
	MM	30,2 ± 5,3	140,8 ± 10,0	79,2 ± 5,3	338,0 ± 10,0

Das Verhältnis zwischen verbrauchter Glukose und gebildetem Laktat war für die drei Sauerstoffkonzentrationen sowohl im Standard- als auch Mangelmedium nahezu konstant. Der Mittelwert der molaren Verhältnisse von Glukose zu Laktat lag bei 1:2,3; d.h. pro Mol verbrauchter Glukose entstanden 2,3 Mol. Der theoretische Wert liegt bei 1:2. Die Daten aus Tabelle 4.2 scheinen damit zu bestätigen, dass die getesteten kolorektalen Karzinomzellen ihren Energiebedarf weitestgehend mit einer hyperaktiven Glykolyse (Kapitel 1.4) durch Teiloxidation von Glukose mit anschließender Reduktion von Pyruvat zu Laktat decken und dies bei den drei untersuchten Sauerstoffkonzentrationen. Die Daten aus Tabelle 4.2 sind zusätzlich in Abbildung 4.2 grafisch dargestellt.

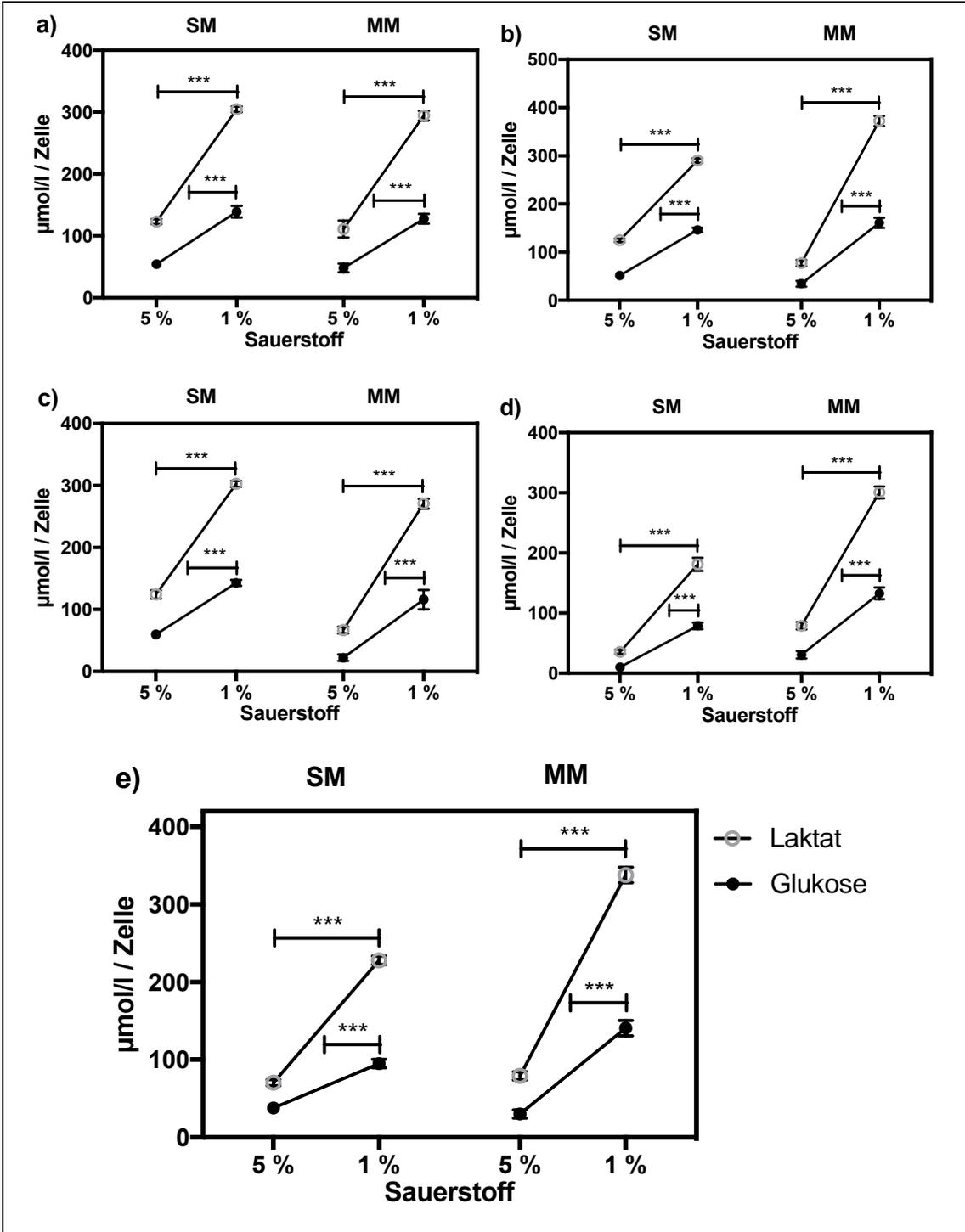


Abbildung 4.2: Glukoseverbrauch und Laktatbildung durch Karzinomzellen im Standard- und Mangelmedium. Die Werte zum Glukoseverbrauch und zur Laktatbildung sind in µmol/l pro Zelle (Tabelle 4.2) für 5 % und 1 % Sauerstoff angegeben. Standardmedium (SM), Mangelmedium (MM). a) Colo741, b) LS174T, c) HCT116, d) HT29, e) SW620. ***p < 0,001. Deutlich zu erkennen die Zunahme beim Verbrauch an Glukose und bei der Bildung von Laktat bei 1 % Sauerstoff im Vergleich zu 5 % Sauerstoff. Die im Text angesprochene Konstanz beim molaren Verhältnis von verbrauchter Glukose und gebildetem Laktat von 1:2,3 (theoretischer Wert von 1:2) deutet auf eine Dominanz der Glykolyse bei beiden Sauerstoffkonzentrationen hin. Nach Literaturdaten können Mitochondrien bei beiden Sauerstoffkonzentrationen noch aktiv sein (Carreau A et al., 2011).

4.2 Antiproliferative Effekte definierter Kulturbedingungen

4.2.1 Glukoserestriktion

Die Auswirkungen der Glukoserestriktion im Mangelmedium (3,0 mmol/l Glukose, 1 % FCS) auf die Zellproliferation waren für die drei untersuchten Sauerstoffkonzentrationen nachweisbar (Abbildung 4.3).

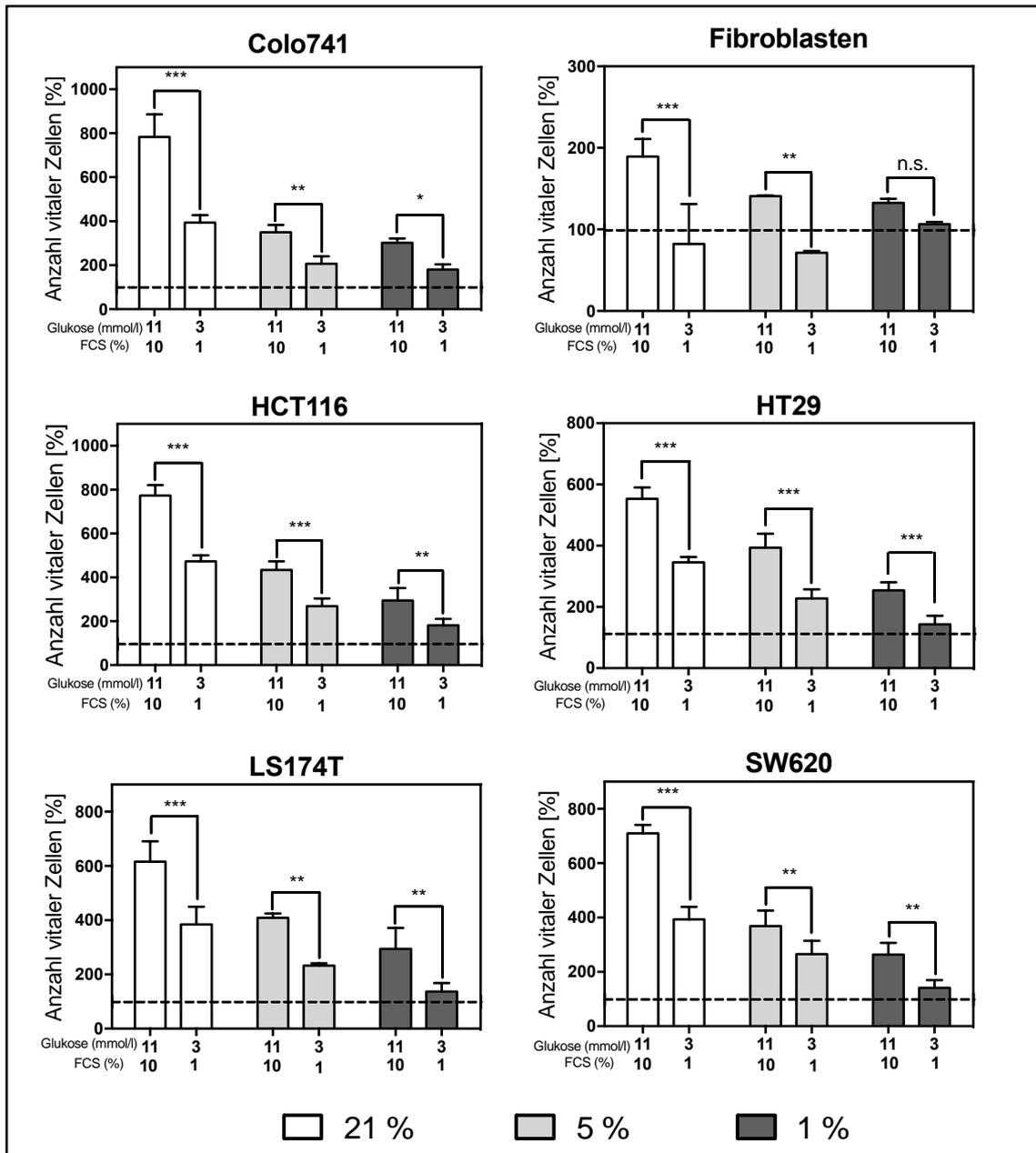


Abbildung 4.3: Bestimmung der Zellproliferation im Standard- und Mangelmedium bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff (O₂). Karzinomzellen wurden für 72 Stunden inkubiert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und als Mittelwert ± Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Aussaat (=100%, angedeutet mit der gestrichelten Linie) angegeben. 11 mmol/l Glukose, 10 % FCS: Standardmedium (SM); 3 mmol/l Glukose, 1 % FCS:

Mangelmedium (MM). Jede Zelllinie wurde jeweils in drei unabhängigen Versuchen für jede Bedingung (Standard- und Mangelmedium, drei Sauerstoffkonzentrationen) untersucht. *p < 0.05; ***p < 0,001; n. s. = nicht signifikant (s. auch Abbildung 10.1-10.4).

Die Anzahl vitaler Zellen im Standardmedium (11 mmol/l Glukose, 10% FCS) und Mangelmedium (3 mmol/l Glukose, 1 % FCS) unterschied sich signifikant bei jeweils einer Sauerstoffkonzentration (Abbildung 4.3), ebenso die Verdopplungszeiten (Tabelle.4.3).

Tabelle 4.3: Die Zellteilungsrate im Mangelmedium in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration. Die Verdopplungszeiten in Stunden (Mittelwert ± Standardabweichung) wurden berechnet wie in Material und Methoden beschrieben. Die Werte basieren auf mindestens vier unabhängig durchgeführten Versuchen mit jeweils sechs Parallelwerten für jede Zelllinie. Die Zellen wurden 72 Stunden inkubiert und die Zellzahl mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt.

Zelllinie	21 % O ₂	5 % O ₂	1 % O ₂
Colo741	36,5 ± 2,1	69,5 ± 25,1	84,9 ± 17,3
HCT116	33,4 ± 4,0	54,3 ± 5,3	84,3 ± 31,5
HT29	40,4 ± 1,9	60,5 ± 14,0	138,1 ± 101,0
LS174T	37,5 ± 4,7	58,1 ± 3,9	152,1 ± 150,1
SW620	36,2 ± 3,3	50,9 ± 11,0	141,3 ± 3,8

4.2.2 Glutamin

In einem Nebenexperiment wurde die Bedeutung von Glutamin²¹ für die Zellproliferation im Mangelmedium II (MM II) bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen untersucht. Der Anteil an Glukose war mit 0,03 mmol/l extrem gering und damit stellte Glutamin in einer Konzentration von 2 mmol/l den wesentlichen Energieträger für den Metabolismus der Zellen dar. Der Einfluss einer fehlenden Versorgung mit Glukose auf die Zellproliferation war bereits bei 21 % Sauerstoff eindeutig nachzuweisen ebenso, dass Glutamin alleine nicht die Zellproliferation verstärken kann (Abbildung 4.4). Dieser Unterschied war auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff zu beobachten. Zudem induzierten die Bedingungen im Mangelmedium II zelltoxische Effekte bei 1 % Sauerstoff (Abbildung 4.4).

²¹ Glutamin, eine nicht-essenzielle Aminosäure, ist für die Speicherung von Stickstoff im Muskel und den Transport von Stickstoff verantwortlich. Es ist die häufigste im Körper vorkommende Aminosäure (Kuhn et al., 1999; Bergstrom et al., 1974), die endogen synthetisiert wird, und durch Fasten nicht wesentlich vermindert werden kann (Abumrad NN et al., 1995).

Die Untersuchungen zu Glutamin als Energieträger haben gezeigt, dass Glutamin alleine nicht ausreicht, um die Zellproliferation aufrechtzuerhalten und erscheint damit für Untersuchungen zum DSR (»differential stress resistance« (Kapitel 1.3) ungeeignet.

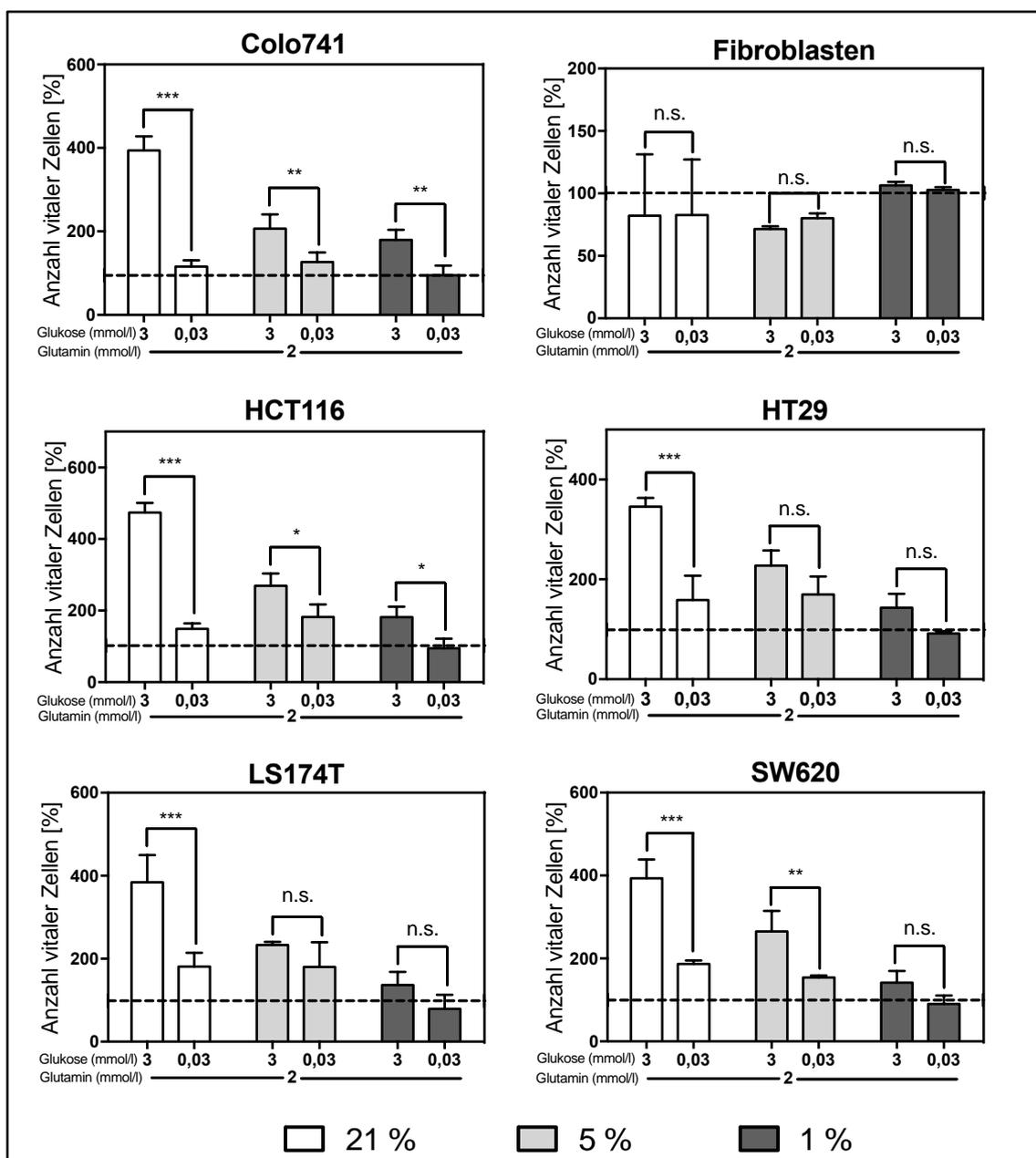


Abbildung 4.4: Bestimmung der Zellproliferation im Mangelmedium und Mangelmedium II bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff (O₂). Kolorektale Karzinomzellen wurden für 72 Stunden inkubiert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und als Mittelwert ± Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Aussaat (1×10^4 Zellen = 100 %, angedeutet durch die gestrichelte Linie) angegeben. 3 mmol/l Glukose, 1 % FCS: Mangelmedium 1 (MMI); 0,03 mmol/l Glukose, 1 % FCS: Mangelmedium II (MMII). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; n. s. = nicht-signifikant.

Die durch eine verringerte Glukosekonzentration (von 3 mmol/l auf 0,03 mmol/l) und bei gleichbleibender Glutaminkonzentration (2 mmol/l) abnehmende Zellproliferation wird durch Berechnung der jeweiligen Verdopplungszeiten bestätigt (Tabelle 4.4). Bei allen Zelllinien stagnierte die Zellproliferation im Mangelmedium II bei 1 % Sauerstoff. Bei den übrigen Sauerstoffkonzentrationen verlängerten sich die Verdopplungszeiten.

Tabelle 4.4: Die Zellteilungsrate in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration im Mangelmedium II. Die Verdopplungszeiten in Stunden (Mittelwert \pm Standardabweichung) wurden berechnet wie in Material und Methoden beschrieben (Kapitel 3.5.1). Die Werte basieren auf mindestens drei unabhängig durchgeführten Versuchen mit jeweils sechs Parallelwerten für jede Zelllinie. Die Zellen wurden für 72 Stunden inkubiert. Das Zellwachstum (=Anzahl vitaler Zellen) wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. n. b. = Teilungsrate nicht bestimmbar aufgrund rigider zelltoxischer Bedingungen.

Zelllinie	21 % O ₂	5 % O ₂	1 % O ₂
Colo741	351,4 \pm 136,4	112,2 \pm 226,5	n. b.
HCT116	122,7 \pm 35,3	83,3 \pm 41,9	n. b.
HT29	108,4 \pm 115,4	87,5 \pm 74,9	n. b.
LS174T	81,1 \pm 89,5	85,7 \pm 70,1	n. b.
SW620	80,3 \pm 6,2	114,1 \pm 6,4	n. b.
Fibroblasten	n. b.	n. b.	n. b.

In Abbildung 4.5 ist die Zellproliferation im Mangelmedium II bei den drei Sauerstoffkonzentrationen 21 %, 5 % und 1 % zur Übersicht dargestellt. Hierzu wurden die in Abbildung 4.4 gezeigten Daten modifiziert.

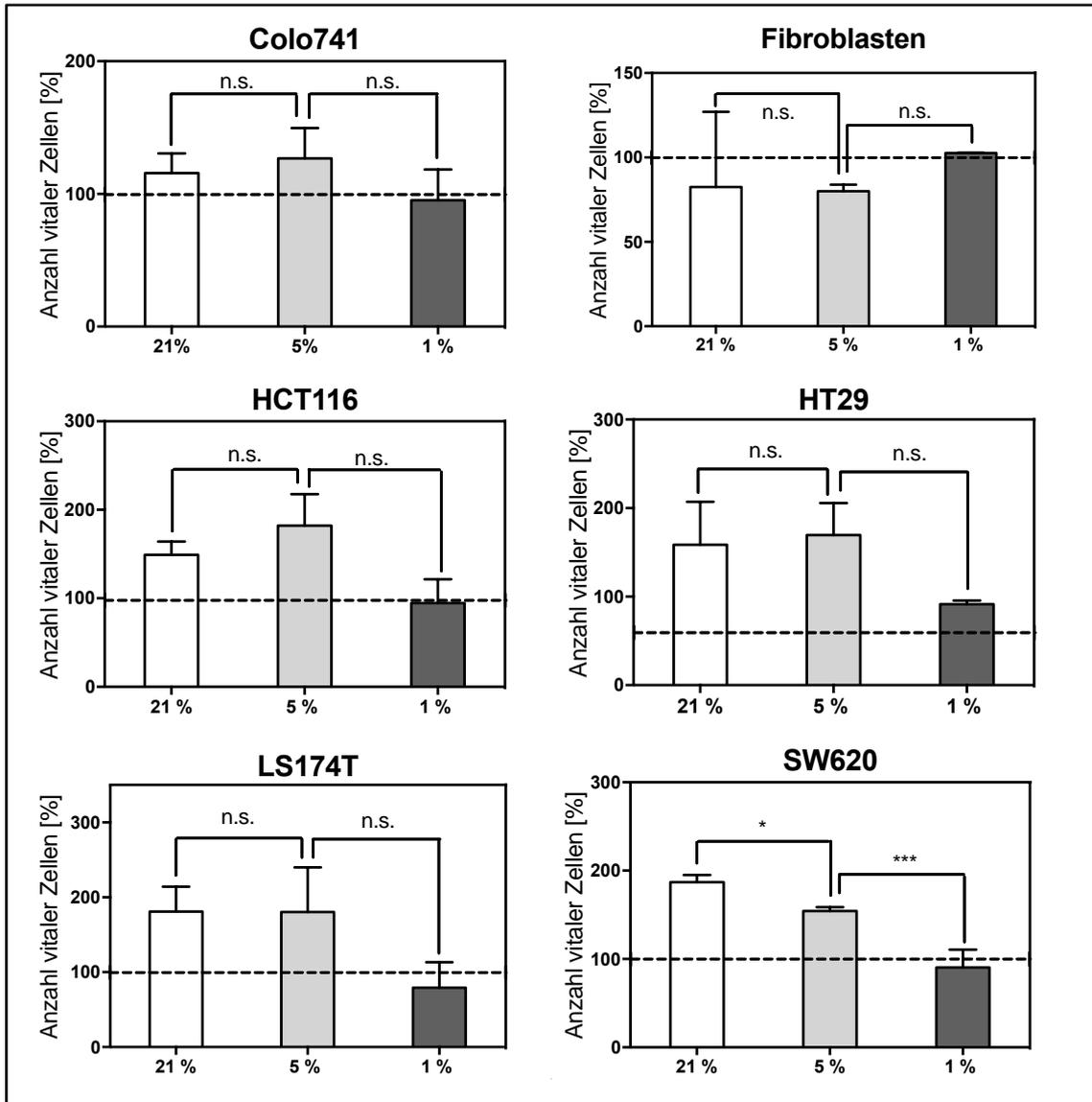
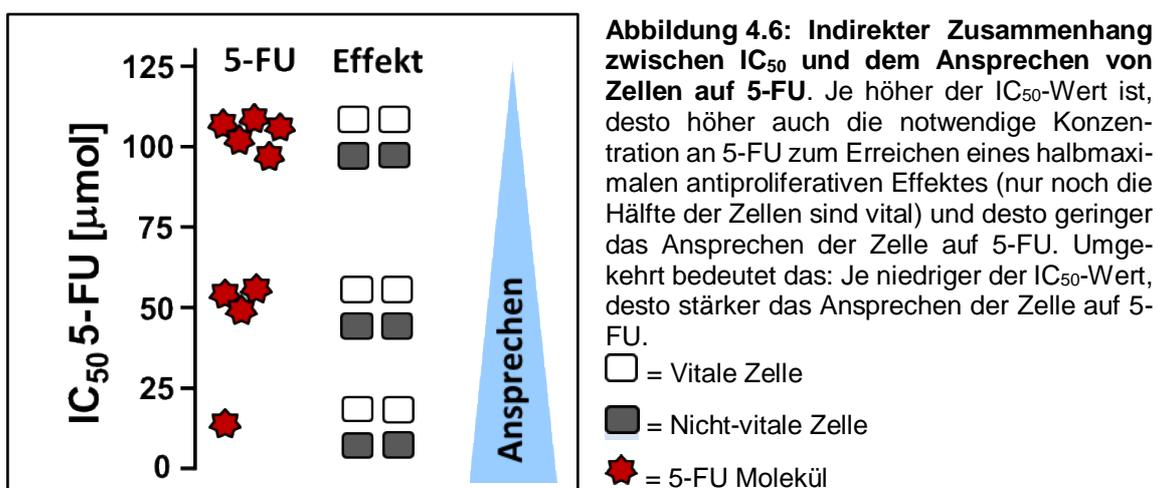


Abbildung 4.5: Übersicht zur Zellproliferation im Mangelmedium II bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff (O₂). Karzinomzellen und Fibroblasten wurden für 72 Stunden inkubiert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und als Mittelwert ± Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Aussaat (=100%, angedeutet mit der gestrichelten Linie) angegeben. Daten aus Abbildung 4.4. Mangelmedium II (MMII): 0,03 mmol/l Glukose, 1 % FCS: *p < 0,05; ***p < 0,001; n. s. = nicht signifikant.

4.3 Der antiproliferative Effekt von 5-FU in Abhängigkeit von der Konzentration an Glukose und Wachstumsfaktoren bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen

Um den antiproliferativen Effekt von 5-FU bei kolorektalen Karzinomzellen und nicht-transformierten Fibroblasten zu bestimmen, wurden die halbmaximalen Konzentration von 5-FU (IC₅₀) im Standard- und Mangelmedium bei 21 %, 5 %

und 1 % Sauerstoff bestimmt. Der IC_{50} -Wert erlaubt, die Wirkung von Hemmstoffen oder Zytostatika unter verschiedenen Bedingungen für verschiedene Zelllinien miteinander zu vergleichen. Der IC_{50} für 5-FU wurde für den Konzentrationsbereich von 10^{-9} mol/l bis 10^{-1} mol/l nach einer Inkubation von 72 Stunden berechnet. Hierzu wurde der Anteil vitaler Zellen mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Kapitel 3.4). In Abbildung 4.6 ist der Zusammenhang zwischen IC_{50} , dem antiproliferativen Effekt und dem Ansprechen der Zellen kurz dargestellt.



In den beiden folgenden Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 wurde sich als experimentelles Ziel gesetzt zu zeigen, ob sich für kolorektale Karzinomzellen und Fibroblasten bei unterschiedlichen Bedingungen *in vitro* (Versorgung mit Glukose, Wachstumsfaktoren und Sauerstoff) ein differenziertes Ansprechen (*»differential stress resistance«* oder DSR; Kapitel 1.3) auf 5-FU nachweisen lässt.

4.3.1 11 mmol/l Glukose, 10 % FCS

Der antiproliferative Effekt von 5-FU wurde zunächst im Standardmedium (11 mmol/l Glukose, 10 % FCS) bestimmt (Tabelle 4.6). Bei 21 % Sauerstoff unterschieden sich die IC_{50} -Werte der Zelllinien LS174T, HT29 und SW620 nicht wesentlich voneinander und lagen in einem Bereich zwischen 14 µmol/l (SW620) und 18 µmol/l (HT29). Niedrigere IC_{50} -Werte wurden für die Zelllinien Colo741 und HCT116 mit 9,2 und 8,3 µmol/l gemessen. Damit lassen sich die fünf kolorektalen Karzinomzelllinien in die beiden Kategorien *»empfindlich«* (IC_{50} 5-FU <10 µmol/l: Colo741 und HCT116) und *»unempfindlich«* (IC_{50} 5FU >10 µmol/l: HT29,

LS174T und SW620) einteilen. Fibroblasten wiesen mit 57 µmol/l den höchsten IC₅₀-Wert bei 21 % Sauerstoff auf.

Bei 5 % und 1 % Sauerstoff nahm der antiproliferative Effekt von 5-FU deutlich ab. Bei 5 % Sauerstoff lagen die IC₅₀-Werte für 5-FU bei den kolorektalen Karzinomzelllinien im Bereich zwischen 36 µmol/l (HCT116) und 112 µmol/l (SW620) und nahmen damit um das 4fache (HCT116) bis 8fache (SW620) zu. Bei 1 % Sauerstoff stiegen die IC₅₀-Werte aller Zelllinien mit Ausnahme von HCT116 weiter an und zwar um das bis 71fache (SW620) im Vergleich zu 21 % Sauerstoff.

Tabelle 4.5: IC₅₀-Werte für 5-FU in µmol/l im Standardmedium bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff. Die Messwerte (Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall (95 % KI)) repräsentieren vier unabhängige Versuche mit jeweils sechs Parallelwerten für jede Zelllinie. (---) keine Angaben. Siehe auch Abbildung 10.5 und 10.6.

Zelllinie	21 %		5 %		1 %	
	Mittelwert	95 % KI	Mittelwert	95 % KI	Mittelwert	95 % KI
Colo741	9,2	5,9-14	49	27-92	241	129-447
HCT116	8,3	5,8-12	36	23-58	37	22-62
HT29	18	10-31	112	63-201	770	434-1369
LS174T	17	12-24	75	49-113	422	251-708
SW620	14	8,3-24	112	61-203	> 1.000	—
Fibroblasten	57	17-184	605	309-1.185	> 1.000	—

Bei Fibroblasten stieg der IC₅₀-Wert von 5-FU um das 11fache deutlich stärker an ($p < 0,001$) als bei den kolorektalen Karzinomzelllinien. Dieser Anstieg ist vermutlich dadurch zu erklären, dass Fibroblasten eine sehr geringe Zellproliferation bei 5 % und 1 % Sauerstoff zeigten (Tabelle 4.1) und damit der antiproliferative Effekt von 5-FU deutlich abnahm (Tabelle 4.5). Aus Tabelle 4.5 ist ebenfalls zu entnehmen, dass im Standardmedium bei optimaler Versorgung mit Glukose (11 mmol/l) und Wachstumsfaktoren (10 % FCS) der antiproliferative Effekt von 5-FU bei kolorektalen Karzinomzellen in Hypoxie anstieg, die IC₅₀-Werte stiegen an. Die Zellen sprachen also in Hypoxie ebenfalls schlechter auf die Chemotherapie an.

4.3.2 3 mmol/l Glukose, 1 % FCS

Als nächstes wurde die Stärke des antiproliferativen Effektes von 5-FU im Mangelmedium (3 mmol/l Glukose, 1 % FCS) untersucht. Wie bereits für das Standardmedium beobachtet, nahm der antiproliferative Effekt von 5-FU im Mangelmedium bei 21 % am deutlichsten für Fibroblasten ab (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: IC₅₀-Werte für 5-FU (µmol/l) im Standard- und Mangelmedium bei 21% Sauerstoff. Die Messwerte (Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall (95 % KI)) repräsentieren fünf unabhängige Versuche mit jeweils sechs Parallelwerten für jede Zelllinie. (---) keine Angaben.

Zelllinie	Standardmedium		Mangelmedium	
	Mittelwert	95 % KI	Mittelwert	95 % KI
Colo741	9,2	5,9-14	7,9	4,9-13
HCT116	8,3	5,8-12	8,0	5,1-13
HT29	18	10-31	13	7,0-26
LS174T	17	12-24	41	27-63
SW620	14	8,3-24	27	17-43
Fibroblasten	57	17-184	> 10.000	—

Für die kolorektalen Karzinomzellen blieben die Änderungen in den IC₅₀-Werten für 5-FU mit einem maximalen Faktor von 2 (LS174T) im Mangelmedium bei 21 % Sauerstoff eher gering. Dies deutet auf ein von der Konzentration an Glukose unverändertes Ansprechen auf 5-FU hin (Abbildung 4.7). Diese unterschiedliche Reaktion von Tumorzellen und Fibroblasten bedeutet, dass »*differential stress resistance*« in der vorliegenden Arbeit für 21 % Sauerstoff nachweisbar war.

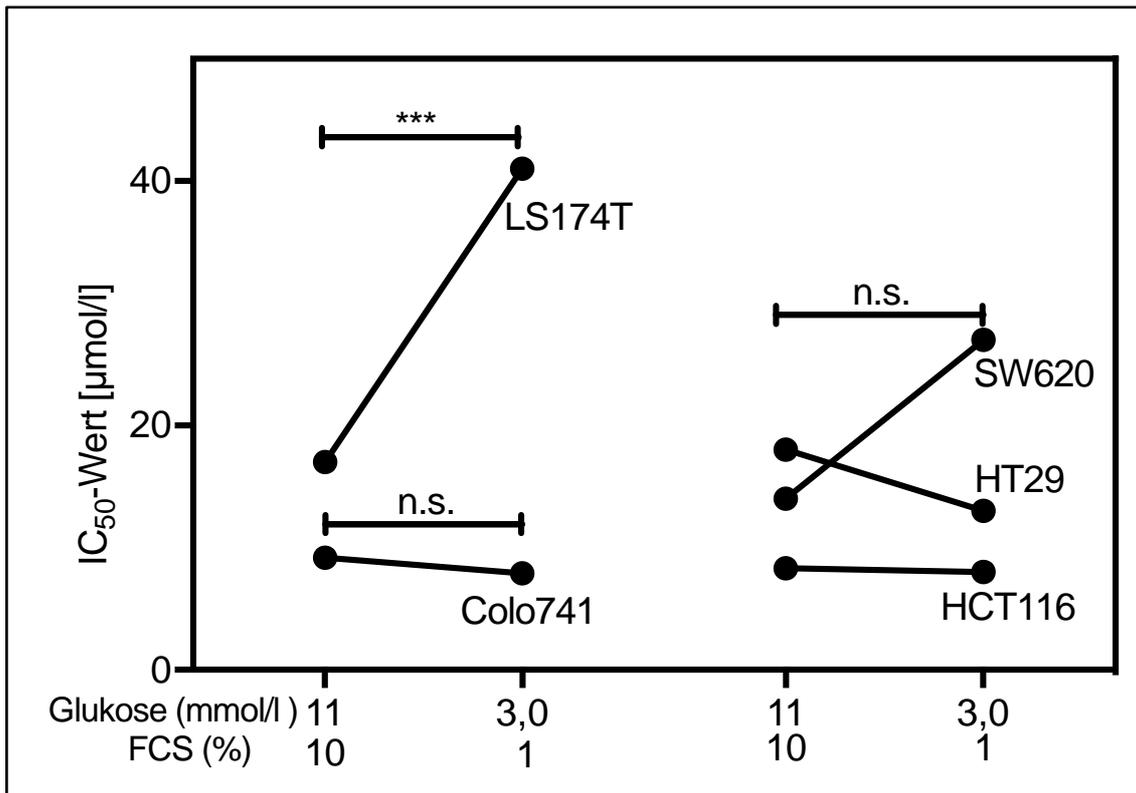


Abbildung 4.7: Änderung der IC₅₀-Werte für 5-FU bei 21% Sauerstoff im Mangelmedium im Vergleich zum Standardmedium. Standardmedium: 11 mmol/l Glukose; Mangelmedium: 3 mmol/l Glukose. ***p < 0,001; n. s. = nicht signifikant. Fibroblasten sind nicht gezeigt.

Untersuchungen im Mangelmedium bei 1 % Sauerstoff waren ohne Erfolg. So stiegen die IC₅₀-Werte bei allen kolorektalen Karzinomzelllinien (Ausnahme: Colo741) und Fibroblasten deutlich an; teilweise um bis zu 800 % (HT29) (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: IC₅₀-Werte für 5-FU in µmol im Mangelmedium bei 1 % Sauerstoff. Die Messwerte (Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall (95 % KI)) repräsentieren vier unabhängige Versuche mit sechs Parallelwerten für jede Zelllinie. (---) keine Angaben.

Zelllinie	Standardmedium		Mangelmedium	
	Mittelwert	95 % KI	Mittelwert	95 % KI
Colo741	241	129-447	186	96-361
LS174T	422	251-708	> 1.000	—
HCT116	37	22-62	169	69-418
HT29	770	434-1.369	> 1.000	—
SW620	> 1.000	—	> 10.000	—
Fibroblasten	> 1.000	—	> 10.000	—

Die extrem hohen IC₅₀-Werte für 5-FU bei 1 % Sauerstoff (Tabelle 4.7) sind sicherlich mit der stark zurückgegangenen Zellproliferation zu erklären, die durch den Glukosemangel noch verschärft wird. Um diese Limitierung zu umgehen, wurden die Untersuchungen auf 5 % Sauerstoff erweitert. Beide Sauerstoffkonzentrationen, 1 % und 5 %, lassen sich auch in soliden Tumoren messen (Kapitel 1.4). Bei 5 % Sauerstoff war der proliferative Charakter der kolorektalen Karzinomzellen im Mangelmedium (3 mmol/l Glukose, 1 % FCS) noch nachweisbar (Abbildung 4.3).

Die Ergebnisse zum antiproliferativen Effekt von 5-FU bei 5 % Sauerstoff im Mangelmedium zeigen, dass sich dieser bei drei der insgesamt fünf getesteten kolorektalen Karzinomzelllinien (Colo741, HCT116, HT29) signifikant um den Faktor 4 verstärkte (Tabelle 4.8); d. h. die IC₅₀-Werte für 5-FU wurden kleiner (Abbildung 4.6). Auch LS174T und SW620 wiesen eine Abnahme ihrer IC₅₀-Werte für 5-FU auf, die nicht signifikant war (Tabelle 4.8).

Tabelle 4.8: IC₅₀-Werte für 5-FU in µmol/l im Mangelmedium bei 5 % Sauerstoff. Die Messwerte (Mittelwert mit 95 % Konfidenzintervall (95 % KI)) repräsentieren fünf unabhängige Versuche, mit jeweils sechs Parallelwerten für jede Zelllinie. Siehe auch Abbildung 4.8.

Zelllinie	Standardmedium		Mangelmedium	
	Mittelwert	95 % KI	Mittelwert	95 % KI
Colo741	49	29-86	18	11-30
HCT116	36	23-58	9,6	6,0-15
HT29	112	61-203	27	14-52
LS174T	75	49-113	64	47-87
SW620	112	61-203	95	57-159
Fibroblasten	605	334-1.098	>1.000	—

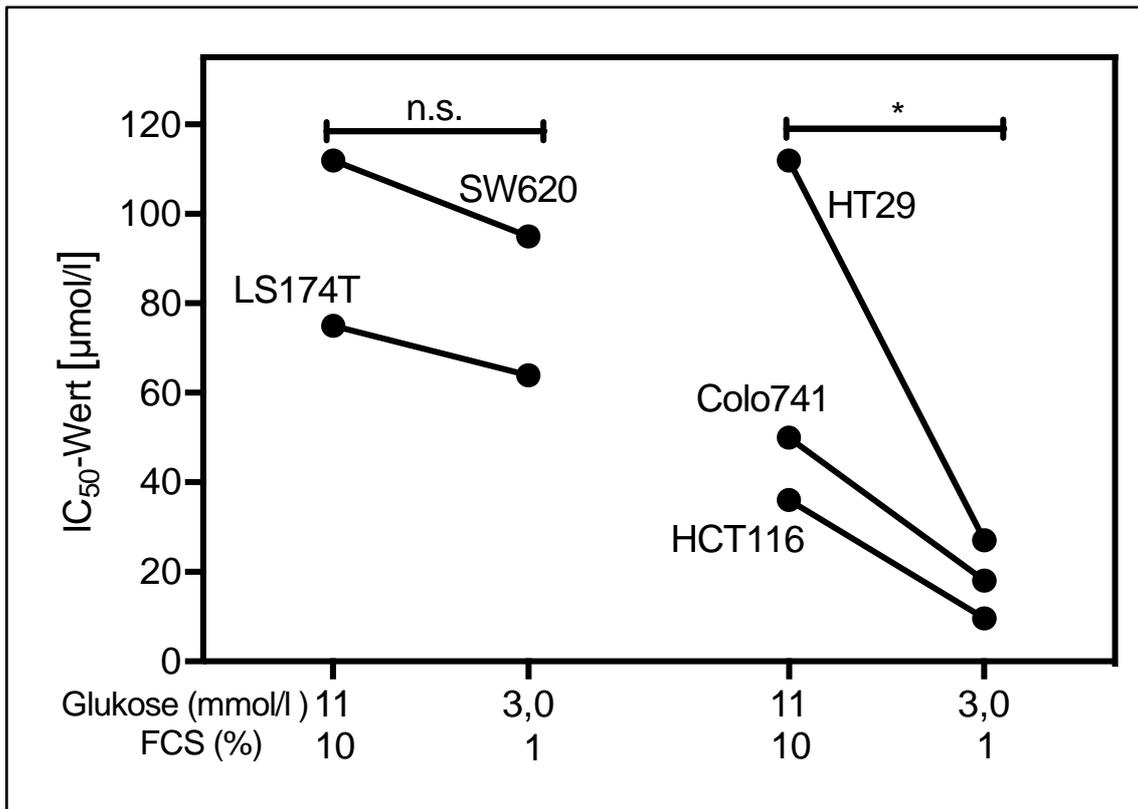


Abbildung 4.8: Änderung der IC₅₀-Werte für 5-FU bei 5 % Sauerstoff im Mangelmedium im Vergleich zum Standardmedium. Standardmedium: 11 mmol/l Glukose; Mangelmedium: 3 mmol/l Glukose. *p < 0.05; n. s. = nicht signifikant. Werte über 1000 µmol/l sind nicht gezeigt. Werte aus Tabelle 4.8.

Zur Veranschaulichung der Werte aus Tabelle 4.8 sind diese in Abbildung 4.8 grafisch dargestellt. Im Mangelmedium (3 mmol/l Glukose, 1 % FCS) zeigten die kolorektalen Karzinomzellen ein verstärktes Ansprechen auf den antiproliferativen Effekt von 5 FU (=Verringerung der IC₅₀-Werte) bei 5 % Sauerstoff, nicht aber Fibroblasten (in Abbildung 4.8 nicht gezeigt, s. hierzu Tabelle 4.8). Die Daten deuten sehr stark darauf hin, dass maligne Zellen, hier humane kolorektale Karzinomzellen, und nicht-malignen Zellen, hier Fibroblasten, in einer definierten Mangelsituation eine »*differential stress resistance*« zeigten (DSR; Kapitel 1.3). Die malignen Zellen zeigten eine erhöhte Empfindlichkeit im Mangelmedium gegenüber Chemotherapeutika. Dass eine Sensitivierung der Tumorzelle gegenüber der 5-FU ausschließlich bei 5 % Sauerstoff nachzuweisen war, kann als Hinweis gewertet werden, dass die lokale Sauerstoffkonzentration an den Mechanismen beteiligt ist (Kapitel 6.3).

5 Beantwortung der Fragen

1. Wie reagieren kolorektale Karzinomzellen und Kontrollzellen auf verschiedene Konzentrationen an Glukose und Wachstumsfaktoren bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 %?

Die Stärke der Proliferation kolorektaler Karzinomzellen (und ihre Zellteilungsrate) korrelierte positiv mit der Glukosekonzentration im Medium. Dieser Zusammenhang war bei den beiden tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % nachweisbar (Abbildung 4.1 und 4.3), sowie bei 21 % Sauerstoff. Dagegen war Glutamin (2 mmol/l) für die Stärke der Zellproliferation ohne Bedeutung (Abbildung 4.4). Der Verbrauch an Glukose und die Bildung von Laktat waren bei 1 % Sauerstoff am stärksten (Tabelle 4.2). Während kolorektale Karzinomzellen ihren pro-proliferativen Phänotyp auch bei 5 % und 1 % Sauerstoff beibehielten, zeigten sich Fibroblasten weitaus empfindlicher gegenüber tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen (Tabelle 4.5 und 4.6).

2. Wie wird der antiproliferative Effekt von 5-FU bei 21 % und 1 % Sauerstoff durch eine Restriktion von Glukose und Wachstumsfaktoren beeinflusst?

Der antiproliferative Effekt von 5-FU erfordert proliferierende Zellen. Wurde die Stärke der Zellproliferation im Mangelmedium durch Glukoserestriktion verringert, erhöhten sich die IC_{50} -Werte für 5-FU bei 1 % Sauerstoff, bei 21 % Sauerstoff hingegen blieben sie nahezu unverändert (Abbildung 4.7). Die Kombination aus Mangelmedium und 1 % Sauerstoff ließ bei kolorektalen Karzinomzellen und Fibroblasten die IC_{50} -Werte für 5-FU weiter ansteigen (Tabelle 4.7). Bei 21 % Sauerstoff hingegen, war eine »*differential stress resistance*« im Mangelmedium bei den Tumorzellen, sowie den Fibroblasten zu sehen.

3. Welche Bedeutung kommt der tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentration von 5 % bei einer Restriktion von Glukose und Wachstumsfaktoren für den antiproliferativen Effekt von 5-FU zu?

Für die Untersuchungen bei 5 % Sauerstoff war wichtig, dass bei dieser Sauerstoffkonzentration eine Zellproliferation auch bei Glukoserestriktion (3 mmol/l) nachweisbar war (Abbildung 4.5). Wurden die Zellen mit 5-FU inkubiert, so war ein verstärkender Einfluss der Glukoserestriktion auf den antiproliferativen Effekt von 5-FU eindeutig bei drei der fünf kolorektalen Karzinomzelllinien (Colo741, HCT116, HT29) nachweisbar im Vergleich zu einer optimalen Versorgung mit Glukose (11 mmol/l). Dieser Effekt von 5-FU war bei Fibroblasten nicht zu beobachten gewesen. Bei zwei kolorektalen Karzinomzelllinien (LS174T, SW620) zeigten die Unterschiede bei den IC₅₀-Werten für 5-FU in Stand- und Mangelmedium eindeutige Tendenzen auch wenn die Unterschiede nicht signifikant waren. Ein differenziertes Ansprechen von kolorektalen Karzinomzellen und Fibroblasten auf den antiproliferativen Effekt von 5-FU nach dem Phänomen der »*differential stress resistance*« oder DSR war somit eindeutig im Mangelmedium bei 21 % und 5 % Sauerstoff nachzuweisen (nicht aber für die Kombination Mangelmedium und 1 % Sauerstoff). Ob und wie Sauerstoff am verbesserten Ansprechen der kolorektalen Zelllinien auf 5-FU im Mangelmedium aktiv beteiligt ist, ist bisher nicht geklärt.

6 Diskussion

Ziel der Arbeit war zu untersuchen, ob eine Glukoserestriktion kombiniert mit einem begrenzten Angebot an Wachstumsfaktoren (dies wurde durch eine Verringerung der FCS-Konzentration auf 1 % erreicht) den antiproliferativen Effekt von 5-FU bei fünf humanen kolorektalen Karzinomzelllinien *in vitro* im Sinne einer DSR (Kapitel 1.3) beeinflusst. Da Tumoren in aller Regel mit Sauerstoff unterversorgt sind (*Gatenby RA et al., 1988; Vaupel P et al., 1991; Terris DJ, Dunphy EP, 1994; Evans SM et al., 2001; Partridge SE et al., 2001*), wurden die Untersuchungen auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 5 % und 1 % durchgeführt (Kapitel 1.4).

6.1 Biologische Effekte einer Kalorienrestriktion

Eine der ersten experimentellen Arbeiten zum Thema Kalorienrestriktion²² wurde 1986 von Weindruch von der University of California, Los Angeles (UCLA) durchgeführt. Er konnte an Mäusen durch Kalorienrestriktion einen anti-Aging-Effekt nachweisen, der zu einer um 30 % verlängerten Lebenserwartung führte. Die Tiere sollten sich dabei nicht in einem Zustand der Mangelernährung befinden haben wie die Autoren explizit betonten²³ (*Weindruch R et al., 1986*). Auch beim Rhesusaffen verlängerte eine moderate und langfristige Kalorienrestriktion die Lebenszeit um 20 bis 40 % im Vergleich zu normal ernährten Artgenossen der Kontrollgruppe (keine Kalorienrestriktion). Mit der kalorienreduzierten Ernährung sahen die Tiere im Alter nicht nur deutlich jünger aus als gleichaltrige Tiere der Kontrollgruppe, auch traten bei ihnen altersassoziierte Erkrankungen wie Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, Hirnatrophie und Krebs erst später auf (*Colman RJ et al., 2009; 2014*). Eine Lebenszeitverlängerung durch Kalorienrestriktion wurde auch in zahlreichen anderen Spezies wie Hefe, Fruchtfliege, Nematoden, Fische und Hamster

²² Die vermutlich älteste Publikation zu diesem Thema stammt aus den Jahre 1935 von McCay (*McCay CM et al., 1935*).

²³ Das Ziel der Kalorienrestriktion stellt die Restriktion der (täglichen) Kalorienaufnahme von ca. 20 bis 40 % ohne Malnutrition dar.

nachgewiesen (Übersicht bei *Taormina G, Mirisola MG, 2014*). Der Hauptregulator einer lebenszeitverlängernden und gesundheitsfördernden Kalorienrestriktion wird wohl nicht durch eine generelle Reduktion der täglichen Kalorienaufnahme induziert, sondern vermutlich durch eine geringere Aufnahme einzelner Makronährstoffe bzw. durch ein modifiziertes Verhältnis der Makronährstoffe in der Diät (*Levine ME et al., 2014*).

Verschiedene medizinische Disziplinen zeigen vermehrt Interesse am Konzept des kurzzeitigen Fastens und seinem möglichen therapeutischen Potential (*Stewart TM et al., 2013*). Dass durch kurzzeitiges Fasten die Nebenwirkungen von Chemotherapeutika abgemildert oder sich sogar vermeiden lassen, ist in den letzten Jahren immer deutlicher geworden (*Raffaghella L et al., 2010; Bauersfeld SP et al., 2018*). Zudem werden die molekularen Grundlagen immer besser verstanden ²⁴ (*Blagosklonny MV, Pardee AB, 2001; Blagosklonny MV, Darzynkiewicz Z, 2002; Murakami S, 2006; Madia F et al., 2008; Longo VD, Mattson MP, 2014*). Dagegen erscheint eine dauerhafte Kalorienrestriktion bei onkologischen Patienten mit bereits bestehender oder drohender Tumorkachexie kontraindiziert (*Kim SK, Demetri GD, 1996; Reed MJ et al., 1996; Tisdale MJ, 2002; Kristan DM, 2008; Fontana L et al., 2010; Raffaghella L et al., 2010*).

Studien zum Kurzzeitfasten (Kapitel 1.3) konnten einen therapeutischen Effekt dieser Form der Kalorienrestriktion für den onkologischen Patienten bei den durch Chemotherapeutika verursachten Nebenwirkungen zeigen (*Raffaghella L et al., 2010*). So nahmen einige der typischen Nebenwirkungen der Chemotherapie wie Müdigkeit, gastrointestinale Nebenwirkungen und Schwäche deutlich ab und andere Nebenwirkungen wie Schwindel, Erbrechen, Diarrhoe, Bauchkrämpfe und Schleimhautentzündungen waren nicht nachweisbar. Der durch das Kurzzeitfasten ausgelöste (zusätzliche) Gewichtsverlust wurde rascher kompensiert als der durch Chemotherapie ausgelöste Gewichtsverlust bei normaler Ernährung. Die durch Chemotherapie verursachte Abnahme an

²⁴ Eine Auswirkung der Kalorienrestriktion, die bei Mensch und Tier gefunden wird, sind verringerte Glukose- und Insulinspiegel im Plasma und eine Reduktion des Körperfettanteils.

Lymphozyten und Thrombozyten fiel mit Kurzzeitfasten weniger stark ab als bei nicht-fastenden Patienten; Zudem wurde der Verlust rascher kompensiert (*Raffaghello L et al., 2010*).

6.2 Grundlage der »differential stress resistance« (DSR) bei transformierten und nicht-transformierten Zellen

Als Erklärung für das Auftreten weniger Chemotherapie-assoziiertes Nebenwirkungen durch Kurzzeitfasten (Kapitel 6.1) wird das Phänomen der »*differential stress resistance*« oder DSR in der Literatur diskutiert (Kapitel 1.3). DSR beschreibt das unterschiedliche Ansprechen von transformierten und nicht-transformierten Zellen auf Chemotherapeutika in der Mangelsituation. Ursächlich für DSR scheint der mit einem Mangel an Nährstoffen einhergehende Verlust an Wachstumsfaktoren zu sein, der zu einer Einschränkung der Proliferation von nicht-malignen Zellen, nicht aber von Krebszellen, führt. Diese sind in aller Regel auf exogene Wachstumsfaktoren nicht angewiesen (*Hanahan D, Weinberg RA, 2011*) und unterliegen in einer Mangelsituation somit kaum Limitierungen bei der Zellproliferation (Abbildung 6.1). Der starke pro-proliferative Phänotyp von Krebszellen trägt dazu bei, dass eine Anpassung an Mangelbedingungen unvollständig bleibt, da sich der Großteil der proliferationsfördernden Mutationen einer Krebszelle durch äußere Bedingungen kaum beeinflussen lässt. Diese Unfähigkeit zur Anpassung an Mangelbedingungen führt in Kombination mit Chemotherapeutika zu oxidativem Zellstress mit vermehrten DNA-Schäden und Induktion von Apoptose (*Lee C et al., 2012*). Das bedeutet also ein besseres Ansprechen auf die Chemotherapie.

Das differenzierte Ansprechen von transformierten und nicht-transformierten Zellen auf Chemotherapeutika in der Mangelsituation wurde in dieser Arbeit mit kolorektalen Karzinomzellen und Fibroblasten für 5-FU gezeigt (Abbildung 4.8). Raffaghello et al. untersuchten die Auswirkungen einer Restriktion an Glukose (3 mmol/l) und Wachstumsfaktoren (1 % FCS) auf die Stärke des antiproliferativen Effektes von Cyclophosphamid²⁵ bei verschiedenen Zelllinien des Glioms

²⁵ Ein Zytostatikum mit interkalierendem Wirkmechanismus.

und Neuroblastoms im Vergleich zu normalen Gliazellen *in vitro*. Während normale Zellen durch Glukoserestriktion vor dem antiproliferativen Effekt von Cyclophosphamid geschützt waren, zeigten sich die Tumorzelllinien unverändert sensitiv gegenüber Cyclophosphamid (*Raffaghello L et al., 2008*), dieser Effekt wurde als DSR bezeichnet. Die gleiche Arbeitsgruppe (*Lee C et al., 2012*) untersuchte ebenfalls den antiproliferativen Effekt von Doxorubicin bei gleichen Bedingungen (3 mmol/l Glukose und 1 % FCS) an verschiedenen Tumorzelllinien²⁶ *in vitro*. Verglichen mit dem antiproliferativen Effekt von Doxorubicin im Standardmedium (5 bzw. 11 mmol/l Glukose, 10 % FCS) war dieser im Mangelmedium bei 10 der 17 getesteten Zelllinien deutlich erhöht (der Rückgang vitaler Zellen betrug dabei mindestens 25 %), bei den übrigen Zellen mindestens gleich wie im Standardmedium (*Lee C et al., 2012*). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Existenz des Phänomens DSR (Abbildung 4.8). Ein besseres Ansprechen der Tumorzellen konnte ausschließlich bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen nachgewiesen werden (Kapitel 6.3).

An Zellen des kolorektalen Karzinoms konnten Peter et al. zeigen, dass der Wachstumsfaktor IGF-1 (Kapitel 1.3) den antiproliferativen Effekt von 5-FU verringert, während mit einer Blockade des IGF-1-Rezeptors das Ansprechen der Zellen auf 5-FU wiederhergestellt wurde (*Peter ES et al., 2000*). Der IGF-1-Signalweg ist auch bei anderen Tumorentitäten für das geringe Ansprechen von Tumorzellen auf Chemotherapeutika verantwortlich. So fanden Lee und Mitautoren, dass bei Hemmung des IGF-1-Signalweges Gliomzellen nicht vor Cyclophosphamid geschützt waren, primäre Gliazellen aber schon. Auch Fibroblasten waren vor Doxorubicin besser geschützt, wenn der IGF-1-Signalweg gehemmt wurde. Der IGF-1-Spiegel *in vivo* steigt durch Aufnahme von Nährstoffen und sinkt bei Kalorienrestriktion. Während normale Zellen auf diese Schwankungen mit einer verminderten Zellproliferation reagieren und damit vor der antiproliferativen Wirkung der Chemotherapeutika weitestgehend geschützt sind, fehlen Krebszellen in aller Regel aufgrund ihrer starken endogenen Produktion an

²⁶ Hierbei handelt es sich Zelllinien von Brustkrebs, Melanom, Gliom, Prostata, kolorektales Karzinom, Neuroblastom und Ovarkarzinom.

Wachstumsfaktoren diese Fähigkeit zur Anpassung. Durch ihren stark pro-proli-ferativen Phänotyp sind sie nicht vor der antiproliferativen Wirkung von Chemo-therapeutika geschützt (Lee C et al., 2011).

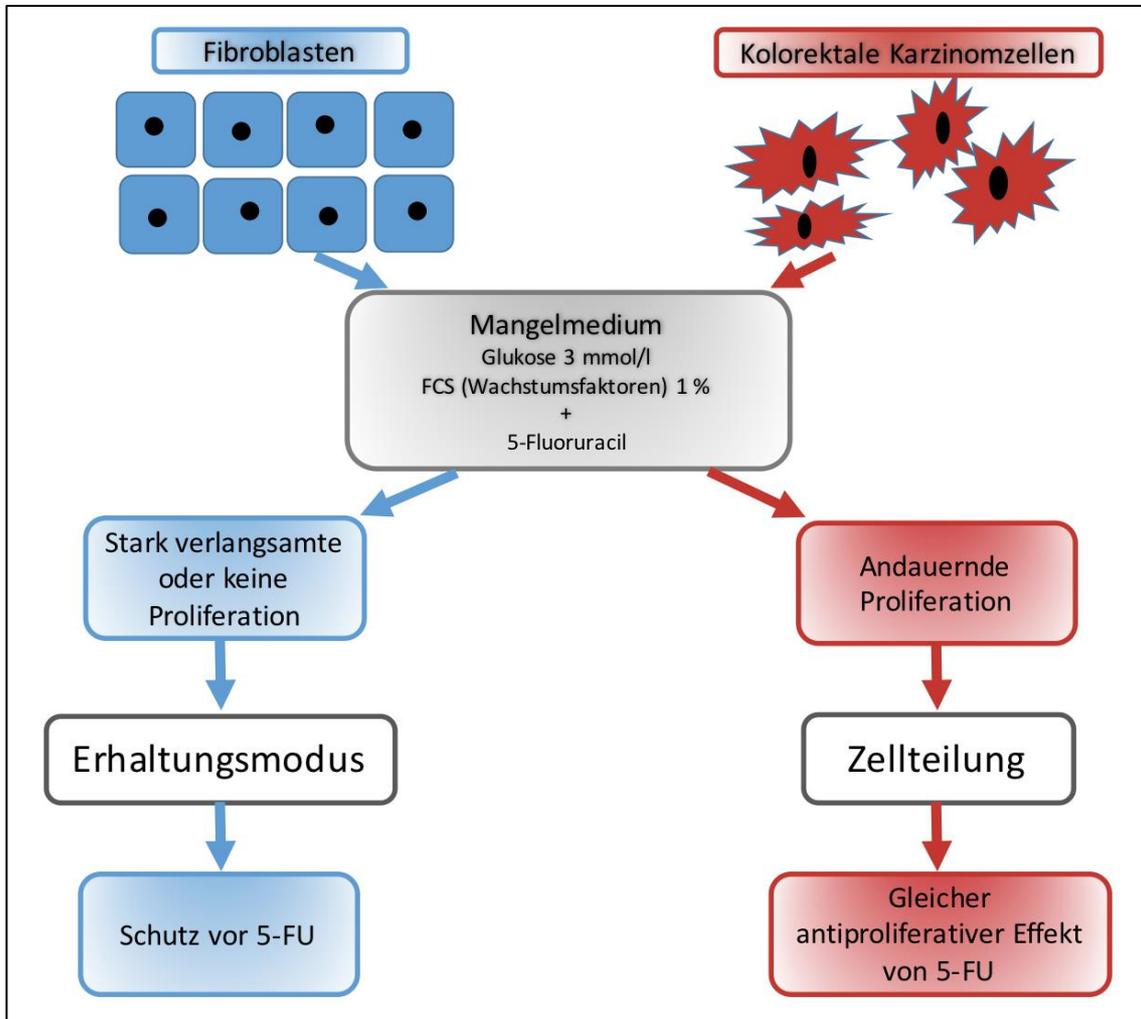


Abbildung 6.1: »Differential stress resistance« (DSR): Unterschiede im Ansprechen von kolorektalen Karzinomzellen und Fibroblasten gegenüber dem antiproliferativen Effekt von 5-FU in der Mangelsituation. Nicht-transformierte Zellen wie Fibroblasten passen sich der Situation im Mangelmedium (3 mmol/l Glukose, 1 % FCS) durch eine abnehmende Zellproliferation als im Standardmedium (11 mmol/l Glukose, 10 % FCS) an. Dies beeinflusst negativ den antiproliferativen Effekt von 5-FU. Im Gegensatz dazu zeigen kolorektale Karzinomzellen auch im Mangelmedium eine Zellproliferation (Abbildung 4.5), weshalb ein antiproliferativer Effekt von 5-FU nachzuweisen war (Abbildungen 4.7 und 4.8). Die mögliche Bedeutung der Sauerstoffkonzentration für DSR wird in Kapitel 6.3 näher betrachtet. Eigener, vereinfachter Entwurf nach Daten von Lee et al., 2012.

6.3 Regulatorische Effekte tumorphysiologischer Sauerstoffkonzentrationen

Der Hauptanteil an Arbeiten zu DSR haben ihre Untersuchungen bei der nicht-physiologischen Sauerstoffkonzentrationen von 21 % durchgeführt (z. B. Lee C *et al.*, 2011). Diese für die Kultivierung von eukaryotischen Zellen routinemäßig verwendete Sauerstoffkonzentration entspricht aber nicht den in soliden Tumoren vorherrschenden Sauerstoffkonzentrationen. Ein Anliegen der Arbeit war deshalb, die Ausbildung von DSR auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen zu untersuchen. Je nach Gewebe herrscht *in vivo* eine physiologische Sauerstoffkonzentration von 1 % bis 11 % vor (Carreau A *et al.*, 2011), im intestinalen Gewebe von ca. 7,6 % (Thermann M *et al.*, 1985; Müller M *et al.*, 1995; Müller M *et al.* 2002). Um das Phänomen DSR in dieser Arbeit untersuchen zu können, wurden die IC₅₀-Werte von 5-FU für jede Zelllinie im Standard- und Mangelmedium bei den drei Sauerstoffkonzentrationen 21 %, 5 % und 1 % bestimmt (Abbildung 10.5 und 10.6). Zusätzlich wurde ein Konzentrationsbereich an 5-FU von acht Potenzen untersucht (Kapitel 3.6). Dies erforderte eine Vielzahl an Messungen zur Zellvitalität (Kapitel 3.4). Hierin unterscheidet sich diese Arbeit von anderen, die punktuell einzelne Konzentrationen untersucht haben. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt zweifelsohne in der stärkeren Aussagekraft der Daten.

Im Standardmedium unterschieden sich die kolorektalen Karzinomzelllinien in ihren IC₅₀-Werten für 5-FU bei den drei getesteten Sauerstoffkonzentrationen nicht wesentlich (Tabelle 4.5). Nahezu unveränderte IC₅₀-Werte sind auch für das Mangelmedium bei 21 % Sauerstoff nachzuweisen (Tabelle 4.6). Der für LS174T ermittelte Anstieg im IC₅₀ für 5-FU beim Wechsel von Standard- zu Mangelmedium (bei 21 % Sauerstoff) ist für das Phänomen DSR nicht relevant (Abbildung 4.6).

Der bei Fibroblasten beobachtete Anstieg der IC₅₀-Werte für 5-FU bei 21 % Sauerstoff im Mangelmedium im Vergleich zum Standardmedium (Tabelle 4.6) deutet auf ein differenziertes Ansprechen von transformierten und nicht-transformierten Zellen auf den antiproliferativen Effekt von 5-FU in Abhängigkeit

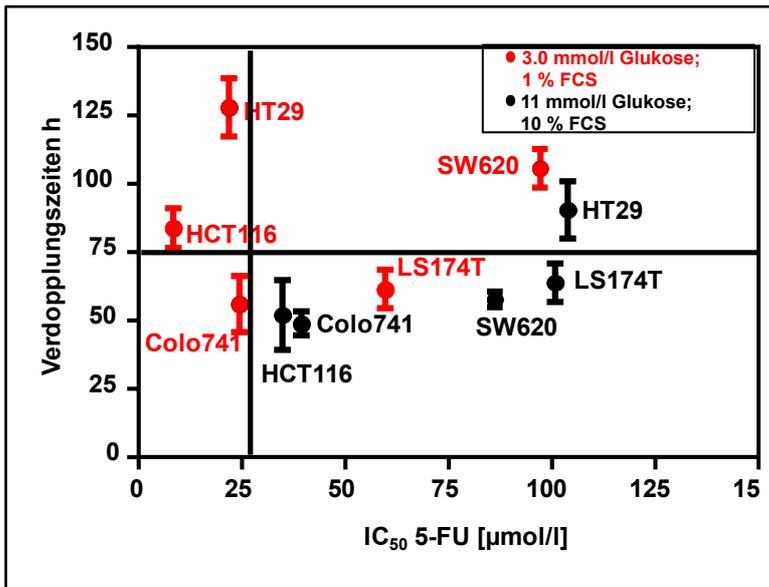


Abbildung 6.2: Änderung der IC₅₀-Werte für 5-FU bei fünf kolorektalen Karzinomzelllinien nach 72 Stunden im Mangelmedium (rote Punkte) im Vergleich zum Standardmedium (schwarze Punkte) bei 5 % Sauerstoff. Deutlich zu erkennen, dass nur im Mangelmedium bei drei der fünf Zelllinien der IC₅₀ für 5-FU unter 25 mmol/l liegt. Im Standardmedium dagegen liegen sämtliche IC₅₀ oberhalb von 25 mmol/l Glukose. Standardmedium (11 mmol/l Glukose, 10 % FCS), Mangelmedium (3 mmol/l Glukose und 1 % FCS).

von der Versorgungssituation hin, das mit dem Phänomen des DSR zu erklären ist.

Bei 5 % Sauerstoff war für das Mangelmedium zusätzlich ein deutlich empfindlicheres Ansprechen der Tumorzellen auf 5-FU nachzuweisen als im Standardmedium (Tabelle 4.8), das ebenfalls mit dem Phänomen DSR zu erklären ist (Lee C et al., 2012). Die modifizierte Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 6.2 zeigt Unterschiede zwischen Standard- und Mangelmedium hinsichtlich der IC₅₀-Werte für 5-FU und der Zellproliferation.

Abbildung 6.2:

Von einer Unterversorgung solider Tumoren mit Sauerstoff, die in ihrer stärksten Ausprägung als Tumorhypoxie bezeichnet wird (Brown JM, Giaccia AJ, 1998), sind bis zu 60 % der soliden Tumoren betroffen (Evans SM et al., 2001; Partridge SE et al., 2001; Vaupel P, Mayer A, 2007). Zunächst wurde Hypoxie als limitierender Faktor für das Tumorwachstum gesehen (Barach AL, Bickerman HA, 1954; Thomlinson RH, 1977), doch gilt es aktuell als unstrittig, dass ausgedehnte Phasen von Hypoxie die Tumorprogression fördern (van den Brenk HA et al., 1972; Blumenson LE, Bross ID, 1976; Young SD et al., 1988; Harris AL, 2002; Brahimi-Horn MC et al., 2007; Vaupel P, Mayer A, 2007; Bertout JA et al., 2008; Baeriswyl V, Christoferi G, 2009; Klein TJ, Glazer PM, 2010). So scheint Hypoxie

an der positiven Selektion von Tumorzellen mit geringer Expression von p53 beteiligt zu sein, da sie vor einer p53-vermittelten Induktion von Apoptose geschützt sind (*Graeber TG et al., 1996*).

Der bei abnehmenden Sauerstoffkonzentrationen wichtigste Transkriptionsfaktor zur Adaption der Tumorzelle an geringe Sauerstoffpartialdrücke stellt HIF-1 α ²⁷ dar (*Shay JE et al., 2014*). HIF-1 α wird von zahlreichen Tumoren wie dem kolorektalen Karzinom überexprimiert (*Zhong H et al., 1999*) und löst eine erhöhte Transkription von glykolytischen Enzymen und Glukose-Transportern (GLUT) wie GLUT1 und GLUT4 aus. Zellen mit HIF-1 α -Überexpression werden überwiegend über die Glykolyse mit ATP und intermediären Substanzen für den anabolen Stoffwechsel versorgt (*Fukuda R et al., 2007*). Bei einer Sauerstoffkonzentration, die zum Stillstand der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien führt (s. auch Anmerkung 16), sind sowohl normale Zellen als auch Tumorzellen von Glukose abhängig, da dies der einzige Energieträger ist, mit dem eukaryotische Zellen in Abwesenheit von Sauerstoff Energie gewinnen können (Kapitel 1.4). Der Glukoseverbrauch durch kolorektale Karzinomzellen war bei 1 % Sauerstoff höher als bei 5 % und 21 % Sauerstoff. Die starke Laktatproduktion deutet auf einen glykolytisch dominierten Stoffwechsel hin (Tabelle 4.2).

Therapeutisch von Bedeutung ist, dass zahlreiche Tumoren in Hypoxie Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika ausbilden (*Teicher BA, 1994; Zhao C et al., 2016; Warren HR, Hajmadi M, 2016*). Chang et al. konnten einen Zusammenhang zwischen Tumorzellen im Zellzyklusarrest und einem erhöhten Efflux von 5-FU herstellen (*Chang Q et al., 2006; Sasabe E et al., 2007; Yoshida S et al., 2009*). Eine durch Hypoxie induzierte Oxaliplatin-Resistenz in der kolorektalen Karzinomzelllinie HCT116 war durch Depletion von HIF-1 α zu überwinden (*Roberts DL et al., 2009*). Diese Ergebnisse deuten auf einen positiven Zusam-

²⁷ Abkürzung für Hypoxia-inducible factor.

menhang zwischen der Expression von HIF-1 α und der Resistenzbildung gegenüber Chemotherapeutika hin. Auch ein Mangel an versorgenden Blutgefäßen (Kapitel 1.4) kann zu einer „strukturdeterminierten“ Resistenz beitragen, da die verringerte Eindringtiefe von Oxaliplatin in den soliden Tumor dazu führt, dass in bestimmten Bereichen im Tumor die lokalen Spiegel an Oxaliplatin keine zelltoxische Wirkung erreichen (*Roberts DL et al., 2009*).

In dieser Arbeit konnte DSR bei 5 % a für kolorektale Karzinomzellen und Fibroblasten gezeigt werden. Zusätzlich kann eine Beteiligung von tumorphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen an DSS nicht ausgeschlossen werden. Inwieweit hierbei HIF-1 α (Kapitel 1.4) involviert ist, bleibt weiterführenden Arbeiten vorbehalten.

7 Ausblick

In dieser Arbeit wurde das in der Literatur beschriebene Phänomen der DSR («*differential stress resistance*») auch für Zellen des kolorektalen Karzinoms gegenüber dem antiproliferativen Effekt von 5-FU gezeigt. Ein wesentlicher Beitrag, den diese Arbeit zu diesem Thema leisten konnte, war, dass DSR nicht ausschließlich durch einen Mangel an Nährstoffen (Glukose) und Wachstumsfaktoren ausgelöst wird, sondern dass auch die Konzentration an Sauerstoff an DSR beteiligt zu sein scheint, wobei die grundlegenden Mechanismen noch unbekannt sind. So konnte ein differenziertes Ansprechen von kolorektalen Karzinomzellen und Fibroblasten auf 5-FU bei 21 % Sauerstoff, sowie eine erhöhte Empfindlichkeit der kolorektalen Karzinomzellen zusätzlich eindeutig bei 5 % Sauerstoff und einem Mangel an Glukose und Wachstumsfaktoren (Mangelmedium) gezeigt werden. Andererseits scheinen Sauerstoffkonzentrationen, die sich in Richtung Hypoxie bewegen, wie die hier getestete Konzentration von 1 % Sauerstoff, nicht dazu beitragen, DSR in kolorektalen Karzinomzellen auszulösen.

Vermutlich scheint an der Steuerung von DSR auch der sauerstoffabhängige Transkriptionsfaktor HIF-1 α beteiligt zu sein. Sein möglicher Einfluss auf DSR sollte auf jeden Fall in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Methoden des »genome editing« wie spezifische HIF-1 α siRNA stellen hierfür sicherlich wichtige Tools dar.

Auch die Bedeutung des Peptidhormons IGF-1 für die Ausbildung von DSR wird diskutiert (Kapitel 1.3). IGF-1 ähnelt in seiner Struktur dem Insulin und ist als Aktivator mitogener intrazellulärer Signalwege an der Regulation der Zellproliferation beteiligt. Der Beitrag von IGF-1 auf die Ausbildung von DSR auch in Kombination mit HIF-1 α wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und sollte deshalb weiterführenden Arbeiten vorbehalten sein.

8 Zusammenfassung

Chemotherapeutika stellen nach wie vor eine der wichtigsten Behandlungsoptionen bei Krebs dar. Ihre akuten und chronischen Nebenwirkungen aber limitieren ihre Anwendung. Aktuelle klinische Studien deuten auf einen positiven Effekt von Kurzzeitfasten auf die Nebenwirkungen von Chemotherapeutika hin. Eine Erklärung hierfür könnte das unterschiedliche Ansprechen von normalen und malignen Zellen auf Chemotherapeutika in einer Mangelsituation sein, das als »*differential stress resistance*« (DSR) bezeichnet wird. Dieses Phänomen lässt nicht-maligne Zellen bei Restriktion von Glukose und Wachstumsfaktoren weniger sensitiv auf Chemotherapeutika reagieren als maligne Zellen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob ein Mangel an Glukose und Wachstumsfaktoren das Ansprechen nicht transformierten Zellen 5-FU abschwächen kann während das von kolorektalen Karzinomzellen (Colo741, LS174T, HCT116, HT29 und SW620) gleichbleibt.

Optimale Kulturbedingungen für Tumorzellen *in vitro* stellen 11 mmol/l Glukose und 10 % FCS dar, während 3 mmol/l Glukose und 1 % FCS Mangelbedingungen repräsentieren. Glukosewerte von 3 mmol/l werden auch mit Kurzzeitfasten erreicht. Da der Großteil der soliden Tumoren mit Sauerstoff unterversorgt ist, wurden Untersuchungen auch bei tumorphysiologischen Sauerstoffbedingungen von u. a. 5 % durchgeführt. Der antiproliferative Effekt von 5-FU wurde als halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für eine Kulturdauer von 72 Stunden bestimmt.

Im Mangelmedium mit 3 mmol/l Glukose und 1 % FCS verstärkte sich der antiproliferative Effekt von 5-FU bei drei der fünf getesteten kolorektalen Karzinomzelllinien in Gegenwart von 5 % Sauerstoff im Vergleich zum Standardmedium mit 11 mmol/l Glukose und 10 % FCS. Die Unterschiede in den IC_{50} -Werten für 5-FU bei diesen drei Zelllinien (Colo741, HCT116, HT29) waren signifikant und bei den beiden anderen Zelllinien (LS174T, SW620) zeigten sich Tendenzen. Dagegen nahm bei Fibroblasten der antiproliferative Effekt von 5-FU

im Mangelmedium ab, die Zellen waren somit besser vor dem Chemotherapeutikum geschützt.

Eine Restriktion von Glukose und Wachstumsfaktoren verändert den antiproliferativen Effekt von 5-FU bei kolorektalen Karzinomzellen nicht und verringert den der Fibroblasten. Damit zeigen die Zellen das Phänomen der »differential stress resistance« (DSR), dass bei 5 % und 21 % Sauerstoff beobachtet wurde, nicht aber bei und 1 % Sauerstoff. Bei 5 % Sauerstoff wurde bei 3/5 Zelllinien sogar ein besseres Ansprechen auf 5-FU nachgewiesen. Der Einfluss von Sauerstoff auf die »differential stress resistance« ist bisher wenig untersucht und basiert vermutlich auf HIF-1 α -abhängige intrazelluläre Signalwege. Die Bedeutung von Sauerstoff und seinem Transkriptionsfaktor HIF-1 α für DSR ist bisher nicht verstanden und sollte deshalb weiter untersucht werden.

9 Literaturverzeichnis

- Abumrad NN, Kim S, Molina PE. Regulation of gut glutamine metabolism: role of hormones and cytokines. *Proc Nutr Soc.* 1995; 54(2): 525-33
- Aschele C, Bergamo F, Lonardi S. Chemotherapy for operable and advanced colorectal cancer. *Cancer Treat Rev.* 2009; 35(6):509-16
- Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 2009; 19(5): 329-37
- Barach AL, Bickerman HA. The effect of anoxia on tumor growth with special reference to sarcoma 180 implanted in C57 mice. *Cancer Res.* 1954; 14(9):672-6
- Barron CC, Bilanb PJ, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism.* 2016; 65(2): 124-39
- Bauersfeld SP, Kessler CS, Wischnewsky M, Jaensch A, Steckhan N, Stange R, Kunz B, Brückner B, Sehouli J, Michalsen A. The effects of short-term fasting on quality of life and tolerance to chemotherapy in patients with breast and ovarian cancer: a randomized cross-over pilot study. *BMC Cancer.* 2018;18(1):476
- Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(12): 967-75
- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004; 18; 432(7015): 332-7
- Bishop NA, Guarente L. Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nature Reviews Genetics.* 2007; 8(11): 835-44
- Blagosklonny MV, Darzynkiewicz Z. Cyclotherapy: Protection of normal cells and unshielding of cancer cells. *Cell Cycle.* 2002; 1: 375-382
- Blagosklonny MV, Pardee AB. Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells. *Cancer Res.* 2001; 61: 4301-5
- Blumenson LE, Bross ID. A possible mechanism for enhancement of increased production of tumor angiogenic factor. *Growth.* 1976; 40(3): 205-9
- Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia and cancer. *J Mol Med (Berl).* 2007; 85(12): 1301-7
- Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet.* 2014; 383(9927):1490-502
- Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 1998;58(7):1408-16
- Calvo MB, Figueroa A, Pulido EG, Campelo RG, Aparicio LA. Potential role of sugar transporters in cancer and their relationship with anticancer therapy. *Int J Endocrinol.* 2010; 2010
- Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillion C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* 2011; 15(6):1239-53

- Carrillo E, Navarro SA, Ramírez A, García MÁ, Griñán-Lisón C, Perán M, Marchal JA. 5-Fluorouracil derivatives: a patent review (2012-2014). *Expert Opin Ther Pat.* 2015; 25(10): 1131-44
- Chang Q, Qin R, Huang T, Gao J, Feng Y. Effect of antisense hypoxia-inducible factor 1alpha on progression, metastasis, and chemosensitivity of pancreatic cancer. *Pancreas.* 2006; 32(3): 297-305
- Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res.* 2008; 6(10): 1521-33
- Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science.* 2009; 325: 201-4
- Colman RJ, Beasley TM, Kemnitz JW, Johnson SC, Weindruch R, Anderson RM. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun.* 2014; 5: 3557
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008; 7(1): 11-20
- Di Biase S, Longo VD. Fasting-induced differential stress sensitization in cancer treatment. *Mol Cell Oncol.* 2015;3(3):e1117701
- Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocakova I, Ruff P, Blasinska-Morawiec M, Smakal M, Canon JL, Rother M, Oliner KS, Tian Y, XU F, Sidhu R. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2014; 25(7): 1346-55
- Evans SM, Hahn SM, Margarelli DP, Koch CJ. Hypoxic Heterogeneity in Human Tumors. EF5 Binding, Vasculature, Necrosis, and Proliferation. *Am J Clin Oncol (CCT)* 2001; 24(5): 467-472
- Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span - from yeast to humans. *Science.* 2010; 328(5976): 321-6
- Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell.* 2007; 129(1): 111-22
- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Canc.* 2004; 4(11): 891-9
- Gatenby RA, Moldofsky PJ, Weiner LM. Metastatic colon cancer: correlation of oxygen levels with I-131 F(ab')₂ uptake. *Radiology.* 1988; 166(3): 757-9.
- Goldhamer A, Lisle D, Parpia B, Anderson SV, Campbell TC. Medically supervised water-only fasting in the treatment of hypertension. *J Manipulative Physiol Ther.* 2001;24(5):335-9

- Grady WM, Pritchard CC. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol Pathol.* 2014; 42(1): 124-39
- 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(6560): 88-91
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646-74
- Harris AL. Hypoxia — a key regulatory factor in tumor growth. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(1): 38-47
- Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooten D, Griesbach L, Duschinsky R, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor inhibitory compounds. *Nature* 1957; 179: 663-6
- Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 9361-9374
- Isley WL, Underwood LE, Clemmons DR. Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in humans. *J Clin Invest.* 1983; 71(2): 175-82
- Khanna R, Anger C. Patterns of patients stopping their anti-cancer drug due to its associated side effects in France, Germany, Italy, Spain and UK (EU5). ESMO 2014; Abstract 7322. *Annals of Oncology* 2014: 1-41. 10.1093/annonc/mdu438
- Kim SK, Demetri GD. Chemotherapy and neutropenia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1996; 10: 377-95
- Klein TJ, Glazer PM. The tumor microenvironment and DNA-repair. *Semin Radiat Oncol.* 2010; 20(4): 282-87
- Krebs HA. Otto Heinrich Warburg, 1883-1970. *Biogr Mem Fellows R Soc.* 1972; 18:629-99
- Kristan DM. Calorie restriction and susceptibility to intact pathogens. *Age (Dordr).* 2008; 30:147-56
- Kumar H, Choi DK. Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 584758
- Lau TK, Yip CH, Yeo W. State of the Art Antiemetic Therapy for Cancer Patients. *Curr Oncol Rep.* 2016; 18(1): 2
- Lee C, Longo VD. Fasting vs dietary restriction in cellular protection and cancer treatment: from model organisms to patients. *Oncogene.* 2011; 30: 3305-16
- Lee C, Raffaghello L, Brandhorst S, Safdie FM, Bianchi G, Martin-Montalvo A, Pistoia V, Wei M, Hwang S, Merlino A, Emionite L, de Cabo R, Longo VD. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Sci Transl Med.* 2012; 7;4(124): 124ra27
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.0, 2017, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 29.06.2018].

- Levine ME, Suarez JA, Brandhorst S, Balasubramanian P, Cheng CW, Madia F, Fontana L, Mirisola MG, Guevara-Aguirre J, Wan J, Passarino G, Kennedy BK, Wei M, Cohen P2, Crimmins EM, Longo VD. Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. *Cell Metab.* 2014; 19(3): 407-417
- Li XX, Liang L, Huang LY, Cai SJ. Standard chemotherapy with cetuximab for treatment of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(22): 7022-35
- Longo VD, Mattson MP. Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Cell Metab.* 2014; 19(2): 181-92
- Madia F, Gattazzo C, Wei M, et al. Longevity mutation in SCH9 prevents recombination errors and premature genomic instability in a Werner/Bloom model system. *J Cell Biol.* 2008; 180: 67-81
- Mangili G, Petrone M, Gentile C, De Marzi P, Viganò R, Rabaiotti E. Prevention strategies in palmar-plantar erythrodysesthesia onset: the role of regional cooling. *Gynecol Oncol.* 2008; 108(2): 332-5
- Marhohm E, Cohen I. Fertility preservation options for women with malignancies. *Obstet Gynecol Surv.* 2007; 62: 58–72
- Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gate- keeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene* 2006; 25: 4777-86
- Mayer A, Vaupel P. Hypoxia, lactate accumulation, and acidosis: siblings or accomplices driving tumor progression and resistance to therapy? *Adv Exp Med Biol.* 2013; 789: 203-9.
- McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr.* 1935; 10: 63-79
- Møller N, Jørgensen JO. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocr Rev.* 2009 (2): 152-77
- Morton LM, Onel K, Curtis RE, Hungate EA, Armstrong GT. The rising incidence of second cancers: patterns of occurrence and identification of risk factors for children and adults. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2014: e57-67
- Müller M, Schindler E, Roth S, Schürholz A, Vollerthun M, Hempelmann G. Effects of desflurane and isoflurane on intestinal tissue oxygen pressure during colorectal surgery. *Anaesthesia.* 2002; 57(2): 110-5
- Müller M, Schück R, Erkens U, Sticher J, Haase C, Hempelmann G. Effects of lumbar peridural anesthesia on tissue pO₂ of the large intestine in man. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 1995; 30(2): 108-10
- Murakami S. Stress resistance in long-lived mouse models. *Exp Gerontol.* 2006; 41:1014–9
- Newman NB, Sidhu MK, Baby R, Moss RA, Nissenblatt MJ, Chen T, Lu SE, Jabbour SK. Long-Term Bone Marrow Suppression During Postoperative Chemotherapy in Rectal Cancer

- Patients After Preoperative Chemoradiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016; 94(5): 1052-60
- Nickerson NK, Mill CP, Wu HJ, Riese DJ 2nd, Foley J. Autocrine-derived epidermal growth factor receptor ligands contribute to recruitment of tumor-associated macrophage and growth of basal breast cancer cells in vivo. *Oncol Res.* 2013; 20(7): 303-17
- Partridge SE, Aquino-Parsons C, Luo C, Green A, Olive PL. A pilot study comparing intratumoral oxygenation using the comet assay following 2.5% and 5% carbogen and 100% oxygen. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 49(2): 575-80
- Perer ES, Madan AK, Shurin A, Zakris E, Romeguera K, Pang Y, Beech DJ. Insulin-like growth factor I receptor antagonism augments response to chemoradiation therapy in colon cancer cells. *J Surg Res.* 2000; 94(1): 1-5
- Pohl M, Schmiegel W. Therapeutic Strategies in Diseases of the Digestive Tract - 2015 and Beyond Targeted Therapies in Colon Cancer Today and Tomorrow. *Dig Dis.* 2016; 34(5): 574-9
- Racker E. Mol Cell Biochem. History of the Pasteur effect and its pathobiology. *Mol.Cell.Biochem.* 1974; 5(1-2): 17-23
- Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, Longo VD. Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 2008; 105(24): 8215-20
- Raffaghello L, Safdie F, Bianchi G, Dorff T, Fontana L, Longo VD. Fasting and differential chemotherapy protection in patients. *Cell Cycle.* 2010; 9(22): 4474-6
- Reed MJ, Penn PE, Li Y, Birnbaum R, Vernon RB, Johnson TS, et al. Enhanced cell proliferation and biosynthesis mediate improved wound repair in refed, caloric-restricted mice. *Mech Ageing Dev.* 1996; 89: 21-43
- Roberts DL, Williams KJ, Cowen RL, Barathova M, Eustace AJ, Brittain-Dissont S, Tilby MJ, Pearson DG, Ottley CJ, Stratford IJ, Dive C. Contribution of HIF-1 and drug penetrance to oxaliplatin resistance in hypoxic colorectal cancer cells. *Br J Cancer.* 2009; 101(8): 1290-7
- Sasabe E, Zhou X, Li D, Oku N, Yamamoto T, Osaki T. The involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha in the susceptibility to gamma-rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2007; 120(2): 268-77
- Schüller J, Cassidy J, Dumont E, Roos B, Durston S, Banken L, Utoh M, Mori K, Weidekamm E, Reigner B. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000; 45(4): 291-7
- Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med.* 2002; 8(4 Suppl): S62-7. Review
- Shanley DP, Kirkwood TB. Calorie restriction and aging: a life-history analysis. *Evolution* 2000; 54(3): 740-50

- Shay JE, Imtiyaz HZ, Sivanand S, Durham AC, Skuli N, Hsu S, Mucaj V, Eisinger-Mathason TS, Krock BL, Giannoukos DN, Simon MC. Inhibition of hypoxia-inducible factors limits tumor progression in a mouse model of colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2014; 35(5):1067-77
- Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1797(6-7): 1171-7
- Stein ME, Drumea K, Yarnitsky D, Benny A, Tzuk-Shina T. A rare event of 5-fluorouracil-associated peripheral neuropathy: a report of two patients. *American Journal of Clinical Oncology* 1998; 21: 248-49
- Stewart TM, Bhapkar M, Das S, Galan K, Martin CK, McAdams L, Pieper C, Redman L, Roberts S, Stein RI, Rochon J, Williamson DA. Comprehensive Assessment of Long-term Effects of Reducing Intake of Energy Phase 2 (CALERIE Phase 2) screening and recruitment: methods and results. *Contemp Clin Trials* 2013; 34:10-20
- Taormina G, Mirisola MG. Calorie restriction in mammals and simple model organisms. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 308690
- Teicher BA. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 1994; 13(2): 139-68
- Terris DJ, Dunphy EP. Oxygen tension measurements of head and neck cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1994; 120(3): 283-7
- Thermann M, Jostarndt L, Eberhard F, Richter H, Sass W. Oxygen supply of the human small intestine in mechanical ileus *Langenbecks Arch Chir*. 1985; 363(3): 179-84
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin like growth factors. *Endocr Review*. 1994; 15: 80-101
- Thomlinson RH. Hypoxia and tumours. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 1977; 11: 105-13
- Thrall MM, Wood P, King V, Rivera W, Hrushesky W. Investigation of the comparative toxicity of 5-FU bolus versus 5-FU continuous infusion circadian chemotherapy with concurrent radiation therapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000; 46(4): 873-81
- Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(11): 862-71
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 87-108
- Unger RH, Eisentraut AM, Madison LL. The effects of total starvation upon the levels of circulating glucagon and insulin in man. *J Clin Invest*. 1963; 42: 1031-9
- van den Brenk HA, Moore V, Sharpington C, Orton C. Production of metastases by a primary tumour irradiated under aerobic and anaerobic conditions in vivo. *Br J Cancer*. 1972; 26(5): 402-12.
- van den Hurk CJ, Peerbooms M, van de Poll-Franse LV, Nortier JW, Coebergh JW, Breed WP. Scalp cooling for hair preservation and associated characteristics in 1411 chemotherapy patients - results of the Dutch Scalp Cooling Registry. *Acta Oncol*. 2012; 51(4):497-504

- Van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *European Journal of Cancer*. 2004; 40: 939-950
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. *Cancer Research* 1989; 49(23):6449-65
- Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*. 2007; 26(2): 225-39
- Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Höckel M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res*. 1991; 51(12): 3316-22
- Verdaguer H, Tabernero J, Macarulla T. Ramucirumab in metastatic colorectal cancer: evidence to date and place in therapy. *Ther Adv Med Oncol*. 2016; 8(3): 230-42
- Warren HR, Hejmadi M. Effect of hypoxia on chemosensitivity to 5-fluorouracil in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioscience Horizons* 2016 9: hzw005
- Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, Guthrie D. The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J. Nutr*. 1986; 116(4):641-54
- Werbrouck BF, Pauwels WJ, De Bleecker JL. A case of 5-fluorouracil-induced peripheral neuropathy. *Clin Toxicol (Phila)*. 2008; 46(3): 264-6
- Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med*. 2004; 10(2):145-7
- Yoshida S, Ito D, Nagumo T, Shirota T, Hatori M, Shintani S. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest. *Oral Oncol*. 2009; 45(2): 109-15
- Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Dec;85(24):9533-7
- Zahner J. Fatigue and exhaustion in tumor patients. Etiology, diagnosis and treatment possibilities. *Med Klin (Munich)*. 2000; 95(11): 613-7
- Zhao C, Zhang Q, Yu T, Sun S, Wang W, Liu G. Hypoxia promotes drug resistance in osteosarcoma cells via activating AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling. *J Bone Oncol*. 2016; 5(1): 22-9
- 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(22): 5830-5

10 Appendix

Tabelle 10.1: Glukoseverbrauch und Laktatbildung durch Karzinomzellen im Standard-medium. Die Daten sind in $\mu\text{mol/l}$ pro Zelle angegeben für einen Versuch mit zwei technischen Replikaten pro Zelllinie und Sauerstoffkonzentration. Die Messwerte wurden auf die Anzahl vitaler Zellen bei Versuchsende nach 72 Stunden mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. In Ergänzung zu Tabelle 4.2.

Zelllinie	Glukoseverbrauch			Laktatbildung		
	21 % O ₂	5 % O ₂	1 % O ₂	21 % O ₂	5 % O ₂	1 % O ₂
Colo741	44,7 ± 1,8	54,4 ± 4,10	139,1 ± 9,40	95,7 ± 1,8	123,2 ± 4,1	304,6 ± 4,7
LS174T	84,4 ± 2,3	51,3 ± 3,5	146,0 ± 4,5	159,3 ± 29,5	124,7 ± 3,5	290,1 ± 4,8
HCT116	50,5 ± 1,8	59,9 ± 3,3	142,9 ± 4,8	98,3 ± 1,8	124,4 ± 6,5	302,7 ± 4,8
HT29	68,7 ± 2,5	10,2 ± 3,6	78,7 ± 5,6	135,6 ± 5,1	35,6 ± 3,6	181,1 ± 11,1
SW620	47,9 ± 2,0	37,9 ± 3,8	95,1 ± 5,4	95,8 ± 4,0	70,5 ± 3,8	228,1 ± 5,4

Tabelle 10.2: Glukoseverbrauch und Laktatbildung durch Karzinomzellen im Mangel-medium. Die Daten sind in $\mu\text{mol/l}$ pro Zelle angegeben für einen Versuch mit zwei technischen Replikaten pro Zelllinie und Sauerstoffkonzentration. Die Messwerte wurden auf die Anzahl vitaler Zellen bei Versuchsende nach 72 Stunden mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. In Ergänzung zu Tabelle 4.2.

Zelllinie	Glukoseverbrauch			Laktatbildung		
	21 % O ₂	5 % O ₂	1 % O ₂	21 % O ₂	5 % O ₂	1 % O ₂
Colo741	50,8 ± 3,6	48,3 ± 6,8	127,8 ± 7,9	114,3 ± 3,6	111,1 ± 13,7	294,4 ± 7,9
LS174T	54,7 ± 7,4	34,3 ± 6,1	160,6 ± 10,3	117,2 ± 3,7	77,3 ± 6,1	372,3 ± 10,3
HCT116	47,5 ± 3,0	22,3 ± 5,3	116,0 ± 15,6	97,1 ± 3,0	66,9 ± 5,3	270,7 ± 7,8
HT29	60,7 ± 4,1	30,7 ± 6,2	132,9 ± 9,9	127,3 ± 4,1	78,9 ± 6,2	300,7 ± 9,9
SW620	62,7 ± 9,5	30,2 ± 5,3	140,8 ± 10,0	122,0 ± 3,6	79,2 ± 5,3	338,0 ± 10,0

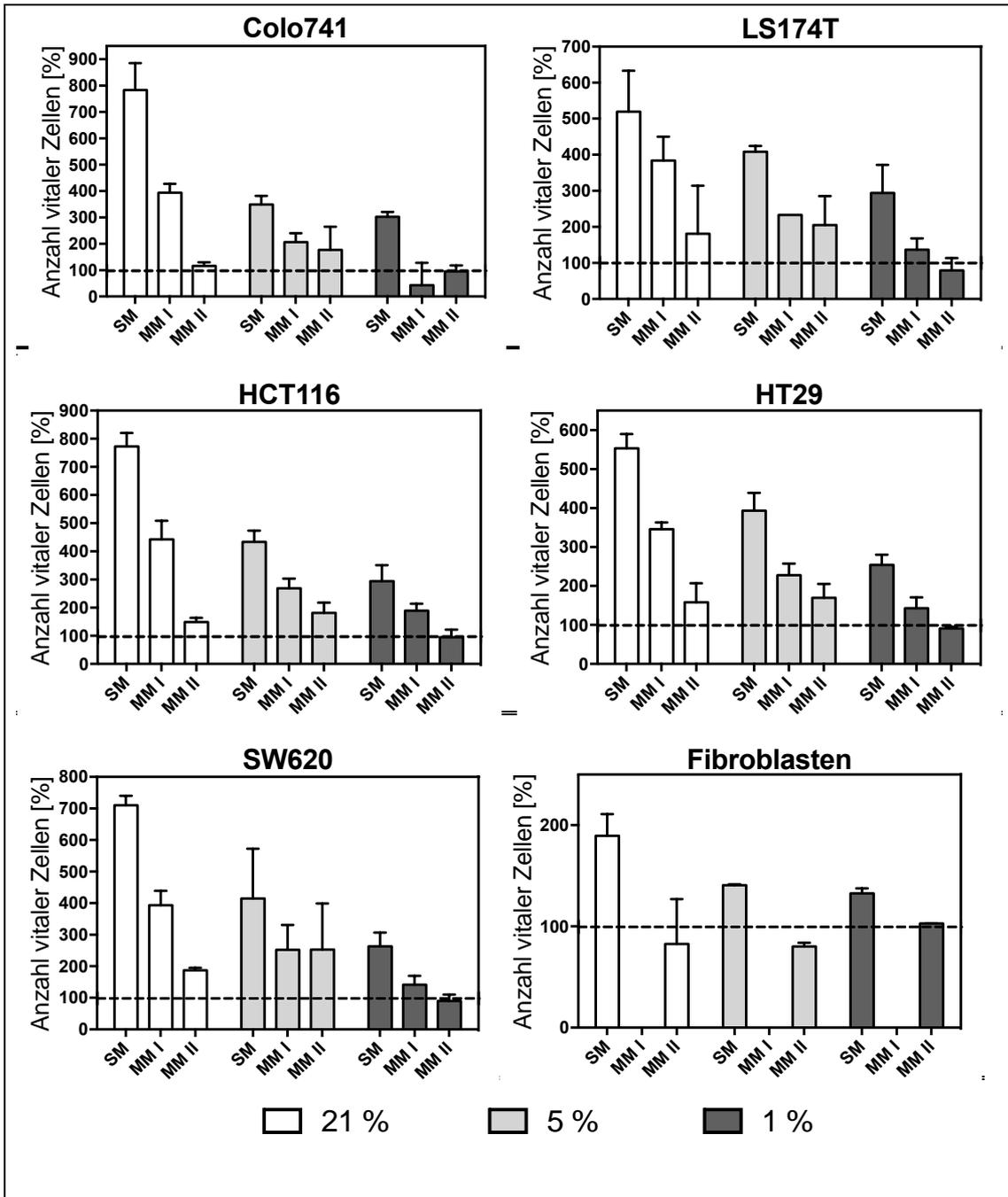


Abbildung 10.1: Vergleich der Zellproliferation von Karzinomzellen und Fibroblasten. Die Zellen wurden bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (21 %, 5 %, 1 %) im Standardmedium (SM), Mangelmedium I (MM I) und Mangelmedium II (MM II) für 72 Stunden inkubiert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und als Mittelwert \pm Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Aussaat ($=1 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen; hier: Querlinie) berechnet. Die Messwerte basieren auf drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 3-6 Parallelwerten. Für Fibroblasten im Mangelmedium I wurden keine Daten erhoben.

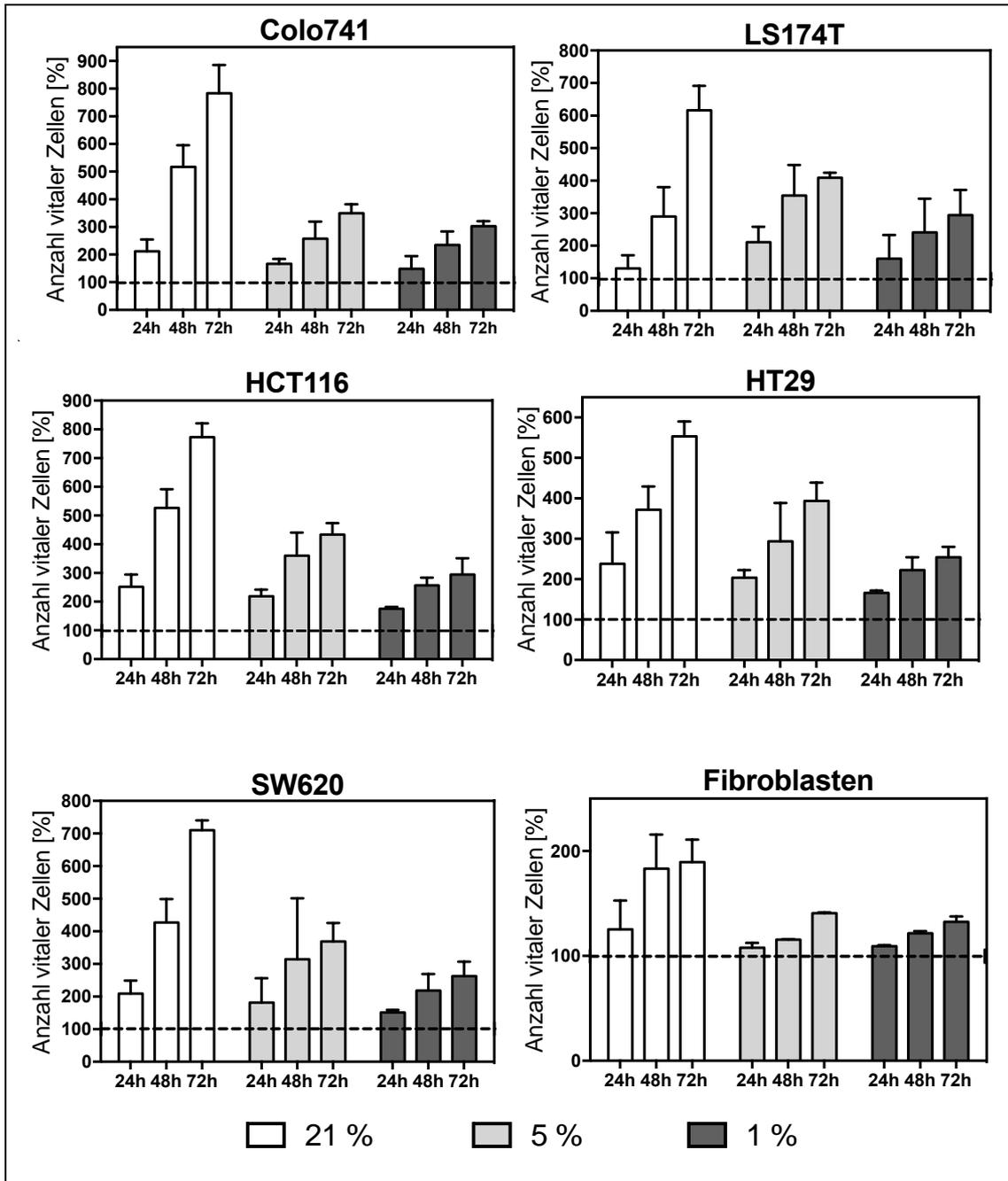


Abbildung 10.2: Die Dynamik des Zellwachstums in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration. Hierzu wurden die fünf kolorektale Karzinomzelllinien Colo741, LS174T, HCT116, HT29, SW620 und Fibroblasten für 24, 48 und 72 Stunden im Standardmedium (siehe Kapitel 3.2) kultiviert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt und als Mittelwert \pm Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Aussaat ($=1 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen; hier: Querlinie) berechnet. Die Messwerte basieren auf drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 3-6 Parallelwerten.

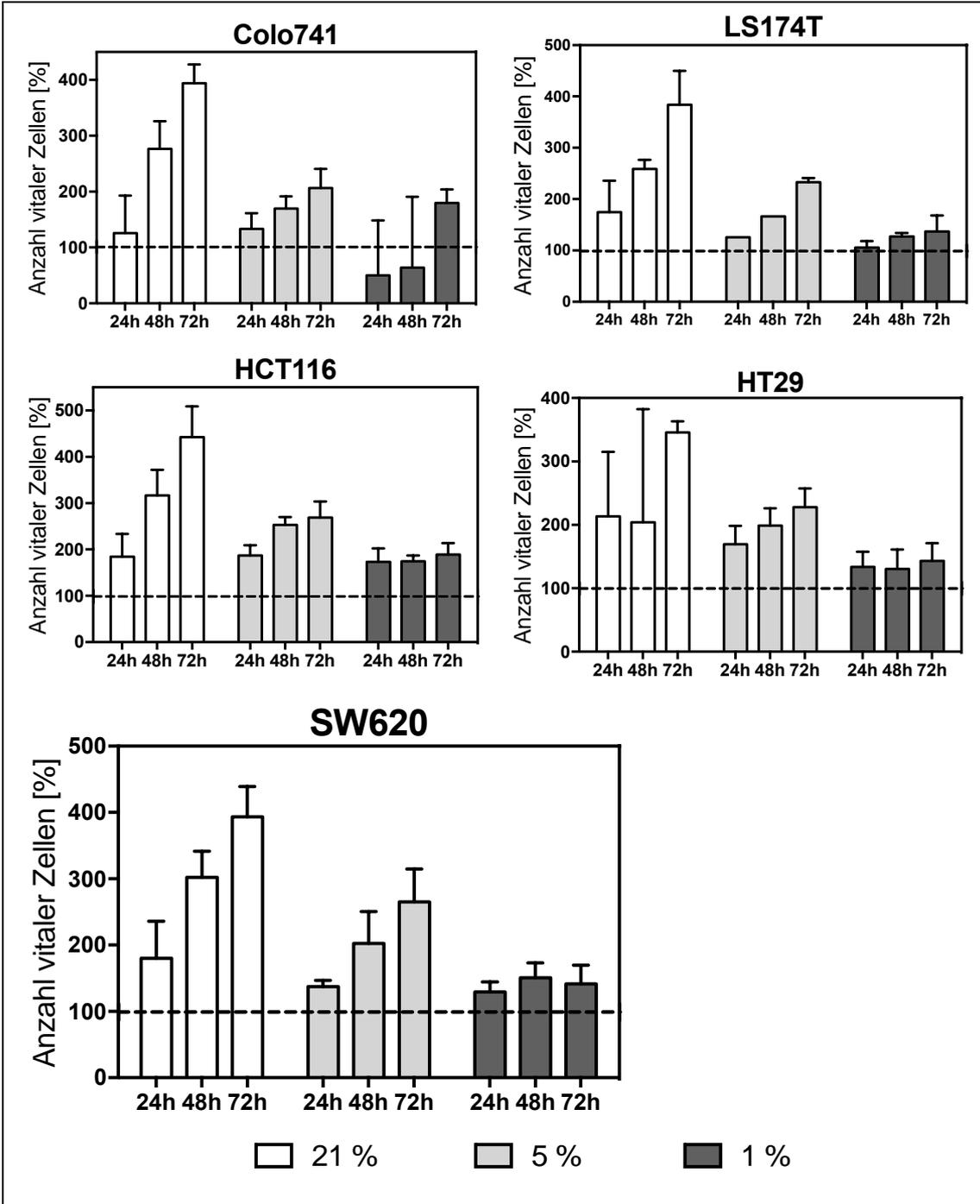


Abbildung 10.3: Die Dynamik der Zellproliferation in Abhängigkeit der verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen bei 3 mmol/l Glukose und 1 % FCS (Mangelmedium I). Hierzu wurden die fünf kolorektalen Karzinomzelllinien Colo741, LS174T, HCT116, HT29, SW620 und Fibroblasten für 24, 48 und 72 Stunden im Mangelmedium (Kapitel 3.2) kultiviert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Kapitel 3.3) und als Mittelwert \pm Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Aussaat ($=1 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen; hier: Querlinie) berechnet. Die Messwerte basieren auf drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 3-6 Parallelwerten.

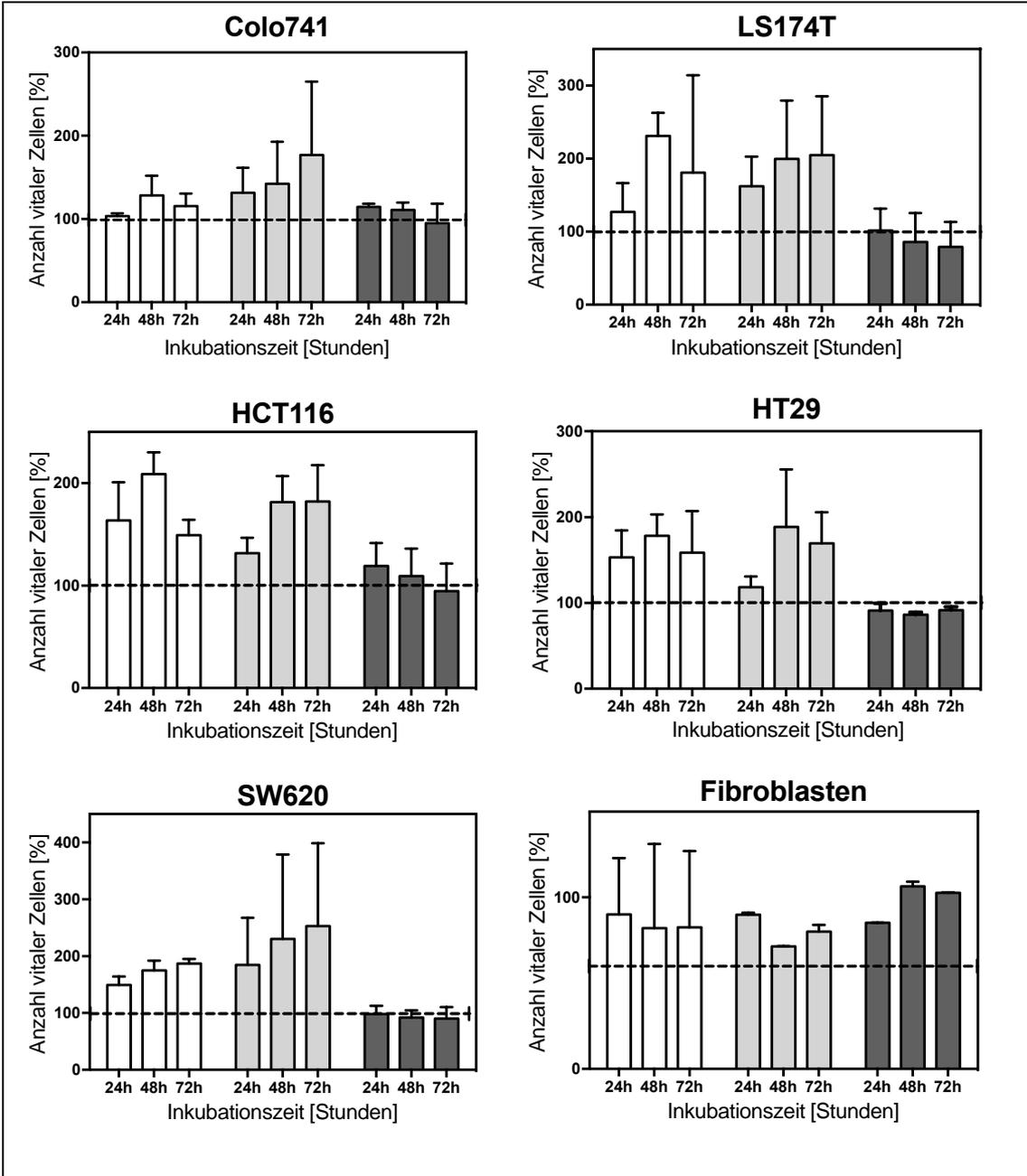


Abbildung 10.4: Zellproliferation im Mangelmedium II. Hierzu wurden die fünf kolorektalen Karzinomzelllinien Colo741, LS174T, HCT116, HT29, SW620 und Fibroblasten für 24, 48 und 72 Stunden bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen im Mangelmedium II (siehe Kapitel 3.2) kultiviert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt (Kapitel 3.3) und als Mittelwert \pm Standardabweichung in Prozent bezogen auf die Aussaat ($=1 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung einer Zellkulturschale mit 96 Vertiefungen; hier: Querlinie) berechnet. Die Messwerte basieren auf drei unabhängigen Versuchen mit jeweils 3-6 Parallelwerten.

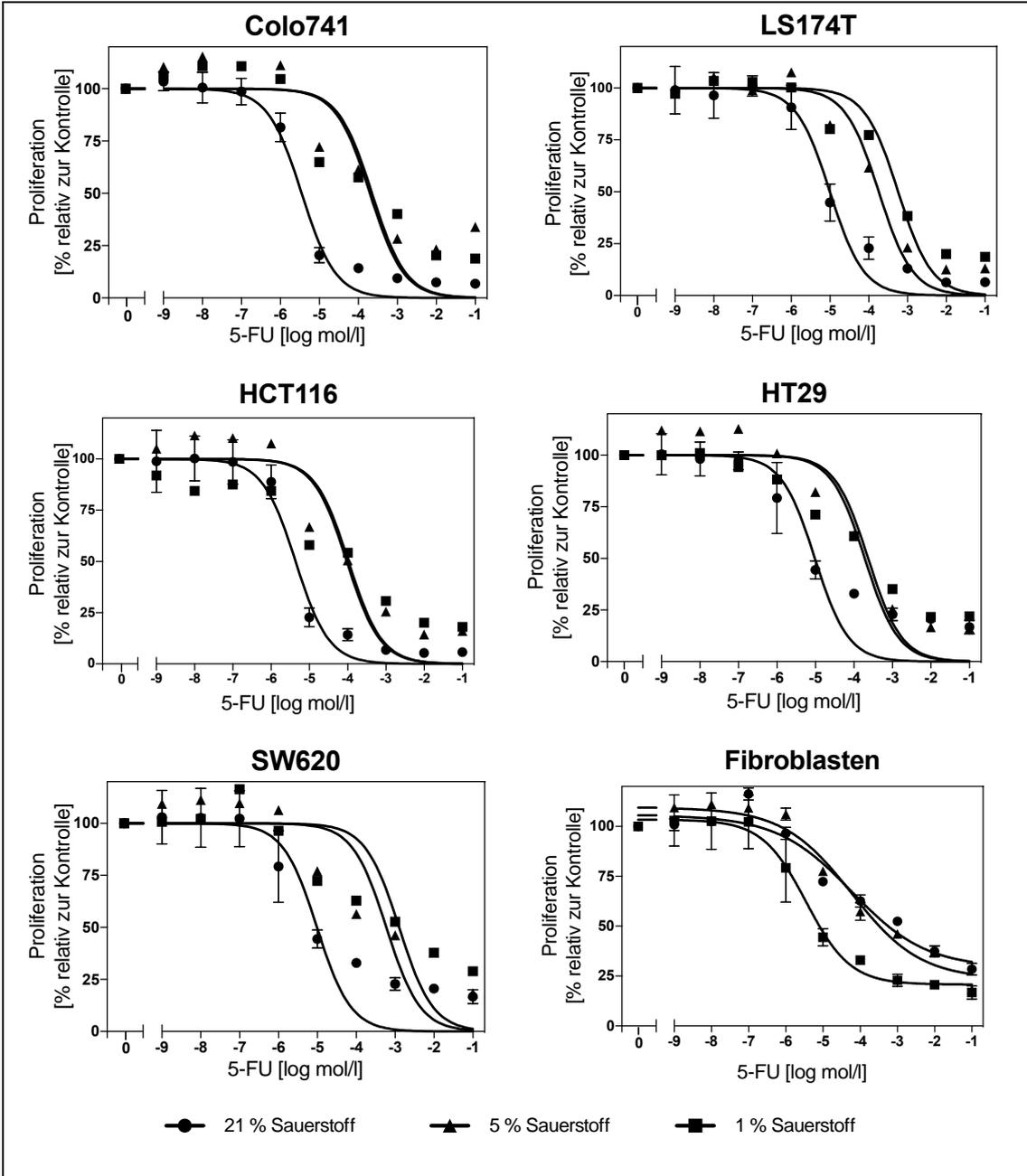


Abbildung 10.5: Bestimmung des antiproliferativen Effekts (IC₅₀) von 5-FU bei 21 %, 5 % und 1 % Sauerstoff im Standardmedium (Kapitel 3.2). Die Zellen wurden mit 5-FU in den angegebenen Konzentrationen für 72 Stunden inkubiert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett-Assay bestimmt. Grafische Auswertung und Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgten mit dem Computerprogramm „GraphPad Prism 7.0“. In Ergänzung zu Abbildung 3.1.

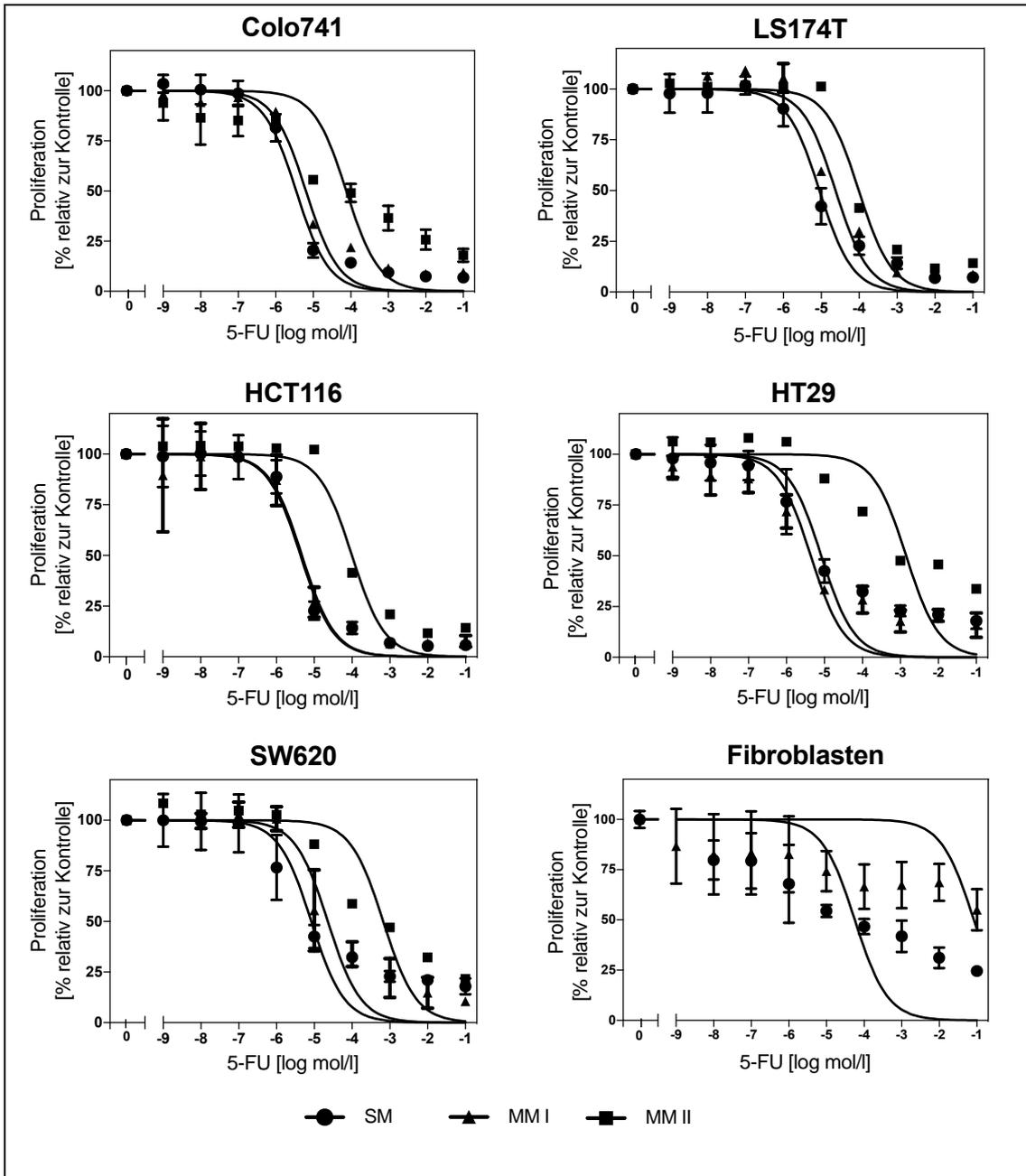


Abbildung 10.6: Bestimmung des antiproliferativen Effektes von 5-FU (IC_{50}) bei 21% Sauerstoff in Standard (SM)- und Mangelmedium I (MM I) und II (MM II). Die Zellen wurden mit 5-FU in den angegebenen Konzentrationen für 72 Stunden inkubiert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit dem Kristallviolett Assay bestimmt. Grafische Auswertung und Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgten mit dem Computerprogramm „GraphPad Prism 7.0“.

Publikationsverzeichnis

Diese Arbeit wurde bei den 20. Chirurgischen Forschungstagen in Magdeburg, 08.-10. Sept. 2016, vorgestellt und liegt als publiziertes Abstract vor:

C. Barth, B. Mühling, M. Hofmann, S. Gahn, M. Camara, A. Wiegering, C.-T. Germer, C. Otto. Glucose restriction increases the antiproliferative response of colorectal carcinoma cells (CRC) to 5-Fluorouracil (5FU). *Eur Surg Res* 2016; 57: 295. doi: 10.1159/000448816.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Experimentellen Chirurgie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg der Julius-Maximilians-Universität angefertigt. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes möchte ich mich ganz herzlich beim Direktor der Klinik Herrn Prof. Dr. med. C.-T. Germer bedanken.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Otto für die Überlassung des Themas, für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen sowie für seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Seine wertvollen Ratschläge und zahlreichen konstruktiven Diskussionen haben diese Doktorarbeit möglich gemacht.

Den Mitarbeitern und Doktoranden der Experimentellen Chirurgie danke ich für die freundliche Unterstützung sowie das angenehme Arbeitsklima.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern und Schwestern.

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHES

Carolina Jeanne Maria Barth

BERUF

ab 03/2017 **Klinikum der Universität München**
Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe

AUSBILDUNG

02/2016 – 03/2017 **Julius-Maximilians-Universität Würzburg**
Promotionsstudium

11/2014 – 11/2015 **Charité Universitätsmedizin Berlin**
Studienfach: Humanmedizin
Abschluss: Staatsexamen Medizin, Note: „gut“

04/2009 – 11/2014 **Julius-Maximilians-Universität Würzburg**
Studienfach: Humanmedizin

09/2012 – 03/2013 **Universidad Complutense de Madrid, Spanien**
Studienfach Humanmedizin

09/2008 – 03/2009 **Rettungsdienstschule München**
Ausbildung zum Rettungssanitäter

2006 – 2008 **Sutton Park School Dublin, Irland**
August 2008 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

München, den 13. Juli 2018