

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie
der Universität Würzburg
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler**

**Methionin-Restriktion als neue Strategie in der
Tumorthherapie des HNSCC**

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

**vorgelegt von
Dr. med. dent. Sebastian Gubik
aus Würzburg**

Würzburg, Juni 2022

Referent: Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

Korreferent: Professor Dr. rer. nat. Thomas Müller

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2023

Der Promovend ist Arzt und Zahnarzt.

Für Cordelia und Rosalie

1	Einleitung.....	1
1.1	Tumore im Kopf-Hals-Bereich.....	1
1.1.1	Entstehung und klinische Manifestation des HNSCC.....	1
1.1.2	Risikofaktoren für das HNSCC	2
1.1.3	Polymodales Therapiekonzept und Prognose des HNSCC	3
1.2	Tumorentstehung im Allgemeinen.....	4
1.3	Energie-Metabolismus in Tumorzellen	5
1.3.1	Der Warburg-Effekt.....	5
1.3.2	Ursachen des Warburg-Effekts.....	6
1.4	Energie-Restriktion.....	8
1.4.1	Die Proteinrestriktion als potentielle Tumorthherapie	10
1.4.2	Aminosäurerestriktion als potentielle Tumorthherapie	10
1.5	Low-Energy-Metabolismus durch Methionin-Restriktion.....	13
1.6	Ausblick – CRM und Methionin-Analoga.....	17
1.7	Ziel dieser Arbeit.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Material	20
2.1.1	Zelllinien und Zellkulturmedien	20
2.1.2	Reagenzien, Chemikalien	21
2.1.3	Antikörper	21
2.1.4	Kommerzielle Kits.....	22
2.1.5	Primer.....	22
2.1.6	Lösungen und Puffer.....	22
2.1.7	Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	25
2.2.2	Zellzählung	25
2.2.3	Zytotoxizitäts-Assay	25
2.2.4	Lysate für Western-Blot	26
2.2.5	SDS-PAGE.....	26
2.2.6	Western-Blot	26
2.2.7	RNA-Isolation	27
2.2.8	cDNA-Synthese	27
2.2.9	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction.....	28
2.2.10	Messung der Interleukin-8-Konzentration	28
2.2.11	Statistik.....	29
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Zellproliferation in Abhängigkeit von der Methionin-Konzentration.....	31
3.2	Analyse der Zellproliferation unter Methionin-Restriktion	32
3.3	Analyse der Auswirkungen der FCS-Konzentration auf die Proliferation unter Methionin-Restriktion	35
3.4	Betrachtung der Autophagie-Induktion unter Methionin-Restriktion.....	42
3.5	Analyse der Genexpression ausgesuchter Gene mittels RT-PCR unter Methionin-Restriktion.....	43
3.6	Einfluss der Methionin-Restriktion auf die Interleukin-Sekretion	45
3.7	Auswirkung der Methionin-Restriktion auf die Wirksamkeit von Cisplatin.....	47

3.8	Versuche mit Ethionin zur Hemmung der Zellproliferation	50
4	Diskussion.....	52
4.1	Auswirkung auf die Zellproliferation	53
4.2	Auswirkung auf die Autophagie	55
4.3	Auswirkung auf IGF-1 und IGFBP1.....	57
4.4	Auswirkung auf die Interleukin-Synthese.....	57
4.5	Auswirkung auf die Wirksamkeit von Zytostatika	59
4.6	Auswirkung der Methionin-Analoga	60
5	Zusammenfassung.....	62
6	Literaturverzeichnis	64
Appendix		
I	Abkürzungsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Danksagung	
V	Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Tumore im Kopf-Hals-Bereich

Krebserkrankungen gelten laut des World Cancer Reports 2020 in den meisten Ländern als zweithäufigste Ursache für ein verfrühtes Versterben nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Verglichen mit 2018 wird zudem für das Jahr 2040 ein Anstieg der Krebsinzidenz um bis zu 50% erwartet.¹ Die Vereinten Nationen nehmen zu dieser Prognose im Bericht „The 2030 Agenda For Sustainable Development“ Stellung. In der Agenda proklamieren sie das Ziel, die verfrühten Todesfälle um ein Drittel bis zum Jahr 2030 zu reduzieren.² Angesichts der Prognosen des World Cancer Reports stellt dieses Ziel eine große Herausforderung für die Tumorforschung dar.

In den letzten Dekaden sind zahlreiche Fortschritte im Bereich der Tumorforschung gemacht worden. Hierzu zählt zum Beispiel die Entwicklung von Checkpoint-Inhibitoren, wie Pembrolizumab oder Nivolumab. Durch diese Medikamente konnten in Studien sehr gute Erfolge nachgewiesen werden. Allerdings wird auch über Misserfolge dieser vielversprechenden Therapeutika berichtet.³ Folglich bedarf es weiterer intensiver Anstrengung aller wissenschaftlicher Disziplinen, um die ambitionierten Ziele der Vereinten Nationen bis zum Jahr 2030 zu erreichen. In dieser Arbeit wird der Fokus auf Tumore der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (MKG) gelegt. In dieser Region manifestieren sich sowohl benigne als auch maligne Tumorentitäten. Als Beispiele sind unter anderem das pleomorphe Adenom, das Basaliom oder das maligne Melanom zu nennen.^{4,5} Von zentraler Bedeutung in der MKG ist das Plattenepithelkarzinom (engl. „Head and Neck Squamous Cell Cancer“; HNSCC), das global an siebter Stelle in der Liste maligner Tumorerkrankungen aufgeführt ist.⁶ Die Entstehung und die klinische Manifestation werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

1.1.1 Entstehung und klinische Manifestation des HNSCC

In der Regel entstehen Plattenepithelkarzinome aus Vorstufen, sogenannten Präkanzerosen. Als Präkanzerosen gelten Gewebeveränderungen, die nicht bösartig sind, aber die Tendenz zur Entartung und Krebsentstehung haben. Hierzu zählt z.B. die Leukoplakie, die klinisch als nicht abwischbarer weißer Fleck der Schleimhaut

beschrieben werden kann.⁷ Aus diesen Vorstufen kann sich zunächst ein sogenanntes Carcinoma in situ entwickeln, das sich durch eine noch intakte Basalmembran auszeichnet. Beim Übergang vom Carcinoma in situ in ein invasives Tumorstadium durchbrechen die Tumorzellen die Basalmembran. Klinisch imponiert das Plattenepithelkarzinom als exophytisch- oder endophytisch-ulzerierende Läsion. Die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle lassen sich in verhornende, nicht verhornende und entdifferenzierte Karzinome unterscheiden. Sie weisen alle Kriterien der Malignität auf: sie wachsen infiltrierend und destruierend. In der Regel metastasieren sie zunächst in die lokoregionären Lymphknoten. Eine Fernmetastasierung ist außerdem möglich. In diesem Fall sind häufig die Lunge, die Leber und das Knochenmark von Metastasen betroffen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt um das 60. Lebensjahr. In der Regel werden für die Entstehung des HNSCC langjährig einwirkende Noxen als Risikofaktoren verantwortlich gemacht.⁵

1.1.2 Risikofaktoren für das HNSCC

Seit Jahren sind eine schlechte Mundhygiene, sowie Tabak- und Alkoholkonsum als Risikofaktoren bekannt.⁸ Das Risiko an einem HNSCC zu erkranken ist für Menschen mit chronischem Tabak- oder Alkoholkonsum um das 6-fache erhöht. Eine Kombination der beiden Risikofaktoren lässt das Risiko auf das 30-fache ansteigen.^{9,10,11} Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch das Kauen von Tabak oder Betelnüssen – wie es zum Beispiel in Indien praktiziert wird – zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen führt.^{12,11} In den letzten Dekaden wurden vermehrt virale Onkogene als Ursache für die Tumorentstehung ausgemacht. In diesem Zusammenhang spielen vor allem Infektionen mit humanen Papillomaviren (HPV 16 und 18) eine Rolle.^{13,14} HPV-assoziierte HNSCC treten häufig circa 10 bis 30 Jahre nach dem ersten oralen Geschlechtsverkehr auf.^{14,15} Mittlerweile ist bekannt, dass HPV-assoziierte Tumore eine deutlich bessere Prognose haben als HPV-negative. Deshalb wurde die HPV-Assoziation im Jahr 2017 auch in das Klassifikationssystem der AJCC und der UICC des HNSCC aufgenommen.^{16,17}

Interessanterweise hat auch die Ernährung einen Einfluss auf die Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen. Ein übermäßiger Konsum an Fleisch - einem Nahrungsmittel mit hohem Proteinanteil - oder von gebratenem Essen, gilt als Risikofaktor in der

Krebsentstehung.^{11,18} Hingegen wird eine mediterrane Ernährung als tumorprotektiv angesehen, wobei Zitrusfrüchte, Gemüse, Olivenöl und Fischöl einen besonders positiven Effekt haben.^{11,19}

Vor der Therapie des HNSCC erfolgt eine umfangreiche Diagnostik, die von der körperlichen Untersuchung über bildgebende und endoskopische Verfahren bis hin zu einer Biopsie reicht. In Deutschland erfolgt üblicherweise anhand dieser Informationen die Einteilung bzw. das Staging des Tumors in das TNM-Klassifikationssystem. Die Abkürzung beschreibt den Primärtumor (T), den Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M). Im Rahmen eines Tumorboards erfolgt die Therapieplanung der Behandlung. Abhängig von der Tumorentität wird bei der Therapie ein interdisziplinäres und polymodales Behandlungsschema verfolgt.²⁰

1.1.3 Polymodales Therapiekonzept und Prognose des HNSCC

Im Zuge der Behandlung des HNSCC wurden über die letzten Jahrzehnte unterschiedliche systemische Therapiestrategien untersucht.²¹ Die chirurgische Entfernung des Tumors ist ein essentieller Baustein eines meist polymodalen Therapiekonzepts. Aufgrund der Tendenz zur lymphogenen Metastasierung erfolgt neben der Tumorablation in der Regel die chirurgische Ausräumung der drainierenden Lymphknotenregionen, genannt „Neck Dissection“. Hierbei gibt es verschiedene Ausprägungen im Ausmaß der Entfernung, die von einer selektiven Neck Dissection bis hin zu einer radikalen Neck Dissection reichen. Abhängig vom Tumorstadium sollten die beiden anderen therapeutischen Säulen – Chemotherapie und Radiatio – mit berücksichtigt werden.²⁰ Hierbei kann der Einsatz der Chemotherapie und/oder Radiatio neoadjuvant oder adjuvant, das heißt postoperativ, erfolgen. Eine alleinige Chemotherapie wird in der Regel nur im palliativen Therapiekonzept verfolgt, während der kurative Ansatz die Kombination aus Operation und alleiniger Radiatio oder mit Unterstützung systemischer Chemotherapie beinhaltet. Im Rahmen der systemischen Chemotherapie kommen häufig Cisplatin oder eine Kombination mit 5-Fluor-Uracil (5-FU) zum Einsatz. In den letzten Jahren wird der Fokus allerdings vermehrt auf Immuntherapeutika²¹ wie den EGFR-Inhibitor Cetuximab²²⁻²⁴ oder den PD-1-Inhibitor

Pembrolizumab²⁵ gelegt. Trotz aller therapeutischer Bemühungen liegt die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten mit HNSCC bei nur circa 55%.²⁶

Des Weiteren spielt der Faktor Lebensqualität eine erhebliche Rolle bei der Therapiewahl. Gerade die Lokalisation des Tumors bedingt sehr häufig eine chirurgische Resektion, die die Patienten in funktioneller und ästhetischer Sicht oft erheblich beeinträchtigt. In Fällen, in denen eine R0-Resektion des Tumors nicht möglich ist, aber auch bei metastasierten Karzinomen ist ein adjuvantes Konzept von großer Bedeutung. Zur Verbesserung des Ergebnisses ist eine Patienten-optimierte Therapie wünschenswert. Hierzu sind die über die letzten Jahre neu gewonnenen Kenntnisse zur Tumorentstehung von großer Bedeutung.

1.2 Tumorentstehung im Allgemeinen

Tumore werden mittlerweile als komplexe, heterogene Gefüge aus Zellen verstanden. Diese kommunizieren einerseits untereinander, andererseits sind sie aber auch strukturell und funktionell stark mit der zellulären Umgebung verbunden. Entsprechend sind zur Tumorentstehung verschiedene biologische Fähigkeiten der Zellen notwendig. Hierzu zählen:²⁷

- 1) die Aufrechterhaltung proliferativer Signale,
- 2) die Resistenz gegen Wachstumsinhibitoren,
- 3) eine nicht limitierte Zellteilung,
- 4) die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung,
- 5) die Induktion der Angiogenese,
- 6) das Ausschalten des programmierten Zelltodes,
- 7) Schutzmechanismen gegen die immunogene Destruktion,
- 8) die Umstrukturierung des Energie-Metabolismus (Metabolic Reprogramming).

Im Rahmen der systemischen Tumorthherapie wird versucht, diese biologischen Eigenschaften als Angriffsziele zu nutzen. Ein sogenannter „Emerging Hallmark“²⁷ – ein neu aufkommender, besonders vielversprechender Ansatz – ist die Umstrukturierung des Energiemetabolismus in Tumorzellen, auch als Metabolic Reprogramming bezeichnet.

1.3 Energie-Metabolismus in Tumorzellen

1.3.1 Der Warburg-Effekt

Damit Tumorzellen sich dauerhaft teilen können, müssen sie ihren Energiemetabolismus anpassen. Prinzipiell verstoffwechseln Zellen Glukose im Zytosol via Glykolyse zu Pyruvat. Im Rahmen der Glykolyse entstehen netto zwei Adenosintriphosphat (ATP). Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat in das Mitochondrium eingeschleust und im Rahmen des Citrat-Zyklus bzw. der Atmungskette oxidiert und zu CO₂ abgebaut. Die sogenannte oxidative Phosphorylierung besteht aus Atmungskette und ATP-Synthese. Hierbei entsteht insgesamt eine positive Energiebilanz von ungefähr 32 ATP pro Glukose-Molekül. Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat allerdings nicht weiter in den Citrat-Zyklus eingeschleust, sondern zu Lactat umgewandelt. Es verbleiben lediglich die aus der Glykolyse gewonnenen zwei ATP. Differenzierte Zellen versuchen vorrangig, eine optimale Energieausbeute durch die oxidative Phosphorylierung zu erzielen, um die zellulären Prozesse betreiben zu können.²⁸

Viele Tumorarten hingegen wandeln Glukose im Rahmen der aeroben Glykolyse zu Laktat um. Paradoxe Weise erfolgt diese vermeintlich ineffiziente Form des Glukose-Abbaus trotz aerober Bedingungen. Dieses Phänomen wurde schon in den 1920er Jahren von Otto Warburg und Cori bei Tumorzellen entdeckt und als „aerobe Glykolyse“ bezeichnet.^{29,30,31} Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur Tumorzellen das Phänomen der aeroben Glykolyse nutzen, sondern allgemein proliferierende Zellen.²⁸

Um die Energiediskrepanz zu kompensieren, regulieren Tumorzellen ihre Glukosetransporter, vor allem Glukosetransporter 1 (GLUT1), hoch mit dem Ziel, mehr Glukose aufzunehmen. In der klinischen Praxis kann dieses Phänomen mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) unter Verwendung eines radioaktiv markierten Tracers (18-Fluordesoxyglucose) nachvollzogen werden. Tumorzellen reichern aufgrund der vermehrten Glucose-Aufnahme den Tracer verstärkt an und können so radiologisch bzw. nuklearmedizinisch detektiert werden.³²

1.3.2 Ursachen des Warburg-Effekts

Doch warum nutzen Tumorzellen diesen vermeintlich Energie-ineffizienten Weg?

Die hohe Glykolyse-Rate bietet für proliferierende Zellen zahlreiche Vorteile:

- 1) Grundsätzlich ermöglicht der Warburg-Effekt die Nutzung einer extrazellulär umfangreich vorhandenen Ressource, Glukose, zur Produktion großer Mengen an ATP.³³
- 2) Trotz des niedrigen ATP-Ertrags pro aufgenommenen Glukose-Moleküls, kann der Gesamtertrag an ATP beim Warburg-Effekt aufgrund der hohen Glykolyse-Rate größer sein als bei der oxidativen Phosphorylierung.³³
- 4) Ein weiterer Grund für die anaerobe Glykolyse stellt die Veränderung des Redox-Potentials dar. In differenzierten Zellen wird die Regeneration von NAD^+ aus NADH durch Redox-gekoppelte mitochondriale Shuttle ermöglicht, wie z.B. das Malat-Aspartat-Shuttle. Diese Shuttle kommen bei einem hohen Umsatz an Glukose an ihre Grenzen, das heißt sie werden saturiert. Die wichtigste Alternative um NAD^+ zu regenerieren ist die Lactat-Dehydrogenase: hier wird Pyruvat zu Lactat reduziert, um NAD^+ aus NADH zu bilden.³³
- 5) Das Verhältnis von NAD^+ zu NADH im Zytosol ist in proliferierenden Zellen groß, was zahlreiche Vorteile birgt. Ein großes Angebot an NAD^+ fördert verschiedene Signalkaskaden: hierzu gehört zum Beispiel die NAD^+ -abhängige ADP-Ribosylierung durch PARP-Enzyme, die für die DNA-Reparatur und das Zellüberleben notwendig sind. Ein weiteres Beispiel sind NAD^+ -abhängige Deacetylasen, die eine Schlüsselrolle in der Regulierung des Zellmetabolismus und der Gentranskription einnehmen. Außerdem wird durch eine hohe NAD^+ -Konzentration die Biosynthese gefördert.³⁴
- 6) Lactat, das bei der Reduktion von Pyruvat anfällt, bietet Tumorzellen die Möglichkeit, ein saureres Milieu zu schaffen, das umliegende Gewebe leichter zu lysieren und die Tumordinvasion voranzutreiben.³⁴
- 7) Außerdem scheinen proliferierende Zellen Anforderungen an den Stoffwechsel zu stellen, die über die reine ATP-Produktion hinausgehen. Während des Zellwachstums wird Glukose sowohl für die Produktion an Biomasse als auch für die ATP-Gewinnung genutzt. Es ist zum Teil effizienter, Glukose-Bestandteile direkt

aus der Glykolyse heranzuziehen, um zelluläre Komponenten, wie zum Beispiel Palmitinsäure, zu produzieren, als diese mit Hilfe von ATP komplett neu zu synthetisieren. Das heißt, der Glukose-Abbau stellt Zwischenprodukte für die Biosynthese zur Verfügung, wie zum Beispiel Ribose für Nucleotide oder Glycerol und Nitrat für Lipide. Dies begünstigt wiederum die Biosynthese von Makromolekülen und Zellorganellen, die für den Aufbau neuer Zellen notwendig sind.²⁷

8) Außerdem werden vorrangig Glukose und Glutamin in umfangreicher Menge metabolisiert. Das bedeutet, dass Glukose und Glutamin überwiegend als Ressourcen für Kohlenstoff, Stickstoff, Energie und Reduktionsäquivalente dienen. Es wäre also extrem ineffizient, Glukose komplett zu CO₂ zu verstoffwechseln, um die Ausbeute an ATP zu maximieren und andererseits zelluläre Bestandteile unter hoher ATP-Aufwendung wieder neu zu synthetisieren.²⁸

Der erhöhte Energiebedarf von Tumorzellen ist in zahlreichen Publikationen belegt. Es muss allerdings konstatiert werden, dass verschiedene Tumore unterschiedliche Mechanismen haben, um ihren hohen Energiebedarf zu decken. So scheinen sogar innerhalb eines Tumors gewisse Zellen vermehrt Glucose aufzunehmen und Lactat zu produzieren, während andere Zellen desselben Tumors das Lactat konsumieren.^{27,35,36} Dies verdeutlicht die Komplexität der Tumorforschung: auch der Warburg-Effekt ist nicht für alle Tumorzellen konsistent und kann nach heutigem Forschungsstand nicht als generelles Angriffsziel für etwaige Tumorthapeutika herangezogen werden.²⁹

Allerdings wurde allgemein erkannt, dass weniger Energie für das Zellwachstum benötigt wird als für den basalen zellulären Stoffwechsel. Es wird davon ausgegangen, dass mehr als 60-70% der Energie allein für die Aufrechterhaltung des basalen Zellstoffwechsels benötigt werden.³⁷ Erst wenn dieses Niveau überschritten wird, steht den Zellen Energie zur Teilung und zum Wachstum zur Verfügung.

Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit der Fokus auf dem allgemeinen Energiemetabolismus liegen. Es wäre interessant, einen sogenannten „Low-Energy-Metabolismus“ zu etablieren. Das bedeutet, es soll der Zelle suggeriert werden, dass zu wenig Ressourcen vorhanden sind, um wachsen und proliferieren zu können. Zum Thema Energie-Metabolismus, Energie-Restriktion und „Low-Energy-Metabolismus“ wurden in

den letzten Jahren zahlreiche neue Erkenntnisse gewonnen, die im Folgenden näher erläutert werden.

1.4 Energie-Restriktion

Schon in der ersten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass eine dauerhafte und kontrollierte Restriktion der Energiezufuhr zu einer Verlängerung der Lebenserwartung und Verringerung alters-assoziierten Erkrankungen bei Nagern führt.^{38,39} Durch Energie-Restriktion, der permanenten Reduktion der täglich aufgenommenen Kalorienmenge um 10-30% ohne Mangelernährung, kommt es in zahlreichen Organismen wie Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), Maus und Ratte zu einer Zunahme der absoluten Lebenszeitspanne.³⁹ Untersuchungen zu weiteren Organismen zeigten ähnliche Resultate. Rhesusaffen, bei denen eine Kalorienrestriktion in jungen Jahren begonnen wurde, waren seltener übergewichtig. Außerdem sank das Risiko an Diabetes mellitus Typ 2, Krebs oder kardiovaskulären Erkrankungen zu erkranken bzw. zu versterben.⁴⁰ Ähnliche Erkenntnisse konnten für den Menschen gewonnen werden. Eine Kalorienrestriktion unter Vermeidung von Malnutrition führt bei Menschen zu einem geringeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs.⁴¹ Sehr lange wurde angenommen, dass diese positiven Effekte der Energierestriktion nur auf die verminderte Kalorienaufnahme im Allgemeinen zurückzuführen sind. Es lohnt sich hierbei jedoch ein Blick ins Detail:

Prinzipiell kann Energie durch Kohlenhydrate, Proteine und Fette aufgenommen werden. Als Sensor für Nährstoffe und Regulator des Metabolismus spielt auf zellulärer Ebene das Protein mTOR (engl. mechanistic Target of Rapamycin) eine wesentliche Rolle. mTOR fungiert in der Zelle als eine Untereinheit von zwei unterschiedlichen

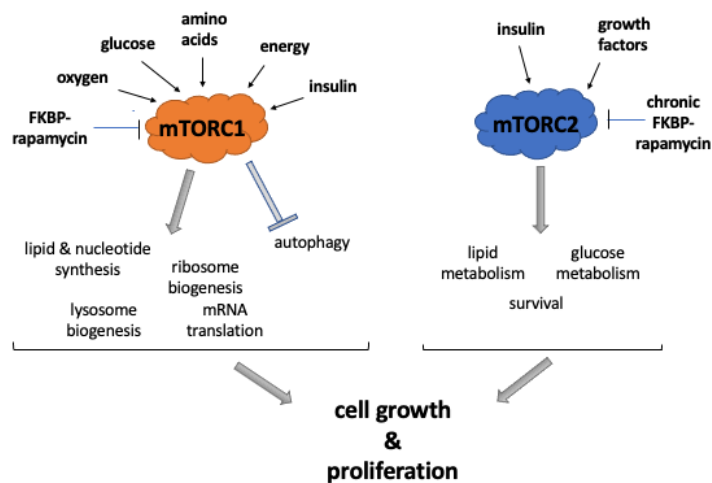


Abbildung 1: Darstellung der Komplexe mTORC1 und mTORC2 in Zusammenhang mit den zellulären Signalen sowie den regulatorischen Prozessen (nach Sabatini 2017).

Komplexen - mTORC1 und mTORC2. Die beiden mTOR-Komplexe sind für die Regulierung von zellulären Funktionen verantwortlich, die mit Proliferation, Zellwachstum und Überleben der Zelle in Verbindung stehen.⁴² Aktives mTOR fördert Wachstum und Proliferation, während eine Inhibition zu einer Wachstums- und Proliferationshemmung führt und zusätzlich die Autophagie induziert.

Allerdings müssen nicht alle Energieträger vermindert aufgenommen werden. Alleine die Restriktion von Aminosäuren hat schon einen starken inhibierenden Einfluss auf mTOR und führt zu den oben genannten positiven Effekten.³⁹

Zahlreiche wissenschaftliche Artikel zeigen, dass die Proteinrestriktion oder die Restriktion spezifischer einzelner Aminosäuren zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt.^{43–48} Ebenso kann aufgezeigt werden, dass die Altersmorbidity abnimmt und die Wahrscheinlichkeit für alters-assoziierte Erkrankungen wie Typ II Diabetes, Herz-Kreislaufkrankungen auch für Krebs drastisch gesenkt wird. Allen Ansätzen der Energie-Restriktion ist gemein, dass sie den mTOR-Komplex beeinflussen: zusammenfassend existiert die Möglichkeit, Kalorien im Allgemeinen, Proteine oder gar einzelne Aminosäuren zu reduzieren. Außerdem können sogenannte Calorie Restricting Mimetics eingesetzt werden, die später in dieser Arbeit genauer beschrieben werden. Im Folgenden wird der Ansatz der Proteinrestriktion und anschließend die Aminosäurerestriktion in Form von Methionin erläutert. Das enorme Potential dieser Restriktionsformen soll hier an der Arbeit „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” von Levine et. al⁴⁹ aus dem Journal Cell Metabolism (2014) verdeutlicht werden.

1.4.1 Die Proteinrestriktion als potentielle Tumorthherapie

In der genannten Arbeit wurde die Bedeutung der Proteinrestriktion für Tumore in vivo an Mäusen untersucht.⁴⁹ Für dieses Experiment wurden 18 Wochen alte Mäuse für 39 Tage mit einer isokalorischen Diät ernährt. Es wurden zwei Gruppen gebildet: die eine Gruppe erhielt eine Ernährung mit einem hohen Proteinanteil (18%), die zweite Gruppe mit einem geringen Proteinanteil (4-7%). Den Mäusen wurden subkutan 20.000 murine Melanomzellen injiziert. Die Messungen erfolgten ab dem 15. Tag nach der Tumorzellapplikation. In der Gruppe mit dem hohen Proteinanteil waren am 22. Tag 100% der Tiere an dem Tumor erkrankt. Hingegen die zweite Gruppe wies bis dahin nur 80% erkrankte Tiere auf. Der Anteil an erkrankten Mäusen stieg in dieser Gruppe bis zum 25. Tag auf einen Maximalwert von 90%. Die Tumorgöße war unter Proteinrestriktion von Beginn an deutlich kleiner und zum Ende der Untersuchungen am Tag 39 waren die Tumore im Durchschnitt 78% kleiner.⁴⁹ In analoger Form wurde der Versuch mit Brustkrebszellen in einem Mausmodell durchgeführt. 15 Tage nachdem die 20.000 murinen Brustkrebszellen den Mäusen implantiert wurden, erfolgte die Untersuchung der Mäuse auf Tumore. In der Gruppe mit einem hohen Proteinanteil entsprach am Tag 18 die Tumorzinzidenz 100%, während in der „Low-Protein-Group“ die Inzidenz bei 70% lag. Die Inzidenz stieg auf ein Maximum von 80% an. Nicht nur die Inzidenz konnte durch die Proteinrestriktion verringert werden, sondern auch die Tumorgöße, die in der „Low-Protein-Group“ im Durchschnitt um 45% kleiner war.⁴⁹ Diese positiven Aspekte der Proteinrestriktion auf Melanom- und Brustkrebszellen lassen die Proteinrestriktion als einen vielversprechenden Ansatz im Rahmen der Tumorthherapie erscheinen.

1.4.2 Aminosäurerestriktion als potentielle Tumorthherapie

Alle Proteine und Peptide werden in humanen Zellen aus 20 proteinogenen Aminosäuren synthetisiert. Viele dieser Aminosäuren können im Rahmen menschlicher Stoffwechselprozesse hergestellt werden. Für einige Aminosäuren gilt dies jedoch nicht

und somit müssen diese notwendigerweise mit der Nahrung aufgenommen werden. Diese Aminosäuren werden als essentielle Aminosäuren bezeichnet.⁵⁰

Die Metabolite der Aminosäuren sind in zahlreiche Stoffwechselwege der Zelle involviert: Es gibt glucogene und ketogene Aminosäuren und solche, die beide Eigenschaften vereinen. Rein ketogen sind Lysin und Leucin. Diese werden zu Acetyl-CoA abgebaut. Abbauprodukte der Aminosäuren, wie zum Beispiel α -Ketoglutarat, Oxalacetat, Fumarat und Succinyl-CoA sind im wesentlichen Metabolite des Citratzyklus. Ansonsten stehen sie über Acetyl-CoA oder Pyruvat eng mit diesem in Verbindung. Der Aminosäurestoffwechsel ist außerdem mit dem Lipidstoffwechsel via Acetyl-CoA und mit dem Harnstoffzyklus über Argininosuccinat verbunden. Der Harnstoffzyklus ist über Carbamoylphosphat und Aspartat mit dem Auf- u. Abbau der Nukleinsäuren und somit auch mit der DNA-Synthese verknüpft. Außerdem kann Glucose durch die Gluconeogenese aus Aminosäuren bzw. deren Metabolite gebildet werden. Hierzu werden deren Ketosäuren, z.B. α -Ketoglutarat, Pyruvat bzw. Oxalacetat genutzt. Durch Verknüpfung der Aminosäuren untereinander entstehen unterschiedliche Proteine, die am Aufbau der intra- und extrazellulären Strukturen beteiligt sind. Proteine erfüllen im menschlichen Organismus eine Vielzahl wichtiger Funktionen: hierzu zählt die Synthese spezifischer Poren und Translokatoren der Membranen, ihre Eigenschaft als Enzyme und Rezeptoren sowie ihre Funktion als nukleäre Transkriptionsfaktoren.^{51,52} Auf Grund der wesentlichen Bedeutung der Aminosäuren und deren Metaboliten im allgemeinen Stoffwechsel bieten Eingriffe in den Aminosäurestoffwechsel entsprechend viele Angriffsmöglichkeiten und haben in den letzten Jahren in der Tumorthherapie zunehmend an Bedeutung gewonnen.⁵³ Zusätzlich haben die Aminosäuren bei der Proliferation noch eine weitere entscheidende Bedeutung.

Die Proliferation von Tumorzellen erfordert einen gesteigerten Stoffwechsel aufgrund der hohen Zellteilungsrate. Doch welche Quellen nutzen die Zellen für den Aufbau ihrer Zellmasse? Nach Hosios et al.⁵⁴ entspricht der Kohlenstoffanteil, der aus Glucose gewonnen wird nur 10% - 15% der Zellmasse. Wie in Abbildung 2 dargestellt, wird der überwiegende zelluläre Kohlenstoffanteil (20% - 40%) der Zellmasse aus exogenen Aminosäuren gebildet (siehe grüne Linie bzw. grüne Markierung).

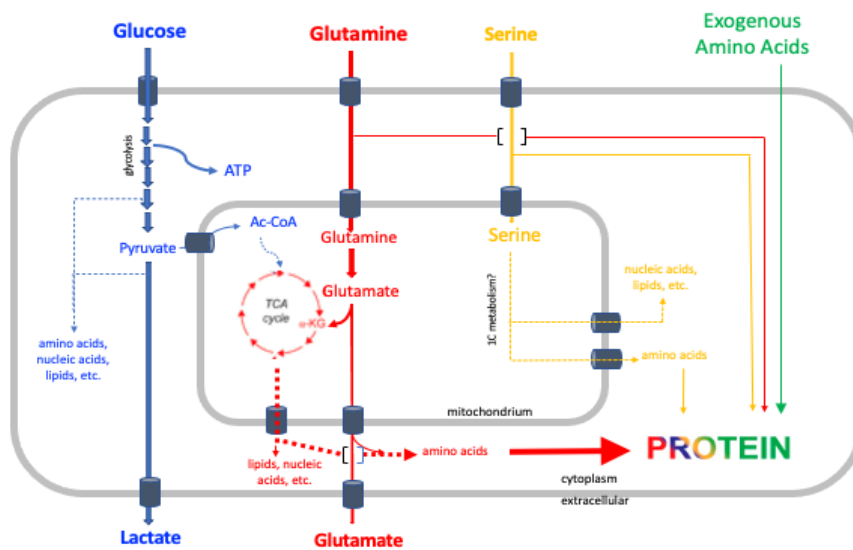


Abbildung 2: Aufnahme, Verteilung und Verwendung von Makromolekülen in proliferierenden Zellen (nach Tanner und Rutter, *Developmental Cell*, 2016).

- durchgezogene Linien = direkte Beiträge
- gestrichelte Linien = mehrere Schritte und/oder die Umwandlung in andere Moleküle
- dickere Linien = größerer relativer Beitrag
- Farben stehen für die ursprünglichen Quellen, aus denen die Metabolite abgeleitet sind (blau = von Glucose abgeleitet, rot = von Glutamin abgeleitet usw.).

Bei der Aminosäurerestriktion wird die Ressource begrenzt, die prozentual am größten für die zelluläre Masse relevant ist. mTOR misst den Aminosäuregehalt von ausgesuchten Aminosäuren. Das Messen des Aminosäuregehalts wird weiter unten im Text anhand von Methionin erläutert. Dabei ist entscheidend, dass mTOR nicht die Summe der Aminosäuren misst, sondern bereits das Fehlen einer Aminosäure ausreicht, mTOR zu inhibieren. Es wird also durch die Restriktion der zugeführten Aminosäuren der Zelle suggeriert, nicht genügend Bausteine und Energie zum Wachstum und zur Proliferation zu Verfügung zu haben. Dies induziert den oben angesprochenen „Low-Energy-Metabolismus“.

1.5 Low-Energy-Metabolismus durch Methionin-Restriktion

Neben der Restriktion des Proteinanteils⁴⁹ sind zahlreiche Untersuchungen zur Restriktion einzelner Aminosäuren, insbesondere der essenziellen Aminosäure Methionin durchgeführt worden.^{55,39,56} Auch die Auswirkungen der Methionin-Restriktion auf Langlebigkeit, Stoffwechsel und die Ausbildung von alters-assoziierten Krankheiten sind bisweilen für zahlreiche verschiedene Lebewesen wie Hefen, Würmer, Nacktmulle, Mäuse und andere untersucht. Die Methionin-Restriktion führt zu einer Verlängerung der Lebenszeit, hat positive Auswirkungen auf die Stoffwechsellistung (z.B. Verringerung der Körperfettmasse) und führt zu einer Reduktion alters-assoziiierter Erkrankungen, wie zum Beispiel Diabets.⁵⁶

Gesunde Körperzellen sind in der Lage, Methionin aus S-Adenosylmethionin (SAM) oder Homocystein zu bilden. Die Synthese von Methionin gilt im Vergleich zu allen anderen Aminosäuren energetisch als am aufwändigsten.⁵⁷ Es wird angenommen, dass sie deshalb als Indikator für ausreichend Energie fungiert und bei Mangel es zu einem niedrigeren zellulären Energieniveau mit Anpassung des Zellstoffwechsels kommt. Dieser Zustand wird in der eigenen Arbeitsgruppe als „Low-Energy-Metabolismus“ bezeichnet.⁵⁸

Um von dem relativ abstrakten Begriff „Low-Energy-Metabolismus“ zu einer konkreteren Vorstellung der Auswirkungen der Methionin-Restriktion zu kommen, sollen die Zusammenhänge auf biochemischer Ebene beleuchtet werden. Interessant ist, dass die durch Methionin-Restriktion modifizierten Strukturen eng mit der Tumorphathogenese assoziiert sind. Methionin nimmt eine zentrale Rolle im „One-Carbon-Metabolismus“ ein. Dieser Metabolismus umfasst eine Reihe von biochemischen Reaktionen, die einzelne Kohlenstoffeinheiten aus der Nahrung, vor allem Aminosäuren, in wichtige Stoffwechselwege übertragen (siehe Abbildung 3).⁵⁹

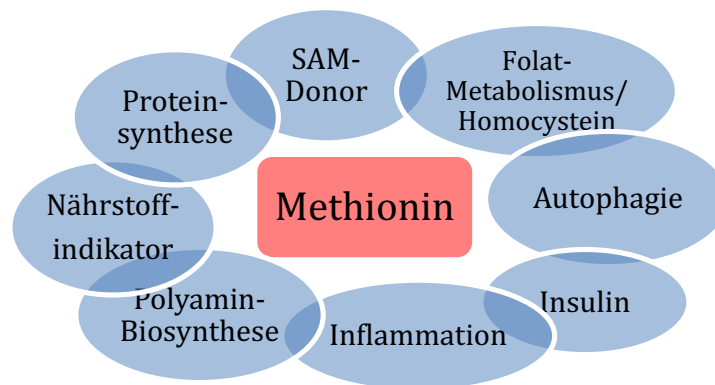


Abbildung 3: Methionin und relevante Auswirkungen auf zahlreiche zelluläre Prozesse.

Methionin als Quelle für das Substrat SAM

Methionin stellt die Vorstufe des Schlüsselproduktes S-Adenosylmethionin (SAM) dar.⁵⁹ SAM dient als Methylgruppen-Donor zur Modifikation der Genexpression durch Methylierung der genomischen DNA, RNA sowie der Histone. Außerdem reguliert SAM die Integrität der Phospholipide, die Aktivität verschiedener Signalkaskaden und die Polyaminbiosynthese, die weiter unten genauer beschrieben wird. Eine Restriktion an Methionin führt zu einer geringeren SAM-Konzentration und demnach zu einer Inhibierung zahlreicher regulatorischer Prozesse.⁵⁹

Methionin als Signalstoff für das Vorhandensein von Energie-Ressourcen

Das Protein SAMTOR ist ein SAM-Sensor und stellt die Verbindung von Methionin, dem „One-Carbon-Metabolismus“ und mTORC1 dar. mTORC1 reguliert das Zellwachstum und den Stoffwechsel in Abhängigkeit von der zellulären Umwelt. Nährstoffe führen über eine Rag Guanosin triphosphatase (GTPases) zur Aktivierung von mTORC1. SAMTOR inhibiert mTORC1 durch Bindung an GATOR1, das eine aktivierende GTPase für Rag A/B ist. SAM verhindert die Bildung des inhibierenden SAMTOR-GATOR1-Komplexes. Dies führt zur Aktivierung von mTORC1 und folglich zu einer Erhöhung des Wachstums und des Stoffwechsels der Zelle. Fehlt SAM, so kann SAMTOR den Komplex mTORC1 hemmen.^{60,59}

Beteiligung von Methionin an der Polyamin-Biosynthese

SAM ist nicht nur für die Regulierung der Polyamin-Biosynthese notwendig, sondern auch für deren Biosynthese selbst. Zu den Polyaminen zählen Putrescin, Spermidin und Spermin. Die Polyamine sind für die Stabilität von Proteinen, DNA und RNA verantwortlich. Sie schützen vor oxidativem Stress in der Zelle und regulieren die Aktivität von Ionen-Kanälen.^{59,61} Vor allem der Gehalt und das Verhältnis an Spermin zu Spermidin haben einen erheblichen Einfluss auf das Zellwachstum und Zellschicksal.⁶¹ Spermidin gilt auch als Maßstab für den Energiehaushalt. Ein hoher Spermidingehalt reflektiert ausreichend Energie innerhalb der Zelle.⁶²

Methionin im Rahmen der Proteinbiosynthese

Die Aminosäure Methionin wird ubiquitär als Start-Aminosäure für die Translation verwendet. Somit ist Methionin nahezu an der Synthese aller Polypeptide beteiligt und nimmt eine besondere Rolle in der Regulierung des Initiationskomplexes ein.⁶³

Außerdem gilt – wie oben erwähnt - Methionin als eine energieaufwändige Aminosäure. Beide Eigenschaften lassen ggf. die Proteinsynthese nur dann starten, wenn genügend Energie-Ressourcen vorhanden sind. Via Reduktion der Methionin-Zufuhr wird die Translations- bzw. Proteinsyntheserate beeinflusst.⁵⁹

Einfluss von Methionin auf Homocystein und den Folat-Stoffwechsel

Methionin ist über Homocystein am Folat-Stoffwechsel beteiligt. Dieser gilt als Lieferant für die Purin- und Pyrimidin-Biosynthese. Des Weiteren wird das Purin Adenin aus Methylthioadenosin (MTA) gebildet, das als Nebenprodukt des Methionin-Salvage-Pathways anfällt.⁵⁹ Ein Mangel an Methionin führt zu einer geringeren Synthese der Purine und Pyrimidine, die u.a. die Bausteine für DNA und RNA darstellen.

Die Verbindung von Methionin und Autophagie

Autophagie wird als Prozess der zellulären Selbstverdauung beschrieben.⁶⁴ Dabei werden zelluläre Bestandteile abgebaut und die Bausteine in Salvage-Pathways zur Wiederverwendung regeneriert. Dieser Prozess wird in der Regel durch Mangelzustände eingeleitet, wobei die genauen zellulären Mechanismen noch nicht vollständig verstanden

sind. Ein Stickstoff-Defizit gilt bisher als ein erforschter Auslöser der Autophagie. Werden Hefen zunächst in einem Medium mit einer hohen Stickstoffkonzentration gehalten und anschließend in ein Medium mit einer geringen Stickstoffkonzentration überführt, so wird die Autophagie induziert. Der Zusatz an Methionin führt allerdings zu einer Inhibierung der Autophagie bei den Hefezellen. Das aus Methionin entstehende SAM inhibiert die Autophagie und fördert das Zellwachstum durch Aktivierung der Protein Phosphatase Methyltransferase 1 (Ppm1p), die in Korrelation mit der SAM-Konzentration die katalytische Untereinheit Protein-Phosphatase 2 (PP2A) methyliert. Methyliertes PP2A fördert die Dephosphorylierung des Nitrogen Permease Regulators 2 (Npr2p). Npr2p ist eine Komponente des Komplexes der die NNS-Autophagie (Non-Nitrogen-Starvation) und andere wachstums-assoziierte Prozesse reguliert. Durch Methionin-Restriktion kommt es zu einer Verringerung der SAM-Konzentration. Damit könnte die Inhibierung der Autophagie unterbunden werden und somit Tumorzellen vermehrt den Weg der Autophagie einschlagen.^{64,65}

Einfluss von Methionin auf den Insulinstoffwechsel

Insulin-like growth Faktoren (IGF) spielen eine große Rolle beim Wachstum und der Entwicklung von Gewebe.⁶⁶ Der menschliche Zellzyklus wird streng durch intra- und extrazelluläre Signale reguliert. Wenn die Bilanz aus stimulierenden und inhibierenden Signalen auf Seite der Proliferation überwiegt, geht die Zelle in die Mitosephase über. IGF-1 und IGF-2 binden an den IGF-1 Rezeptor (IGF-1R) und führen über verschiedene Signalkaskaden zu einer Proliferation der Zellen. Außerdem wird dem IGF-Signalweg eine starke anti-apoptotische Wirkung zugesagt. Solche Signalwege spielen eine zentrale Rolle bei der Tumorentstehung.^{66,67} Unter Methionin-Restriktion wird laut bisheriger Studien der Faktor IGF-1 gesenkt.⁴⁹ IGF-1 signalisiert normalerweise den Zellen, dass über einen längeren Zeitraum genügend Energie vorhanden ist und ermöglicht Wachstum und Proliferation.⁶⁸ Folglich könnte auch über diesen Weg die Methionin-Restriktion zu einer Hemmung des Zellwachstums und der Proliferation führen.

Einfluss von Methionin auf inflammatorische Prozesse

Neben dem Einfluss auf den Insulin-Stoffwechsel vermindert die Methionin-Restriktion die Ausprägung inflammatorischer Prozesse.^{69,70} Dies ist insbesondere für die Tumorthherapie interessant, da dem Immunsystem und besonders entzündlichen Prozessen eine Schlüsselrolle in der Tumorentstehung zugeschrieben werden.^{71,72} Für die Auswirkungen der Methionin-Restriktion auf entzündliche Prozesse wird nach neuesten Erkenntnissen die Inhibition des Transkriptionsfaktor STAT3 verantwortlich gemacht. STAT3 wird als pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktor mit zahlreichen Krankheiten, darunter vor allem Krebs, in Verbindung gebracht.⁷³ STAT3 fördert pro-onkogene entzündliche Signalwege, u.a. NFκB („nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B-cells“).⁷⁴ Der NFκB-Signalweg nimmt eine herausragende Stellung in der Tumorentstehung ein. Die Aktivierung des NFκB-Signalwegs kann u.a. zur Induktion anti-apoptotischer Faktoren führen. Außerdem werden Proliferation, Angiogenese und ein entzündliches Milieu gefördert. Dies erfolgt unter anderem über die Vermittlung via Zytokinen, wie zum Beispiel IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF-α.^{71,75,76}

1.6 Ausblick – CRM und Methionin-Analoga

Die Induktion eines „Low-Energy-Metabolismus“ kann - wie oben erläutert – auf unterschiedliche Wege etabliert werden. Hierzu zählen die Kalorien-, die Aminosäuren- und die Methionin-Restriktion, deren Funktionsweise viele Gemeinsamkeiten aufweisen. Obwohl diese Restriktionsformen zahlreiche positive Effekte auf die Lebenserwartung und Gesundheit haben, erfordern sie Disziplin und stellen somit für viele Menschen eine große Herausforderung dar. Eine konsequente und dauerhafte Umsetzung hängt sehr stark von der Compliance des Patienten ab und ist für viele Personen schwierig dauerhaft durchzuhalten. Eine wünschenswerte Strategie ist es, die Effekte des „Low-Energy-Metabolismus“ medikamentös zu induzieren. Hierzu wurden in den letzten Jahren verschiedene Wirkstoffe untersucht, die unter dem Begriff „Caloric Restriction Mimetics“ (CRM), also Kalorienrestriktionsmimetika zusammengefasst werden. Als Beispiele sollen hier die Acetylsalicylsäure Aspirin, das orale Antidiabetikum Metformin und der mTOR-Inhibitor Rapamycin erwähnt werden.⁷⁷

Aspirin wird im Körper schnell zu Salicylsäure umgewandelt, die mit Acetyl-CoA konkurriert und über Zwischenschritte zur Aktivierung der Autophagie führt. Beim kolorektalen Karzinom führt Aspirin über verschiedene Mechanismen zu der Aktivierung der Autophagie von Tumorzellen. Dies erfolgt u.a. durch Reduktion der mTOR-Signale sowie Induktion der AMP aktivierten Proteinkinase (AMPK). Die AMPK ist ein Enzym, das die Zelle vor Energiemangel schützt. Dieser anti-Tumor-Effekt wird bereits schon in der Therapie des kolorektalen Karzinoms eingesetzt.⁷⁷

Metformin ist bekannt als orales Antidiabetikum im Einsatz gegen Diabetes mellitus Typ 2. Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass Metformin einige der positiven Effekte der Kalorienrestriktion induziert. Hierzu gehört auch wieder die Autophagie, die durch Metformin über verschiedene Wege eingeleitet werden kann: zum einen durch Aktivierung von AMPK und zum anderen direkt durch Inhibierung des mTORC1 unabhängig von AMPK.⁷⁷

Eine weitere Option stellt Rapamycin dar, das ebenfalls durch die Hemmung von mTOR direkt einen Low-Energy-Metabolismus induziert.⁷⁷

Eine weitere Möglichkeit, ähnliche Effekte wie CRMs zu erzielen, könnten Methionin-Analoga darstellen. Diese sollen von der Zelle aufgenommen werden, allerdings aufgrund gewisser struktureller Veränderungen nicht in gleicher Weise verstoffwechselt werden. Zwei Beispiele sind Formyl-Methionin und Ethionin. Formyl-Methionin wird gewöhnlich für die bakterielle Proteinbiosynthese genutzt, spielt aber in Eukaryoten für die Proteinsynthese in der Regel keine Rolle.⁷⁸ Zu Ethionin wurden schon in den 80er Jahren Studien publiziert, die die Aufnahme von Ethionin in eukaryotische Zellen beschreiben. Dort wurden folgende Effekte beobachtet: Hemmung der SAM-Synthese, der rRNA-Synthese, der DNA-Replikation, der ATP-Synthese, etc.⁷⁹ In der Tumorthherapie wurde Ethionin zum Beispiel schon in Studien zum Blasenkrebs eingesetzt.⁸⁰

1.7 Ziel dieser Arbeit

Nach neuen Erkenntnissen hat die Induktion des „Low-Energy-Metabolismus“ nicht nur einen positiven Effekt auf die Lebenszeitspanne im Allgemeinen, sondern beeinflusst auch die Neigung der Zellen zu Proliferation und Wachstum. Dieser anti-proliferative und wachstumshemmende Effekt des „Low-Energy-Metabolismus“ gilt als vielversprechend beim Einsatz in der Tumorthherapie. Wie einleitend dargestellt lässt sich der „Low-Energy-Metabolismus“ durch verschiedene Wege etablieren. Eine Möglichkeit stellt die Restriktion von einzelnen Aminosäuren, wie z.B. Methionin, dar.

Im Hinblick auf die oben dargestellten Zusammenhänge soll die Methionin-Restriktion als eine neue Strategie in der Tumorthherapie des HNSCC analysiert werden. Folgende Fragestellungen sollen untersucht werden:

1. Wie wirkt sich die Methionin-Restriktion auf die Zellproliferation aus?
2. Wird in den Zellen vermehrt Autophagie induziert?
3. Wie wirkt sich eine Methionin-Restriktion aus:
 - a. auf den Insulin-Stoffwechsel der Zellen
 - b. auf die Produktion von Entzündungsmediatoren (Interleukin 8)
4. Werden die Zellen durch die Methionin-Restriktion sensibler für gängige Zytostatika?
5. Gibt es eine Möglichkeit Methionin in Form von Analoga zu kompetitieren, um die Effekte der Methionin-Restriktion zu induzieren, ohne „Hungern“ bzw. ohne Methionin aus der Nahrung entfernen zu müssen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

Die Versuche wurden mit den unten aufgelisteten humanen Zelllinien und den entsprechenden Kulturmedien durchgeführt.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten humanen Zelllinien

Zelllinie	Gewebe	Zelltyp	Erkrankung
HaCaT	Haut	Keratinocyten	Kontrolle
Hela	Zervix	Epithelzellen	Adenokarzinom
FaDu	Pharynx	Epithelzellen	Plattenepithelkarzinom
Detroit	aus pleuraler Metastase eines Pharynxkarzinoms	Epithelzellen	Plattenepithelkarzinom
SCC9	Zunge	Epithelzellen	Plattenepithelkarzinom
SCC25	Zunge	Epithelzellen	Plattenepithelkarzinom

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Kulturmedien

Kulturmedium	Zelllinie	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X)	gibco® Life Technologies Corporation, USA	HaCaT
RPMI Medium 1640 (1X)	gibco® Life Technologies Corporation, USA	Hela
DMEM/F12 1:1 Mix	Genaxxon® bioscience GmbH, Ulm	SCC9, SCC25
MEM Alpha Medium (1X)	gibco® Life Technologies Corporation, USA	FaDu, Detroit
Dulbecco's Modified Eagle Medium (1X) ohne Methionin	gibco® Life Technologies Corporation, USA	HaCaT
RPMI Medium 1640 (1X) ohne Methionin	gibco® Life Technologies Corporation, USA	Hela
DMEM/F12 1:1 Mix ohne Methionin	Genaxxon® bioscience GmbH, Ulm	SCC9, SCC25
MEM-Alpha Sonderproduktion ohne Methionin	BIO&SELL® GmbH, Feucht	FaDu, Detroit

2.1.2 Reagenzien, Chemikalien

Folgende Reagenzien und Chemikalien wurden verwendet:

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien, Chemikalien	
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	ROTH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat	ROTH, Karlsruhe
Bromphenolblau	ROTH, Karlsruhe
Color Plus Prestained Protein Ladder	NewEngland BioLabs® Inc., FfM
Dithiotreitol	ROTH, Karlsruhe
Dodecylsulfat sel de Sodium ultrapure	ROTH, Karlsruhe
Formyl-Methionine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Glycin	ROTH, Karlsruhe
Kristallviolett (CV-Pulver)	ROTH, Karlsruhe
Cystein	Merck KGaA, Darmstadt
Cystin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin
Methionin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
NaCl	ROTH, Karlsruhe
Roti®-Free Stripping-Puffer 2.2 plus	ROTH, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamine	ROTH, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Solution (10x)	Biochrom AG, Berlin
Tween®20	ROTH, Karlsruhe

2.1.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper.

Antikörper	
LC3B-Antibody	Cell Signaling Technology®, USA
Dako Anti-Rabbit-HRP	Agilent Technologies, Inc., USA
Tubulin-alpha Ab-2 Mouse Mab	ThermoFisher Scientific®, USA
Dako Anti-Mouse-HRP	Agilent Technologies, Inc., USA

2.1.4 Kommerzielle Kits

Es wurden folgende kommerziellen Kits verwendet:

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten kommerziellen Kits

Kommerzielle Kits	
RNeasy® Mini Kit	Qiagen®, Germany
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen®, Germany
QuantiTect® Primer Assay	Qiagen®, Germany
Human IL-8 ELISA Set	BD Biosciences Pharmingen®, USA
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermofisher, USA

2.1.5 Primer

Folgende Primer wurden verwendet:

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer

Qiagen® Primer Human – Bestellnummer	
IGF-1	QT00029785
IGFBP-1	QT00114716
LC3B	QT00112875
Actβ2	QT01680476

2.1.6 Lösungen und Puffer

Folgende Lösungen und Puffer wurden verwendet:

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	
Protein-Probenpuffer (4x)	<ul style="list-style-type: none"> • 20% Glycerin • 125 mM Tris (pH = 8,0) • 4% SDS • 3% DTT • Bromphenolblau
Westernblotpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mM Tris • 192 mM Glycin • 20% Methanol • pH 8,3

SDS-PAGE-Laufpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mM Tris • 192 mM Glycin • 2 mM SDS (20%) • pH 8,3
PBS (Phosphate Puffered Saline)	<ul style="list-style-type: none"> • 20 mM Natriumphosphat • 0,7 % Natriumchlorid • pH 7,2
PBST	<ul style="list-style-type: none"> • PBS • 0,05% Tween-20
PBST-Milch	<ul style="list-style-type: none"> • PBST • 5% Magermilch
Sammelgelpuffer (4x)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 M Tris • 0,015 M SDS • pH 6,8 (mit HCL eingestellt)
TBS (Tris Buffered Saline)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,02 M Tris • 8% NaCl • pH 7,6 (mit HCL eingestellt)
Trenngelpuffer (4x)	<ul style="list-style-type: none"> • 1,5 M Tris • 0,015 M SDS • pH 8,8 (mit HCL eingestellt)

2.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden verwendet:

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte und Verbrauchsmaterialien	
Absaugpumpe, HLC	DITABIS Digital Biomedical Imaging Systems AG, Pforzheim
CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System (Modell TTC)	Schärfe Systeme, Reutlingen
Infinite F50 Plate Reader	Tecan Trading AG, Schweiz
ELISA-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mehrkanalpipetten Typ Eppendorf Research Plus Multi 8-channel 10-100µl	Eppendorf AG
Mehrkanalpipetten Typ Eppendorf Research Plus Multi 8-channel 30-300µl	Eppendorf AG
NanoDrop 2000	ThermoFisher Scientific®, USA
Pipettierhilfe Typ accu-jet pro	Brand GmbH + Co.KG
Sterilbank HERAsafe	Kendro Laboratory Products GmbH
Universal 320R Zentrifuge	Hettich Lab Technology
Vortex Genie 2	Scientific Industries

Wasserbad Typ 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH (GFL)
Bio-Rad ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden in einem Inkubator bei einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Temperatur von 37° Celsius inkubiert und in der Regel zweimal pro Woche mit einem für die Zelllinie vorgesehenen Medium (siehe Tabelle 2) kultiviert. Sobald die Zellen etwa 80% des Bodens der Kulturflasche bedeckten, erfolgte das Splitten nach einem für die Zelllinie definierten Verhältnis (HaCaT 1:4, HeLa 1:10, FaDu 1:5, Detroit 1:3, SCC9 1:2,5, SCC25 1:2).

2.2.2 Zellzählung

Zur Versuchsdurchführung und späteren Analyse ist es notwendig, die Ausgangszellzahl zu bestimmen. Hierzu wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit Trypsin behandelt, um diese vom Boden der Flasche zu lösen. Anschließend wurden die gelösten Zellen im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und 10 µl der Suspension in 10ml isotoner Flüssigkeit gegeben. Die Zellzählung wurde in der Regel mit dem CASY®-Zellzähler automatisiert durchgeführt. Für einen Teil der Versuche wurde die Zellzählung mit der Neubauerkammer durchgeführt, bei der die Zählung der Zellen unter dem Mikroskop visuell erfolgt.

2.2.3 Zytotoxizitäts-Assay

Das Wachstumsverhalten der Zelllinien wurde mittels Zytotoxizitäts-Assay analysiert. Hierzu wurden von der jeweiligen Zelllinie – wenn nicht anders beschrieben – 10.000 Zellen/Well auf einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit dem entsprechenden Medium inkubiert. Am Versuchsende wurde das Medium abgesaugt und zur Analyse der relativen Zellzahl die Platten mit 50 µl/Well Kristallviolett-Lösung (1% Kristallviolett, 20% MetOH) gefärbt. Kristallviolett lagert sich unspezifisch in die DNA lebender Zellen ein und färbt diese blau. Vor der eigentlichen Messung wurde überschüssiger Farbstoff durch mehrmaliges Waschen der 96-Well-Platte in H₂O entfernt. In die Wells wurden im

Anschluss 100 μ l Methanol eingebracht und die Platte mittels eines Photoabsorbtionsmessgerätes TECAN® infinite F50 analysiert.

2.2.4 Lysate für Western-Blot

Es wurden 500.000 Zellen pro Well auf einer 6er-Well-Platte kultiviert. Die Zellen wurden entweder mit Vollmedium oder mit Medium ohne Methionin behandelt. Die Zelllinien FaDu und Detroit wurden nach drei Tagen auf Eis mit DPBS gewaschen, von der Platte in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert und die Pellets bei -20 Grad Celsius gelagert. Ebenso wurde mit den Zelllinien HeLa und HaCaT nach fünf Tagen sowie SCC9 und SCC25 nach sieben Tagen verfahren.

2.2.5 SDS-PAGE

Die Zell-Pellets wurden in Protein-Probenpuffer lysiert. Anschließend wurden die Zelllysate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Hierzu wurde ein 12%iges Trenngel und ein 6%iges Sammelgel hergestellt. Das Trenngel wurde aus den folgenden Reagenzien gegossen: Acrylamid 8,8 ml, Trenngel-Puffer 5,5 ml, H₂O 7,8 ml, APS 374 μ l, TEMED 30,8 μ l. Das Sammelgel wurde aus den folgenden Komponenten hergestellt: Acrylamid 2,8 ml, Sammelgel-Puffer 3,5 ml, H₂O 7,6 ml, APS 168 μ l, TEMED 14 μ l.

In die Taschen des Sammelgels wurden je 20 μ l Lysat einer Probe injiziert. Außerdem wurde in eine der Taschen 1 μ l Color Plus Prestained Protein Ladder (NewEngland BioLabs® Inc., FfM), ein Proteingrößenmarker, appliziert. Die Proteine wurden über 45 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA pro Gel aufgetrennt.

2.2.6 Western-Blot

Danach wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Hierzu wurde eine konstante Stromstärke von 1,5 mA/cm² für 1,5 Stunden angelegt. Nach dem Blotten wurden die unspezifischen Bindungen auf der Membran für mindestens eine Stunde in TBS mit 5% Milchpulver geblockt. Anschließend wurde der Blot mit einem LC3B-Antikörper (Cell Signaling Technology®, USA) in TBS mit 0,1% Tween und 5% Milchpulver über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (5 Minuten) mit TBS-

0,1% Tween wurde der Sekundärantikörper (Dako Anti-Rabbit-HRP – Agilent Technologies, Inc., USA) in TBS benutzt. Erneut wurde die Membran dreimal in TBS 0,1% Tween (10 Minuten) gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwicklung mittels des Bio-Rad ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA): hierzu wurden die Blots mit der Entwicklerlösung (Pierce ECL Western Blotting Substrate, ThermoFisher, USA) nach Herstellerangaben behandelt. Für die Aufnahmen am Bio-Rad ChemiDoc Imaging System wurden die Einstellungen „Colorimetric – Rapid Auto“ und „Chemiluminescence – Rapid Auto“ gewählt.

Im Anschluss wurde zur Quantifizierung der Proteinbanden die Membran mit dem Antikörper für alphaTubulin, das als Standard definiert wurde, inkubiert. Dazu wurde die Membran für 10 Minuten mit Roth® Stripping Buffer inkubiert und dann viermal mit TBS-0,1% Tween gewaschen. Die Membran wurde wieder für mindestens eine Stunde mit 5% Milchpulver-TBS blockiert. Danach wurde die Membran mit einem Maus-Anti-Tubulin-Antikörper (Tubulin-alpha Ab-2 Mouse Mab – ThermoFisher Scientific®, USA) in TBS über Nacht behandelt. Ein Waschvorgang mit TBS 0,1% Tween erfolgte am nächsten Tag. Es folgte die Inkubation mit Dako Anti-Mouse-HRP (Agilent Technologies, Inc., USA) auf TBS. Im Anschluss an drei erneute Waschvorgänge mit TBS 0,1% Tween für 10 Minuten wurde wieder auf analoge Weise eine Aufnahme mit dem Bio-Rad ChemiDoc Imaging System durchgeführt.

2.2.7 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt und die Nukleinsäure-Konzentration im Gerät NanoDrop 2000 quantifiziert.

2.2.8 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden von jeder Probe 1 µg RNA in 12 µl H₂O Gesamtvolumen gelöst und anschließend 2 µl WipeOut Puffer hinzugefügt, um DNA-Kontamination von den RNA-Proben zu eliminieren. Die cDNA-Herstellung erfolgte mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen.

2.2.9 Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

Die „Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction“ (qRT-PCR) erfolgte mit dem QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit der Firma Quiagen. Die cDNA-Probe wurde mit 550µl TE Puffer (pH 8) verdünnt. Auf der PCR-96-Well-Mikrotiterplatte wurden in jedem Well 23,5µl cDNA-Master-Mix und 1,5 µl der Primer gemischt, wobei für jede Probe Doubletten gemessen wurden. Die qRT-PCR wurde im Real Time Cycler wie folgt durchgeführt:

Tabelle 9: PCR-Zyklus

PCR – Zyklus:	
Einmalige Hitzeaktivierung: 95°C (15 Min.)	
40 Zyklen:	
• Denaturierung:	94°C (15 Sec.)
• Annealing:	55°C (30 Sec.)
• Extension:	72°C (30 Sec.)

Die Auswertung der ermittelten Ct-Werte erfolgte nach dem $\Delta\Delta\text{CT}$ -Verfahren:⁸¹ Hierbei wird der Mittelwert aus zwei Ct-Werten für eine Probe von einem Standardwert (Mittelwert aus zwei Ct-Werten für Act β 2) subtrahiert. Anschließend erfolgte die Subtraktion der standardisierten Ct-Werte (sCt-Wert) der Proben nach folgender Formel: sCt-Wert_{(Met-)-Medium} – sCt-Wert_{Vollmedium}. Letztendlich wurde dieser Wert in eine Potenzfunktion eingesetzt und berechnet:

$$2^{(\text{sCt-Wert}(\text{Met-})\text{-Medium} - \text{sCt-Wert}\text{Vollmedium})}$$

2.2.10 Messung der Interleukin-8-Konzentration

Zur Bestimmung der Interleukin-8-Konzentration wurden 10.000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte in Vollmedium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen für drei beziehungsweise sieben Tage mit Vollmedium oder Medium mit 1mg/l kultiviert. Nach der Versuchszeit wurde der Überstand abgenommen und bis zur Bestimmung der IL-8-Konzentration bei -20° C gelagert. Die IL-8-Konzentration wurde mit dem Human IL-8 ELISA Set der Firma BD Biosciences Pharmingen® untersucht.

Das Vorgehen erfolgte gemäß Herstellerprotokoll und soll hier in Kurzform skizziert werden: Zunächst wurde die ELISA-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) mit dem Capture-Antikörper (Anti-Human IL-8 monoclonal antibody) in „Coating Buffer“ entsprechend den Angaben des Herstellers über Nacht bei 4°C beschichtet. Am Folgetag wurde der Überstand verworfen, die Platten mit PBS-Tween dreimal gewaschen und anschließend mit 200µl „Assay Diluent“ (PBS mit 10% FCS) für eine Stunde blockiert. Anschließend erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschvorgang mit PBS-Tween. Die zuvor gewonnenen Überstände der Medien wurden aufgetaut und auf die ELISA-Platte aufgetragen. Als Positiv-Kontrolle diente der IL8-Standard des Kits entsprechend den Herstellerangaben. Die Überstände wurden für zwei Stunden auf der Platte inkubiert, verworfen und nach einem fünfmaligem Waschvorgang wurden die Platten mit 50µl „Working Detector“ (Biotinylated anti human IL8 1:250 und Enzym Avidin-horseradish Peroxidase 1:250 in Assay Diluent) inkubiert. Nach sieben Waschvorgängen mit PBS-Tween wurden pro Well 100µl Enzym-Substrat - 2:1 Mischung der Lösung A und B des „Substrat Packs“ der Firma BD Biosciences Pharmingen® - hinzugefügt. Die Reaktion wurde nach ca. 30 Minuten mit Stopp-Lösung (2NH₂SO₄) beendet. Zur Auswertung wurde das Photoabsorptionsgerät TECAN® Infinite F50 bei einer Wellenlänge von 450 nm benutzt und die Resultate zur Liganden-Standardkurve (berechnet durch lineare Regression) normalisiert. Des Weiteren wurde die gemessene Konzentration in Abhängigkeit von der Zellzahl bestimmt. Um die IL-8-Konzentration in Relation zur Zellzahl zu setzen, wurden die adhärenen Zellen Kristallviolett gefärbt und anschließend mit dem ELISA Reader TECAN® Infinite F50 bei einer Wellenlänge von 450 nm analysiert. Anschließend wurde der Quotient aus IL-8-Konzentration/relativer Zellzahl für jedes Well berechnet.

2.2.11 Statistik

Die Datenakquisition, Analyse und Darstellung erfolgte mit Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) und GraphPad Prism (version 9.1.2; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Alle Experimente wurden mindestens drei Mal wiederholt. Von diesen Wiederholungen wird je eine Repräsentative dargestellt. Für jedes Experiment gab es

mindestens Doppelwerte. Für diese Doppelwerte wurde die Standardabweichung mittels

der Formel $x = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}}$ berechnet.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wird der Einfluss der Methionin-Restriktion an ausgesuchten Zelllinien des HNSCC untersucht. Die Methionin-Restriktion erlaubt – wie einleitend beschrieben – die Induktion des „Low-Energy-Metabolismus“. Die Hypothese dieser Arbeit lautet, dass durch den „Low-Energy-Metabolismus“ Einfluss auf Zellproliferation, Inflammation, Autophagie und Wachstumshormone genommen werden kann. Im Folgenden werden die dazu durchgeführten Versuche beschrieben, beginnend mit einem ZytoTox-Assay, bei dem die Zellproliferation in Abhängigkeit von der Methionin-Konzentration untersucht wird.

3.1 Zellproliferation in Abhängigkeit von der Methionin-Konzentration

Zur Analyse der Zellproliferation in Abhängigkeit von der Methionin-Konzentration wurden in ersten Versuchen log₂-Verdünnungsreihen mit Methionin durchgeführt und die Zellproliferation nach 24, 48 und 72 Stunden mittels Zytotox analysiert.

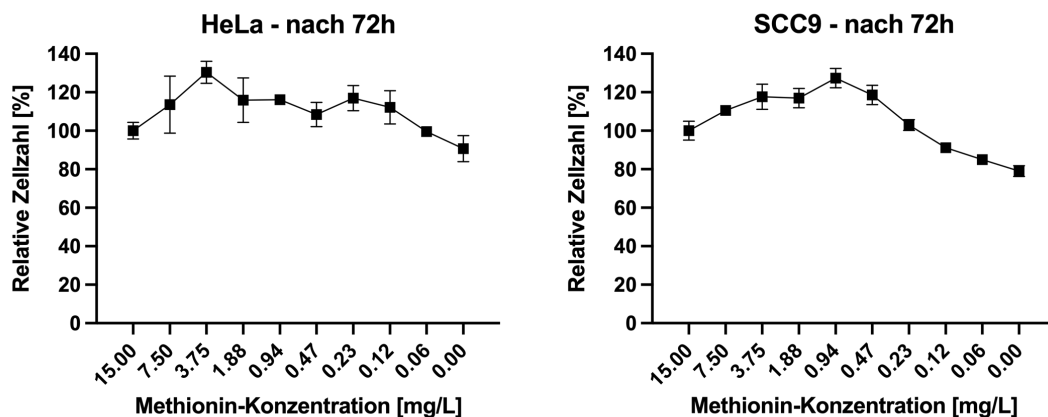


Abbildung 4: Zytotox-Analyse einer log₂-Verdünnungsreihe mit Methionin-haltigem Medium nach 72h. Es wurden 10.000 HeLa-Zellen/Well in Sechsfachansätzen in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen in einer log₂-Verdünnungsreihe mit Methionin-haltigem Medium inkubiert, wobei 100% einer Methionin-Konzentration von 15mg/l (Standardmedium) entspricht. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert.

In den exemplarisch dargestellten Diagrammen wird ersichtlich, dass sogar nach 72 Stunden nur eine geringe Inhibition der Proliferation unter Methionin-Restriktion zu erkennen war. Die log₂-Verdünnungsreihen mit Methionin wurden für die Zelllinien

HeLa und SCC9, wie oben beschrieben, zwei Mal durchgeführt. Für weitere Versuche wurde das Zeitfenster verlängert und die Methionin-Konzentration auf 0mg/l und 1mg/l festgelegt.

3.2 Analyse der Zellproliferation unter Methionin-Restriktion

In einem Zeitfenster von sieben Tagen erfolgte die Analyse der Zellproliferation mit Vollmedium und reduzierten Methionin-Konzentrationen von 0mg/L und 1mg/L für die Zelllinien HaCaT, FaDu, Detroit, HeLa, SCC9 und SCC25. Die Methionin-Restriktion hat zu unterschiedlichen Zeitpunkten Einfluss auf die Zellproliferation. Bereits nach drei Tagen ist bei der Zelllinie FaDu die relative Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Vollmedium deutlich verringert. Die relative Zellzahl liegt bei einer Methionin-Konzentration von 1mg/L bei 41,28% (+/-0,18) und bei 0mg/L 40,50% (+/-0,73). Ähnlich sieht es mit der Zelllinie Detroit aus; nach drei Tagen wird die relative Zellzahl auf 36,54% (+/-1,93) für 1mg/L Methionin und für 0mg/L Methionin auf 35,05% (+/-0,91) reduziert. Bei den Zelllinien HeLa und HaCaT ist eine Reduktion der relativen Zellzahl nach fünf Tagen zu erkennen. Folgende Werte konnten ermittelt werden: für HeLa bei 1mg/L Methionin auf 58,92% (+/- 7,94) und bei 0mg/L Methionin auf 40,51% (+/- 1,29); für HaCaT bei 1mg/L Methionin 47,99% (+/- 1,39) und bei 0mg/L Methionin auf 38,76% (+/- 3,92).

Tendenziell am längsten dauert es bei SCC9 und SCC25. Bei diesen Zelllinien wird die relative Zellzahl erst nach sieben Tagen deutlich reduziert. Die Zahlenwerte liegen bei 1mg/L für SCC9 bei 68,73% (+/-4,02) und für SCC25 bei 64,79% (+/-3,22). Für 0mg/L liegt die relative Zellzahl für SCC9 bei 60,72% und für SCC25 bei 50,25% (+/-4,05).

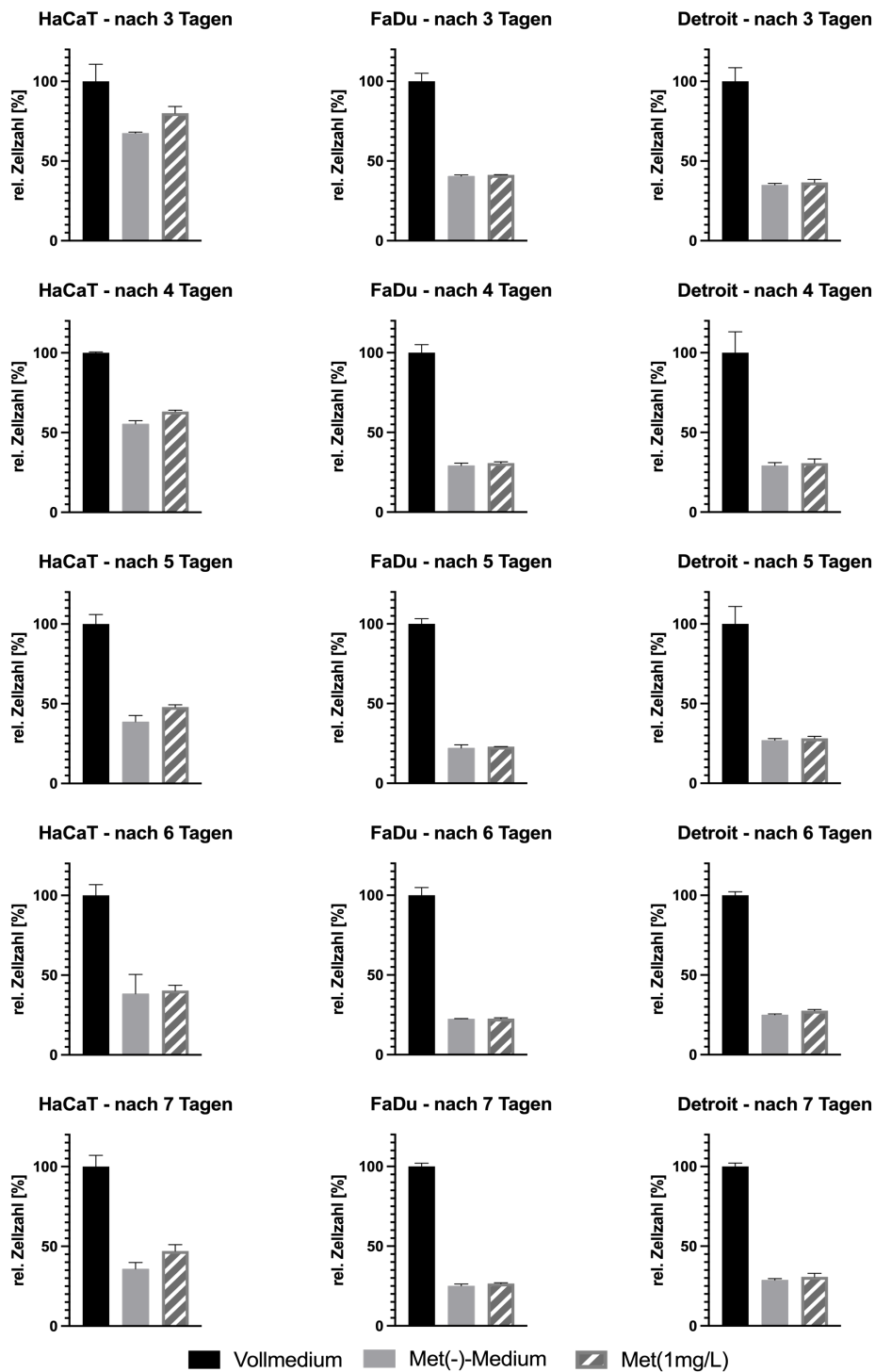


Abbildung 5a: Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium für die Zelllinien HaCaT, FaDu und Detroit. Es wurden 10.000 Zellen/Well in Dreifachansätzen in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Vollmedium, Medium mit einer Konzentration von 0 mg/l, sowie mit einer Konzentration von 1 mg/l inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels einer **Kristallviolett-Lebendfärbung** und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert.

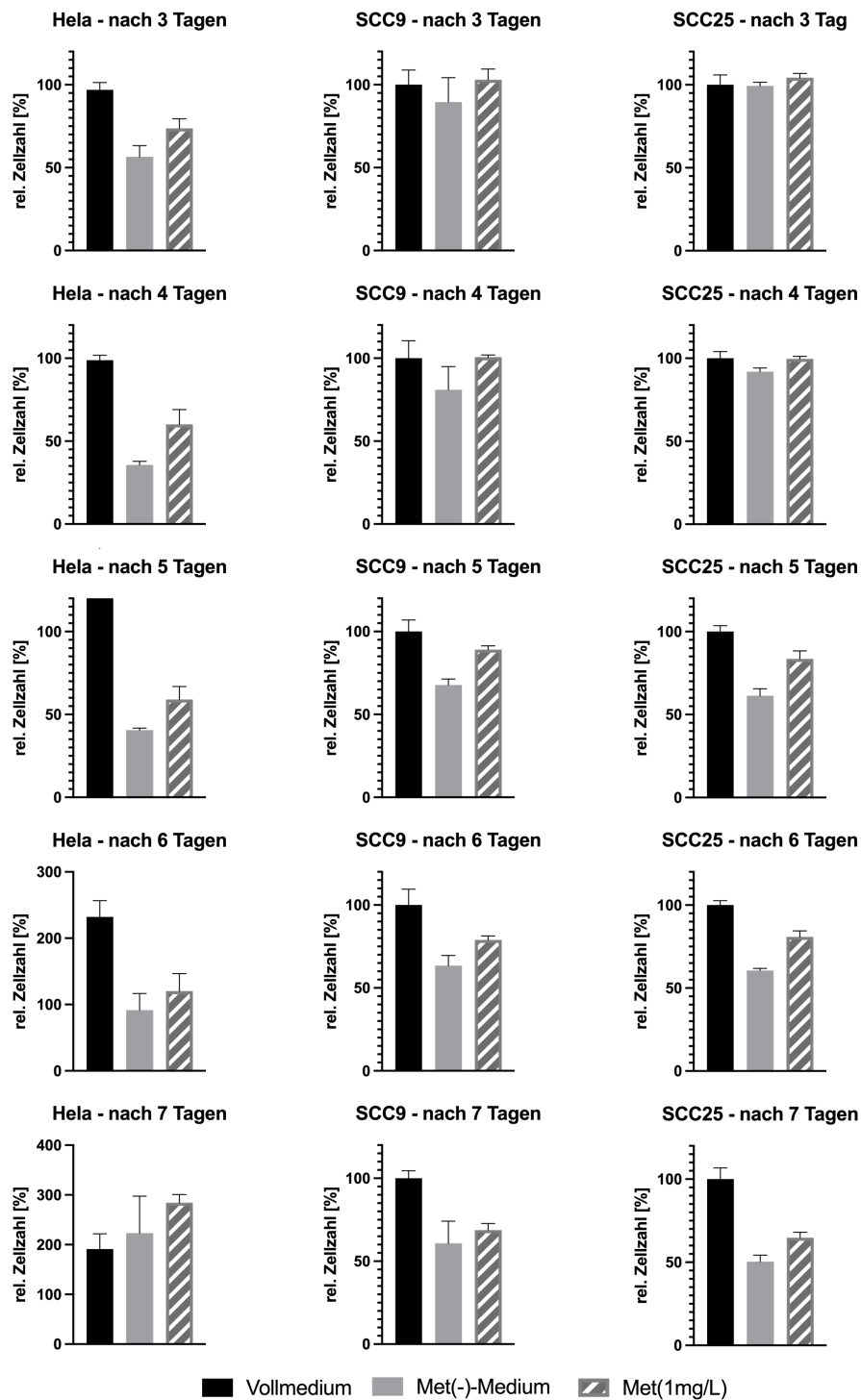


Abbildung 5b: Darstellung der relativen Zellzahl unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium für die Zelllinien HeLa, SCC9 und SCC25. Es wurden 10.000 Zellen/Well in Dreifachansätzen in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Vollmedium, Medium mit einer Konzentration von 0 mg/L und 1 mg/L inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert.

In den Diagrammen für HeLa ist zu erkennen, dass die relative Zellzahl nach sechs und sieben Tagen unter Vollmedium kleiner ist als unter Methionin-Restriktion. Dies ist auf die starke Proliferation und das nachfolgende Absterben der Zellen zurückzuführen.

3.3 Analyse der Auswirkungen der FCS-Konzentration auf die Proliferation unter Methionin-Restriktion

Die Zellen wurden in einem Kulturmedium gehalten, zu dem standardisiert 10% Fetales Kälber Serum (FCS) hinzugefügt wurde. Da Aminosäuren per se über das Blut transportiert werden, kann das aus Blut gewonnene FCS also als Methioninquelle dienen. Entsprechend wurden die Proliferations-Versuche für unterschiedliche FCS-Konzentrationen (0% FCS, 1% FCS und 10% FCS) durchgeführt, um zu testen, ob das im FCS enthaltene Methionin eventuell die Methionin-Restriktion und somit die Inhibition der Proliferation kompensieren kann.

In den folgenden Versuchen (Abbildung 6-8) wird die relative Zellzahl unter Methionin-Restriktion (0 mg/L oder 1 mg/L) bei 0%, 1% und 10% FCS im Vergleich zum Vollmedium in dem Zeitraum von drei bis sieben Tagen dargestellt.

Die Zellproliferation der Keratinozyten HaCaT wird unter 0%, 1% und 10% FCS gehemmt. Mit einer Konzentration von 1mg/ml wird unter der Standard-FCS-Konzentration von 10% die Zellproliferation nach 5 Tagen auf 47,99% im Vergleich zum Vollmedium reduziert. Eine totale Methionin-Restriktion führt nach 5 Tagen sogar zu einer Reduktion auf 38,76%. Im Vergleich dazu, wirkt sich die Methionin-Restriktion unter 0% und 1% FCS weniger deutlich aus.

Die Plattenepithelkarzinom-Zelllinien FaDu und Detroit reagierten unter 10% FCS-Zusatz schon nach drei Tagen mit einer deutlichen Reduktion der Zellproliferation. Mit einer Methionin-Konzentration von 1mg/L wird FaDu auf 41,28% und Detroit auf 36,54% reduziert. Unter den anderen FCS-Konzentrationen hat die Methionin-Restriktion keinen oder nur einen geringen Einfluss.

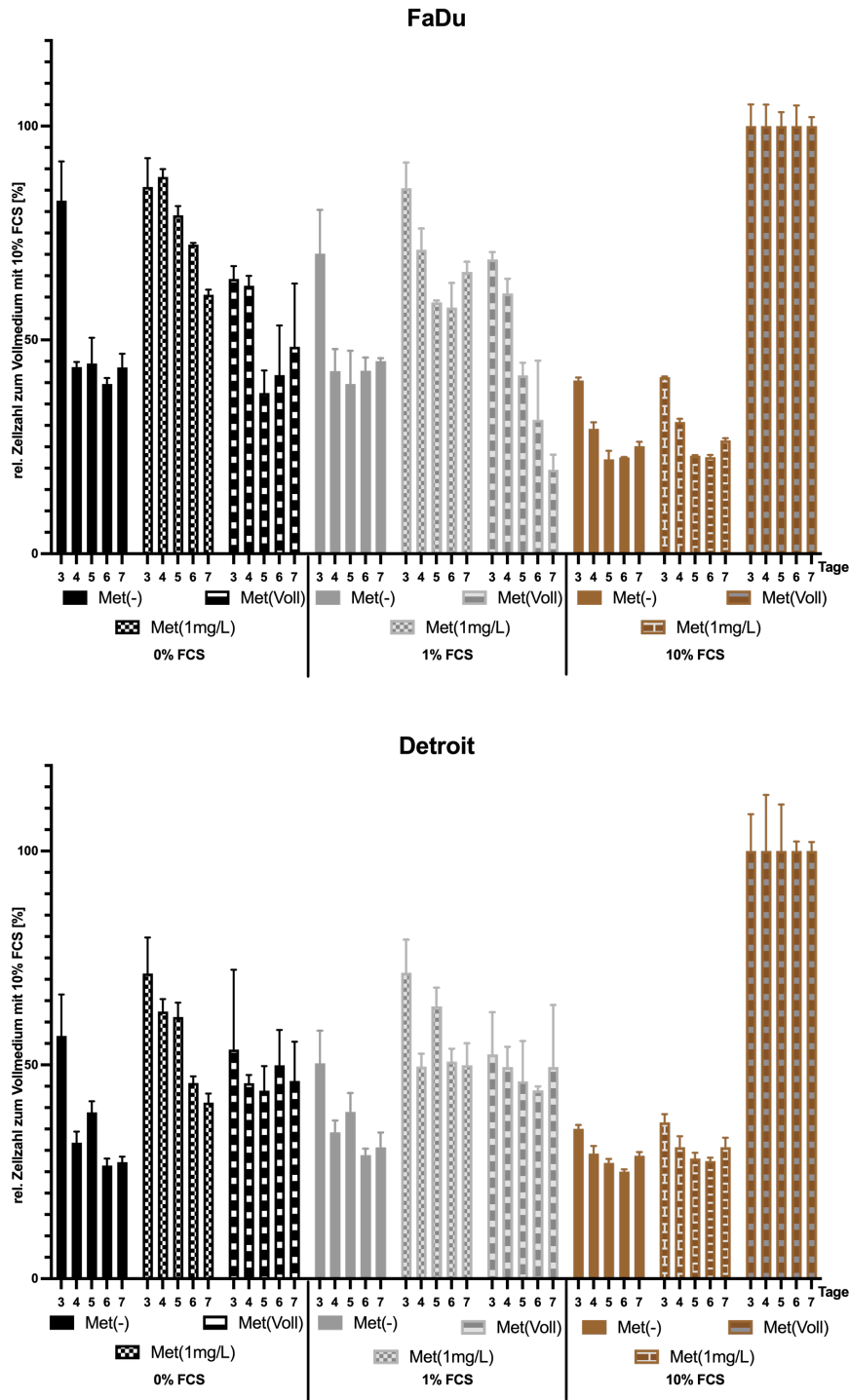


Abbildung 6: Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium mit verschiedenen FCS-Konzentrationen (0%, 1%, 10%) für die Zelllinien FaDu und Detroit für 3 bis 7 Tage. Es wurden 10.000 Zellen/Well in Dreifachansätzen in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Vollmedium, Medium mit einer Konzentration von 0 mg/l, sowie mit einer Konzentration von 1 mg/l inkubiert. Diese drei Ansätze wurden jeweils mit einer FCS-Konzentration von 0%, 1% und 10% durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die relativen Werte eines Tages sind jeweils auf den zugehörigen Kontrollwert (10% FCS; Met(Voll)) normiert, der als 100% gesetzt wurde. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert.

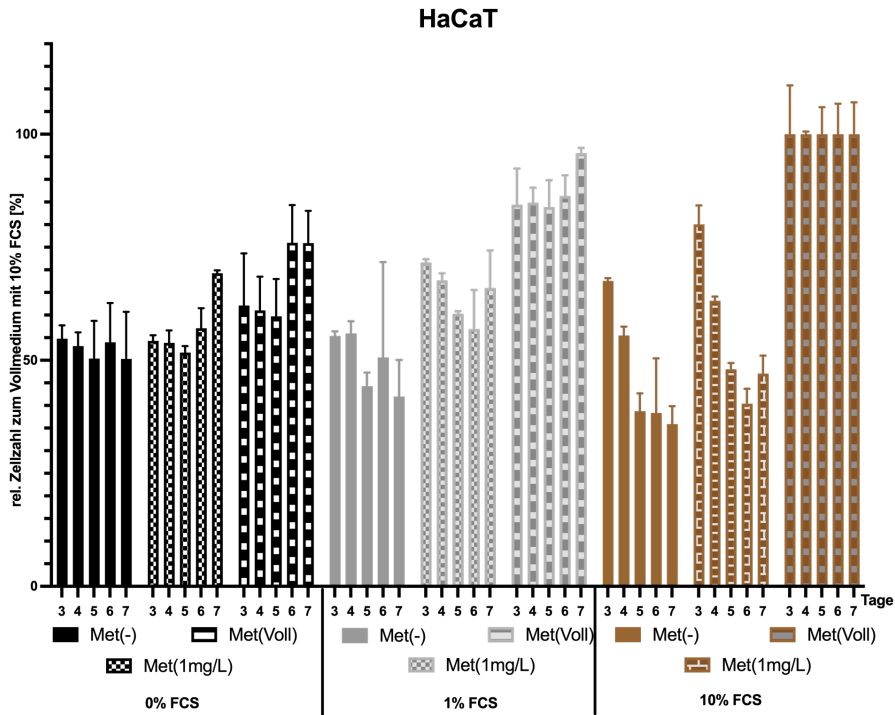
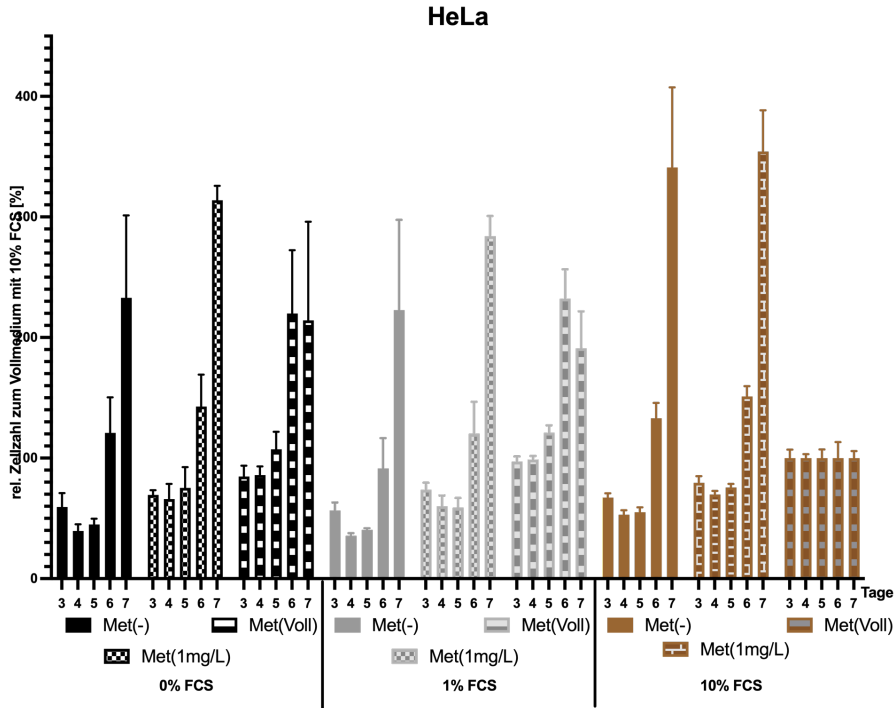


Abbildung 7: Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium mit verschiedenen FCS-Konzentrationen (0%, 1%, 10%) für die Zelllinien HeLa und HaCaT für 3 bis 7 Tage. Es wurden 10.000 Zellen/Well in Dreifachansätzen in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Vollmedium, Medium mit einer Konzentration von 0 mg/l, sowie mit einer Konzentration von 1 mg/l inkubiert. Diese drei Ansätze wurden jeweils mit einer FCS-Konzentration von 0%, 1% und 10% durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die relativen Werte eines Tages sind jeweils auf den zugehörigen Kontrollwert (10% FCS; Met(Voll)) normiert, der als 100% gesetzt wurde. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert.

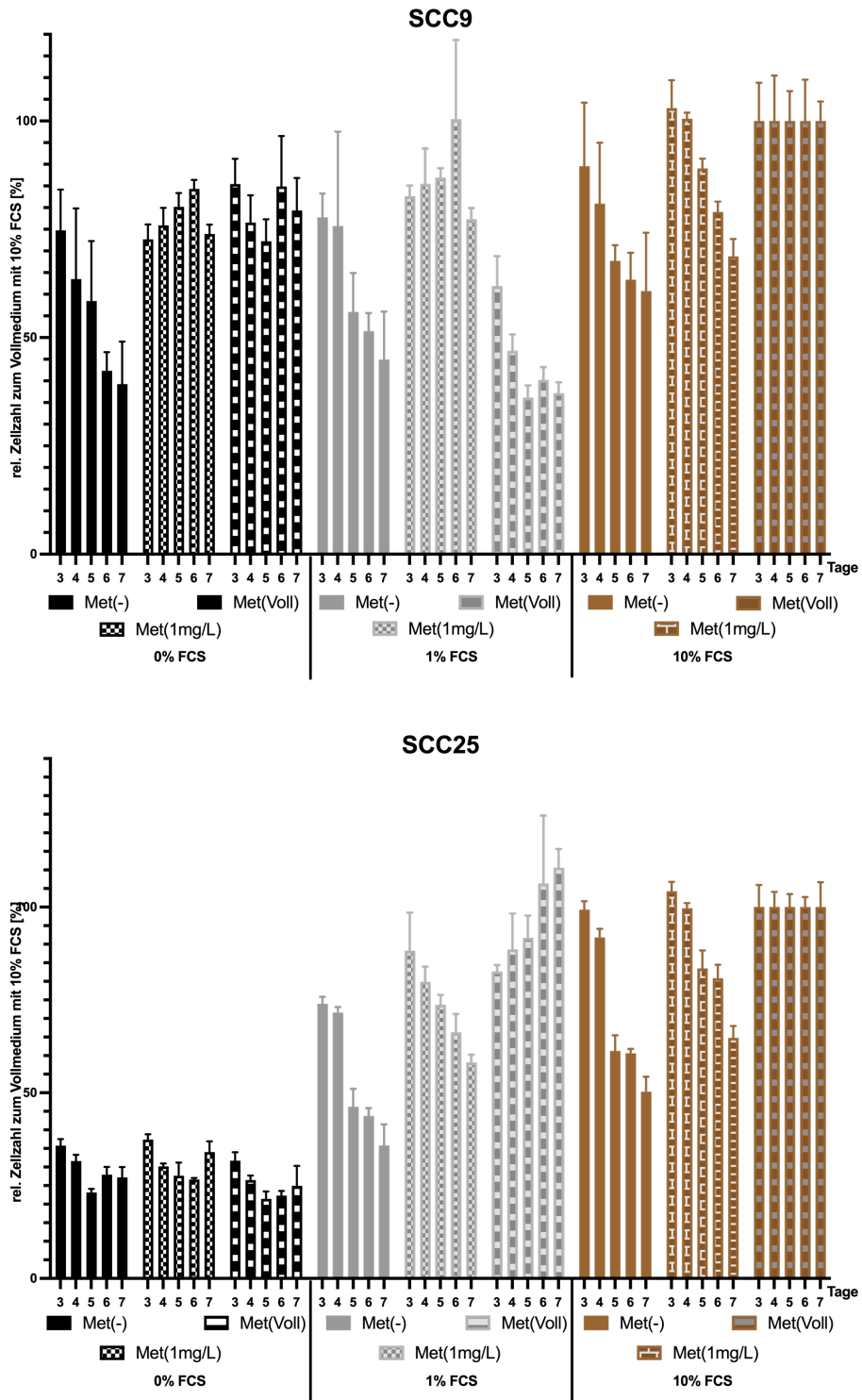


Abbildung 8: Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium mit verschiedenen FCS-Konzentrationen (0%, 1%, 10%) für die Zelllinien SCC9 und SCC25 für 3 bis 7 Tage. Es wurden 10.000 Zellen/Well in Dreifachansätzen in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Vollmedium, Medium mit einer Konzentration von 0 mg/l, sowie mit einer Konzentration von 1 mg/l inkubiert. Diese drei Ansätze wurden jeweils mit einer FCS-Konzentration von 0%, 1% und 10% durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die relativen Werte eines Tages sind jeweils auf den zugehörigen Kontrollwert (10% FCS; Met(Voll)) normiert, der als 100% gesetzt wurde. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert.

Die Zelllinie HeLa zeigte unter Zusatz von 10% FCS nach fünf Tagen nur eine Reduktion auf 75,54% mit 1mg/l Methionin. Im Gegensatz dazu führte die Kultivierung mit nur 1% FCS zu einer Reduktion der Zellproliferation mit Met(1mg/l) auf 58,92%.

Die Plattenepithelkarzinom-Zelllinien SCC9 und SCC25 zeigten erst nach sieben Tagen ein deutliches Ansprechen auf die Methionin-Restriktion. SCC9 wurde nach sieben Tagen auf 68,73% mit einem FCS-Zusatz von 10% gehemmt. SCC25 wurde auf 64,79% bei einer FCS-Konzentration von 10% gehemmt.

Zusammenfassend wird aus dem Versuch deutlich, dass FCS-Entzug prinzipiell die Zellproliferation hemmt. In der Regel reichen allerdings 1mg/ml Methionin, um die antiproliferativen Effekte des FCS zu kompensieren. Unter Betrachtung des relativen Verhältnisses funktioniert der antiproliferative Effekt durch Methionin-Restriktion gleich gut unter 10% FCS wie unter FCS-Restriktion. HeLa stellt dabei eine Ausnahme dar. Aus den oben dargestellten Ergebnissen wurden für jede Zelllinie der möglichst optimale Zeitraum und Konzentration für die Methionin-Restriktion analysiert. Zum Überblick werden im Folgenden die relevanten Daten herausgegriffen und graphisch illustriert.

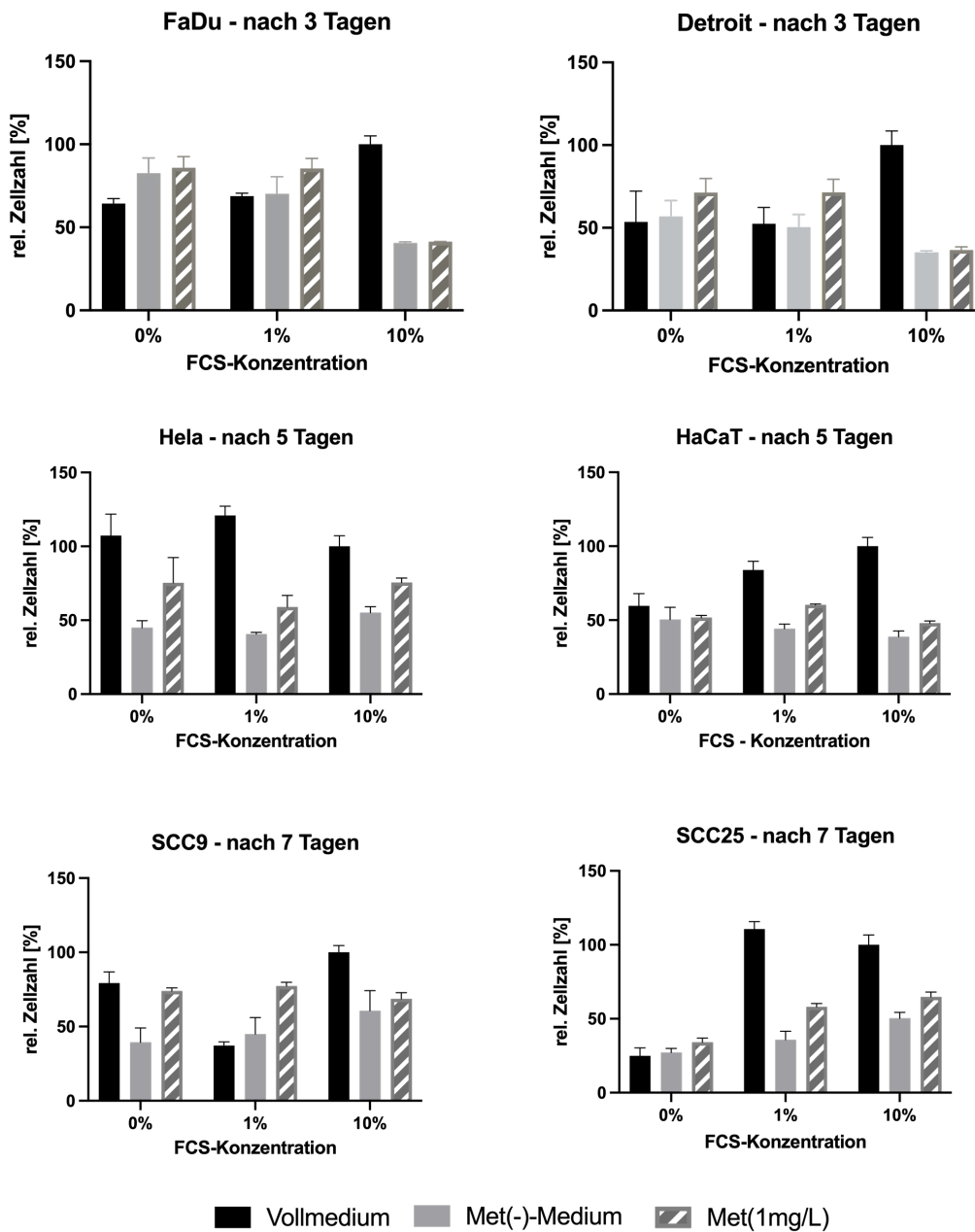


Abbildung 9: Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium mit verschiedenen FCS-Konzentrationen (0%, 1%, 10%). Es wurden 10.000 Zellen/Well in Dreifachansätzen in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit Vollmedium, Medium mit einer Konzentration von 0 mg/l sowie mit einer Konzentration von 1 mg/l inkubiert. Diese drei Ansätze wurden jeweils mit einer FCS-Konzentration von 0%, 1% und 10% durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert.

Diese Versuchsergebnisse wurden genutzt, um folgende Standard-Konzentrationen für weitere Versuche festzulegen:

Tabelle 10: Auflistung der Standard-Konzentrationen für die folgenden Versuche

Zelllinie	Dauer	FCS	Methionin
FaDu	3 Tage	10%	1 mg/ml
Detroit	3 Tage	10%	1 mg/ml
Hela	5 Tage	1 %	1 mg/ml
HaCaT	5 Tage	10%	1 mg/ml
SCC9	7 Tage	10%	1 mg/ml
SCC25	7 Tage	10%	1 mg/ml

3.4 Betrachtung der Autophagie-Induktion unter Methionin-Restriktion

Mit Hilfe des LC3B-Antikörpers wurden die Zellen nach Stimulation mit Met(-)-Medium und Vollmedium auf Autophagie analysiert, nachdem die Zellen für 3 (FaDu, Detroit), 5 (HeLa, HaCaT) und 7 Tage (SCC9, SCC25) unter Methionin-Restriktion (siehe Standardbedingungen) und Vollmedium zur Kontrolle kultiviert worden waren. LC3B ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das häufig zur Betrachtung der Autophagie eingesetzt wird. Hierbei wird die Konversion von LC3B-I in LC3B-II untersucht, da LC3B-II mit der Menge an Autophagosomen assoziiert ist.^{82,83} Somit bietet es einen ersten Anhalt, inwieweit die Methionin-Restriktion zur Induktion der Autophagie führt. Der Versuch wurde drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Die erste Lane entspricht dem Marker. Die weiteren Lanes sind wie folgt angeordnet:

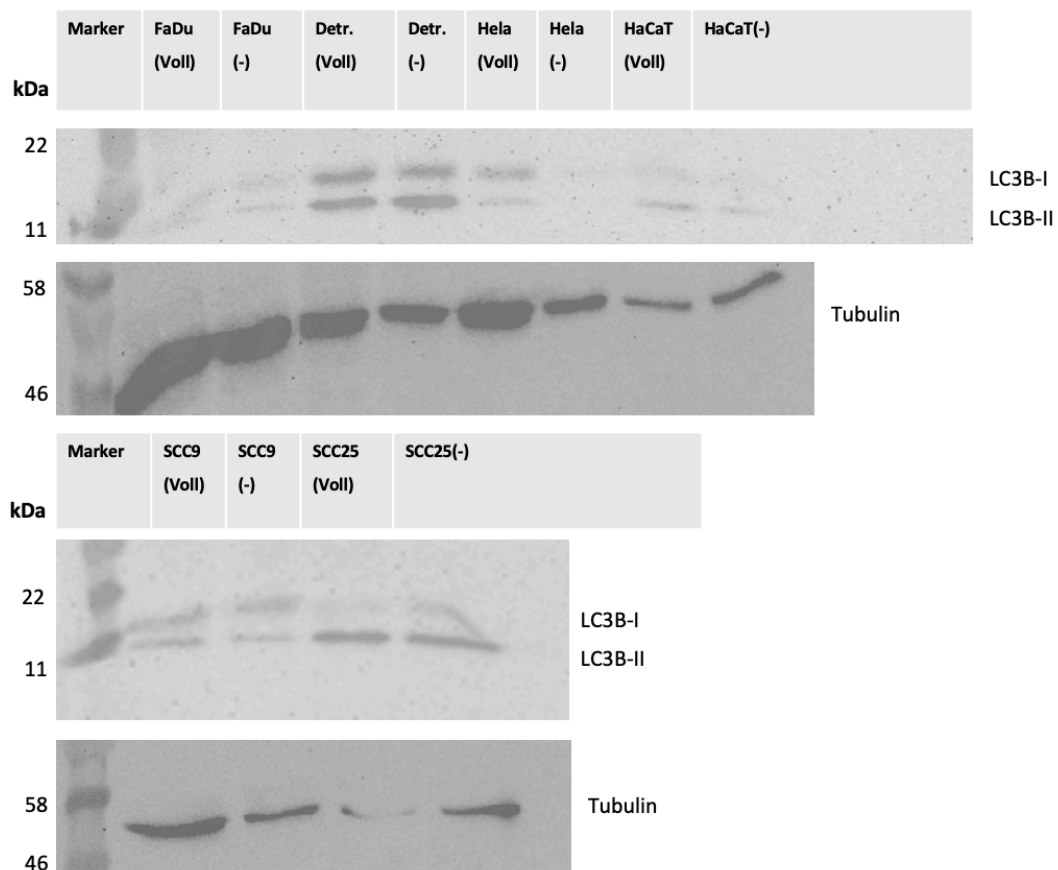


Abbildung 10: Betrachtung der Banden für LC3B und Tubulin im Western-Blot nach dem die Zellen für 3 (FaDu, Detroit), 5 (HeLa, HaCaT) und 7 Tage (SCC9, SCC25) unter Methionin-Restriktion (siehe Standardbedingungen) und Vollmedium zur Kontrolle kultiviert wurden.

Für die Zelllinien FaDu, Detroit und HaCaT erscheint die Bande für LC3B etwas intensiver angereichert unter Methionin-Restriktion. Dies würde auf eine verstärkte Induktion der Autophagie hindeuten. Allerdings erscheint dieses Bandenmuster nicht eindeutig, wenn der Standard Tubulin miteinbezogen wird. Insbesondere ist für die Zelllinien Hela, SCC9 und SCC25 kein deutlicher Unterschied auszumachen. Anhand des Westernblots lässt sich keine eindeutige Aussage treffen, ob es durch die Methionin-Restriktion zur Induktion der Autophagie kommt. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Autophagie stellt die PCR-Analyse dar.

3.5 Analyse der Genexpression ausgesuchter Gene mittels RT-PCR unter Methionin-Restriktion

Mittels semiquantitativer Real-Time-PCR wurde die relative Expression der Gene für IGF-1, IGFBP1 und LC3B ermittelt. Insulin-like-Growth-Factor-1 (IGF-1) ist ein Hormon, das einen wesentlichen Einfluss auf die Regulation des Zellwachstums hat. Insulin-like-Growth-Factor-Binding-Protein-1 (IGFBP1) ist ein Protein, das IGF-1 bindet, als Transportprotein für IGF-1 dient und dessen Halbwertszeit verlängert. Das Mikrotubuli-assoziierte Protein LC3B dient – wie oben beschrieben – zum Monitoring der Autophagie. Beta-Actin wurde als Standard genutzt und die relative Expression mit $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet. Dargestellt werden die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen (V1-V3).

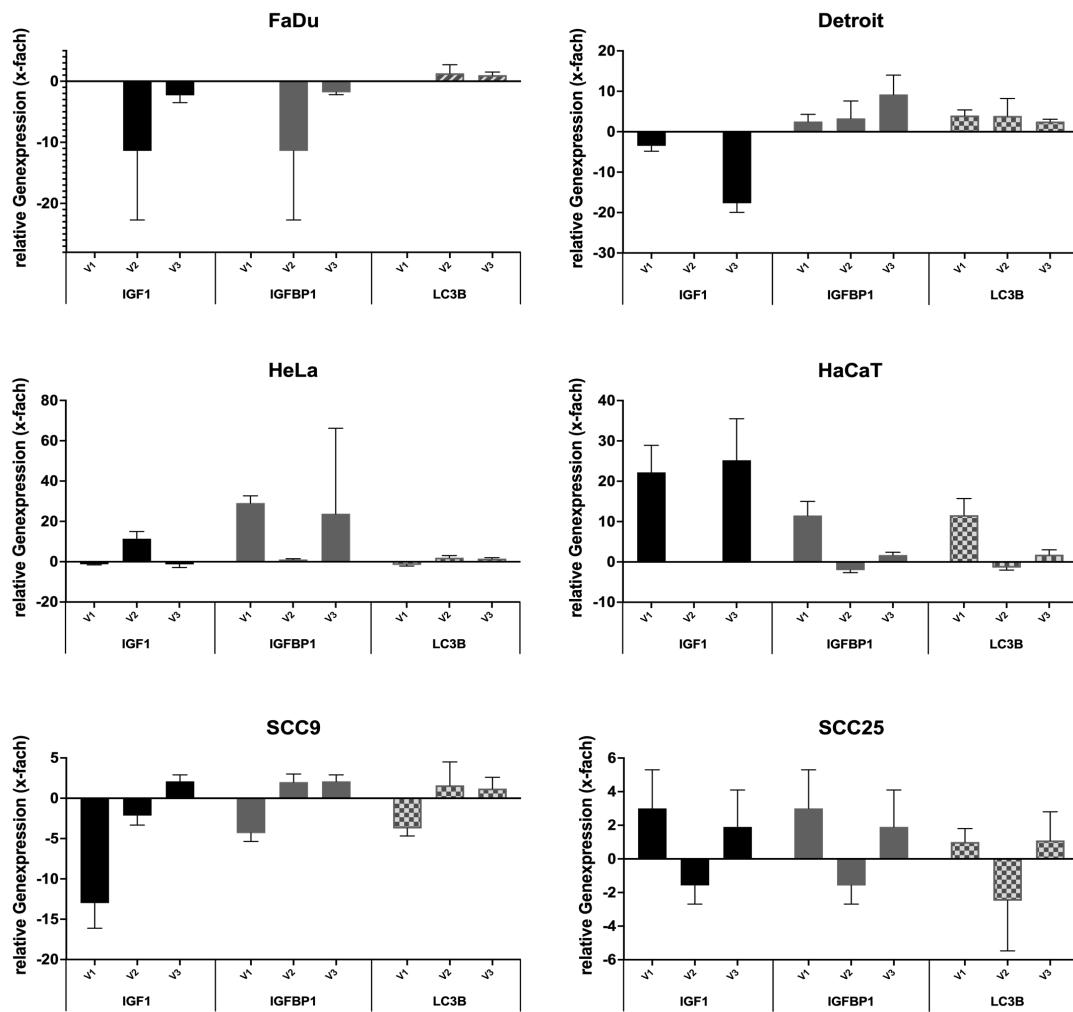


Abbildung 11: PCR-Analyse der Zelllinien FaDu, Detroit, HeLa, HaCaT, SCC9 und SCC25. Jeweils 100.000 Zellen/well wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit oder ohne Methionin inkubiert (FaDu, Detroit für 3 Tage; HeLa, HaCaT für 5 Tage; SCC9, SCC25 für 7 Tage). Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die relative Expression wurde mittels Real-Time-PCR und SYBR-Green für die Gene IGF-1, IGFBP1, LC3B bestimmt. Als Standard diente beta-Actin zu dem jeweils die relative Expression mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode bestimmt wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (V1-V3).

Die Zelllinien reagieren auf RNA-Ebene unterschiedlich stark auf die Methionin-Restriktion. IGF-1 wird in den Zelllinien FaDu, Detroit, HeLa, SCC9 in zwei von drei unabhängigen Versuchen herabreguliert. IGFBP1 wird in den Zelllinien Detroit, HeLa, HaCaT, SCC9 und SCC25 heraufreguliert. LC3B wird in den Zelllinien Detroit, HeLa, HaCaT, SCC9 und SCC25 verstärkt exprimiert.

3.6 Einfluss der Methionin-Restriktion auf die Interleukin-Sekretion

Zytokine, wie zum Beispiel Interleukin-8, ein entzündliches Milieu sowie Proliferation und Angiogenese gelten allgemein als Tumor-fördernd. Im folgenden Versuch soll analysiert werden, ob die Methionin-Restriktion die Sekretion von Zytokinen reguliert. Hierzu wurde das Zytokin Interleukin-8 genauer betrachtet, eines der zentralen Proteine im Zusammenhang mit der Inflammation. Zur Bestimmung der Interleukin-8-Konzentration wurden 10.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Medien wurden nach 24 Stunden gewechselt und die Zellen mit Vollmedium oder Met(1 mg/l) inkubiert. Nach drei und sieben Tagen wurde der Überstand abgenommen und die IL-8-Konzentration mit dem „Human IL-8-ELISA Set“ bestimmt. Um die IL-8-Konzentration in Relation zur Zellzahl zu setzen, wurden die adhärennten Zellen nach der Abnahme des Überstandes Kristallviolett gefärbt und anschließend mit dem ELISA Reader TECAN® Infinite F50 bei einer Wellenlänge von 405nm analysiert.

Nach drei Tagen ist zu erkennen, dass die Interleukin-8-Sekretion in Abhängigkeit von der Zellzahl für alle Zelllinien unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell erhöht ist (siehe Abbildung 12). Besonders auffällig sind FaDu und Detroit, die unter Methionin-Restriktion ca. die 3-fache bzw. 2,5-fache IL-8-Konzentration ausschütten. Die Zelllinien SCC9 und SCC25 zeigen im Hinblick auf SCC9 und SCC25 kaum eine Veränderung.

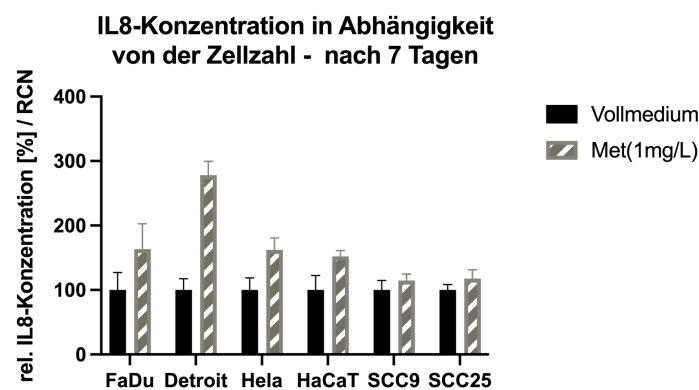
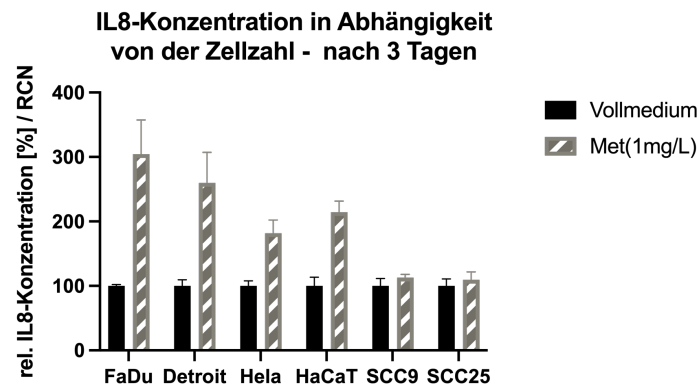


Abbildung 12: Darstellung der Interleukin-8-Konzentration in Vollmedium und Medium mit 1mg/l in Relation zur relativen Zellzahl (RCN) nach 3 und 7 Tagen. Es wurden 10.000 Zellen/Well in Dreifachansätzen in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Nach 24h erfolgte ein Medium-Wechsel, das heißt die Zellen wurden erneut mit Vollmedium kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen mit Vollmedium und Medium mit einer Konzentration von 1 mg/l inkubiert. Nach drei/sieben Tagen wurde der Überstand des Mediums abgenommen und die IL-8-Konzentration mit dem Human IL-8-ELISA Set bestimmt. Um die IL-8-Konzentration in Relation zur Zellzahl zu setzen, wurden die adhärennten Zellen Kristallviolett gefärbt und anschließend mit dem ELISA Reader TECAN® Infinite F50 bei einer Wellenlänge von 405nm analysiert. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert. Die Auswertung erfolgte nach folgender Formel: $(\text{IL-8-Extinktion/Zellzahl})_{\text{Met}(1\text{mg/l})} / (\text{IL-8-Extinktion/Zellzahl})_{\text{Vollmedium}} * 100\%$.

Auch nach sieben Tagen ist die relative Interleukin-8-Konzentration für alle Zelllinien tendenziell erhöht. FaDu und Detroit zeigen weiterhin die stärkste Veränderung in der Interleukin-8-Konzentration, gefolgt von Hela und HaCaT.

3.7 Auswirkung der Methionin-Restriktion auf die Wirksamkeit von Cisplatin

Um die Auswirkung der Methionin-Restriktion mit einem Zytostatikum zu untersuchen, wurden die Zellen mit Vollmedium oder Met-(1mg/ml) in Kombination mit Cisplatin mit einer Ausgangskonzentration von 100µM in einer log₂-Verdünnungsreihe behandelt.

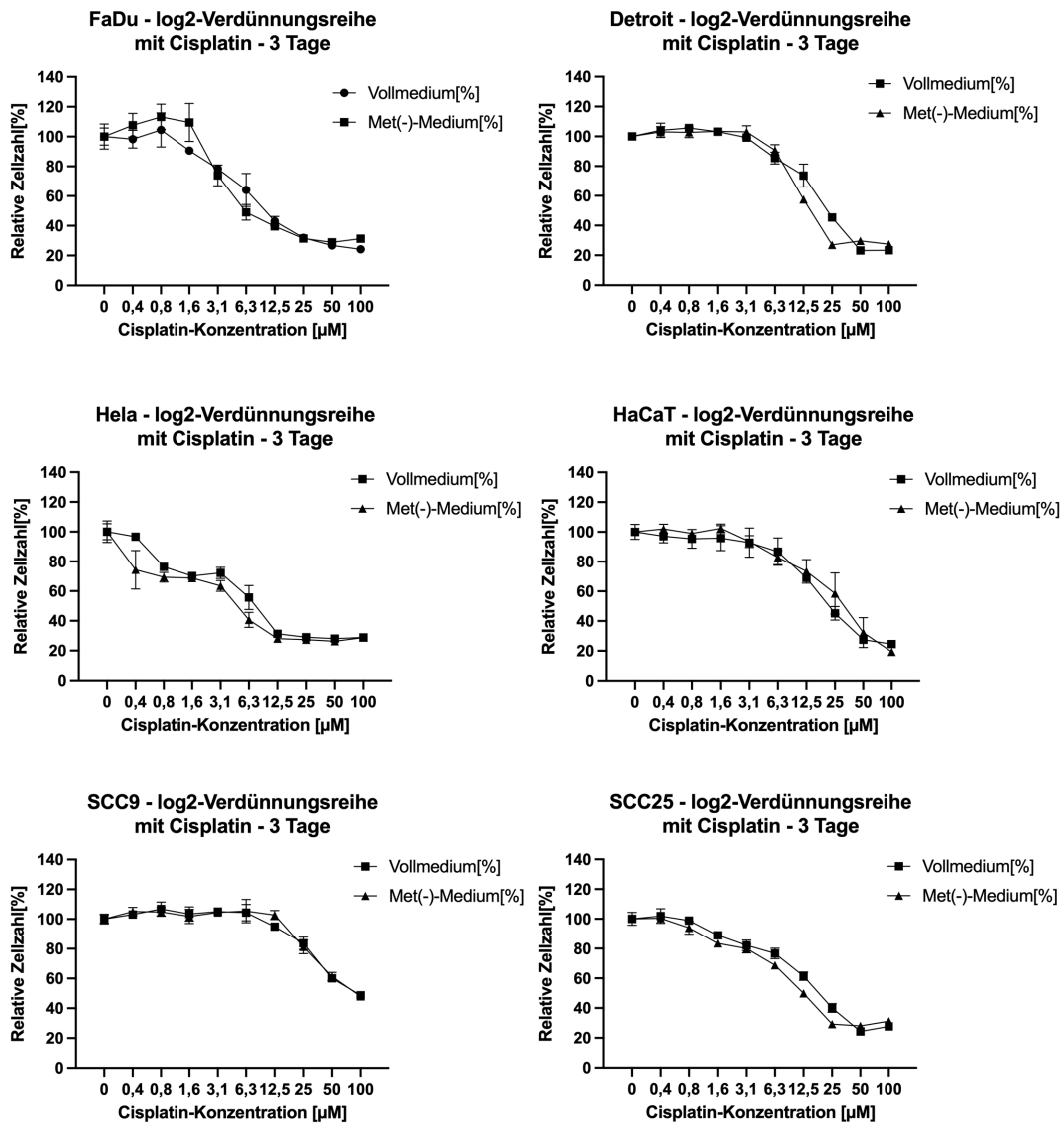


Abbildung 13: log₂-Verdünnungsreihe mit Cisplatin (Ausgangskonzentration von 100µM) für alle Zellreihe (10.000 Zellen/well) nach 3 Tagen. Es wurden 10.000 Hela-Zellen/Well in Dreifachansätzen in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen in einer log₂-Verdünnungsreihe mit Cisplatin (Ausgangskonzentration 100µM) inkubiert. Für die eine Gruppe wurde das Cisplatin in Medium mit einer Methionin-Konzentration von 1mg/l hinzugegeben. Für die Kontrollgruppe wurde Cisplatin in Vollmedium verabreicht. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert.

Es wurden alle Zellreihen nach 3 Tagen analysiert. Unter diesen Bedingungen zeigte sich nur ein geringfügiger Unterschied zwischen Methionin-Restriktion und Vollmedium. Da die Methionin-Restriktion Zeit benötigt, um ihre Auswirkung zu entfalten, wurden die Analysezeitpunkte passend zu den oben bestimmten Standardbedingungen gewählt. Es wurden die Zellen FaDu und Detroit nach drei Tagen, HeLa und HaCaT nach fünf Tagen, SCC9 und SCC25 nach sieben Tagen analysiert. Hiermit sollte - gemäß der vorab durchgeführten Versuche - die Methionin-Restriktion zu diesem Zeitpunkt ihre Wirkung für die jeweilige Zelllinie entfaltet haben.

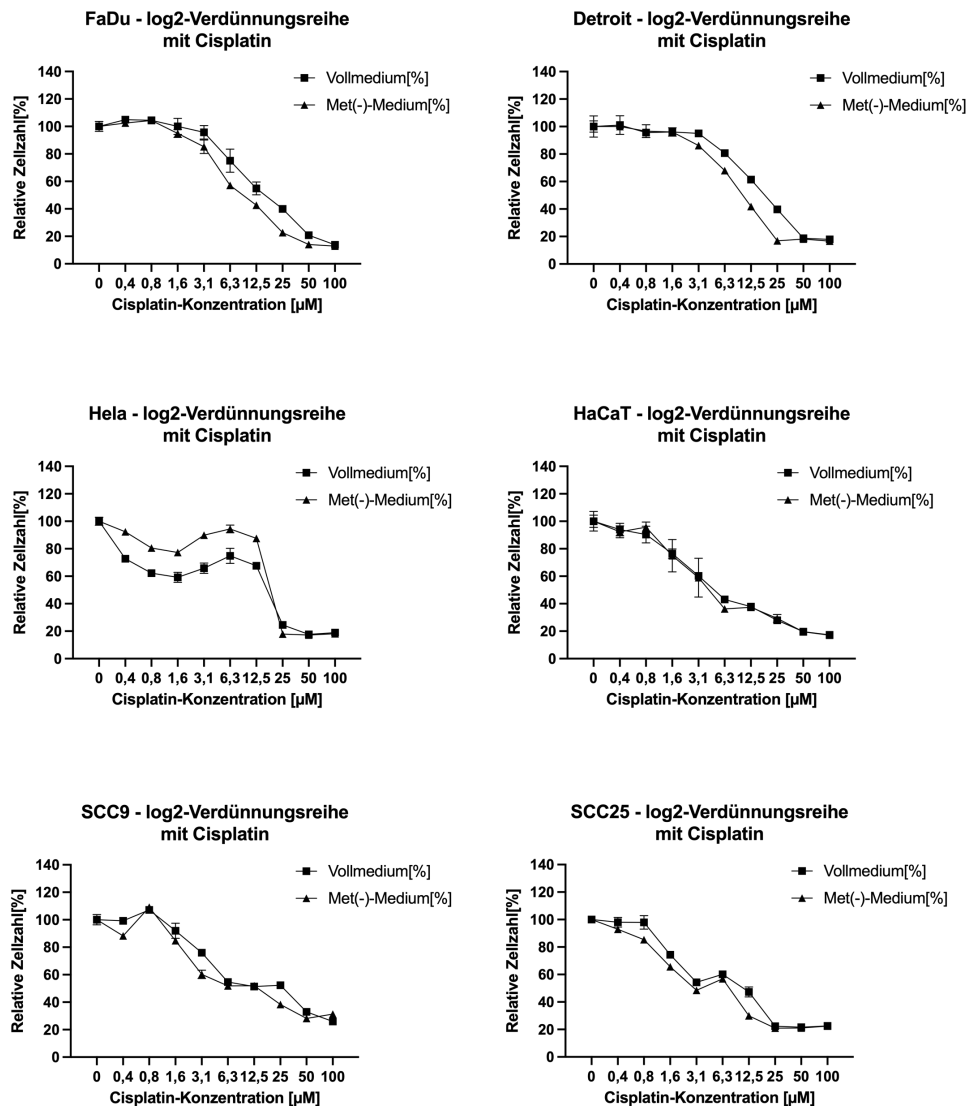


Abbildung 14: log₂-Verdünnungsreihe mit Cisplatin (Ausgangskonzentration von 100µM) für alle Zellreihen (10.000 Zellen/well) nach Standardbedingungen (FaDu, Detroit 3 Tage; HeLa, HaCaT 5 Tage; SCC9, SCC25 7 Tage). Es wurden 10.000 HeLa-Zellen/Well in Dreifachansätzen in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen in einer log₂-Verdünnungsreihe mit Cisplatin (Ausgangskonzentration 100µM) inkubiert. Für die eine Gruppe wurde das Cisplatin in Medium mit einer Methionin-Konzentration von 1mg/l hinzugegeben. Für die Kontrollgruppe wurde Cisplatin in Vollmedium verabreicht. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert.

Die Zelllinien FaDu, Detroit und HeLa zeigen eine marginale Senkung der notwendigen Cisplatin-Konzentration zur Zellzahlreduktion im Vergleich zur Kontrolle. Für die Zelllinien HaCaT, SCC9 und SCC25 verlaufen die beiden Kurven der Verdünnungsreihe nahezu identisch. Auf diese Zelllinien scheint die Methionin-Restriktion keine relevanten Auswirkungen zu haben.

3.8 Versuche mit Ethionin zur Hemmung der Zellproliferation

In den folgenden Versuchen wurde das Methionin-Analogon Ethionin verwendet und die Auswirkungen auf die Zellproliferation untersucht. Es wurden wieder 10.000 Zellen/Well in Kulturmedien mit unterschiedlichen Methionin- und Ethionin-Konzentrationen inkubiert.

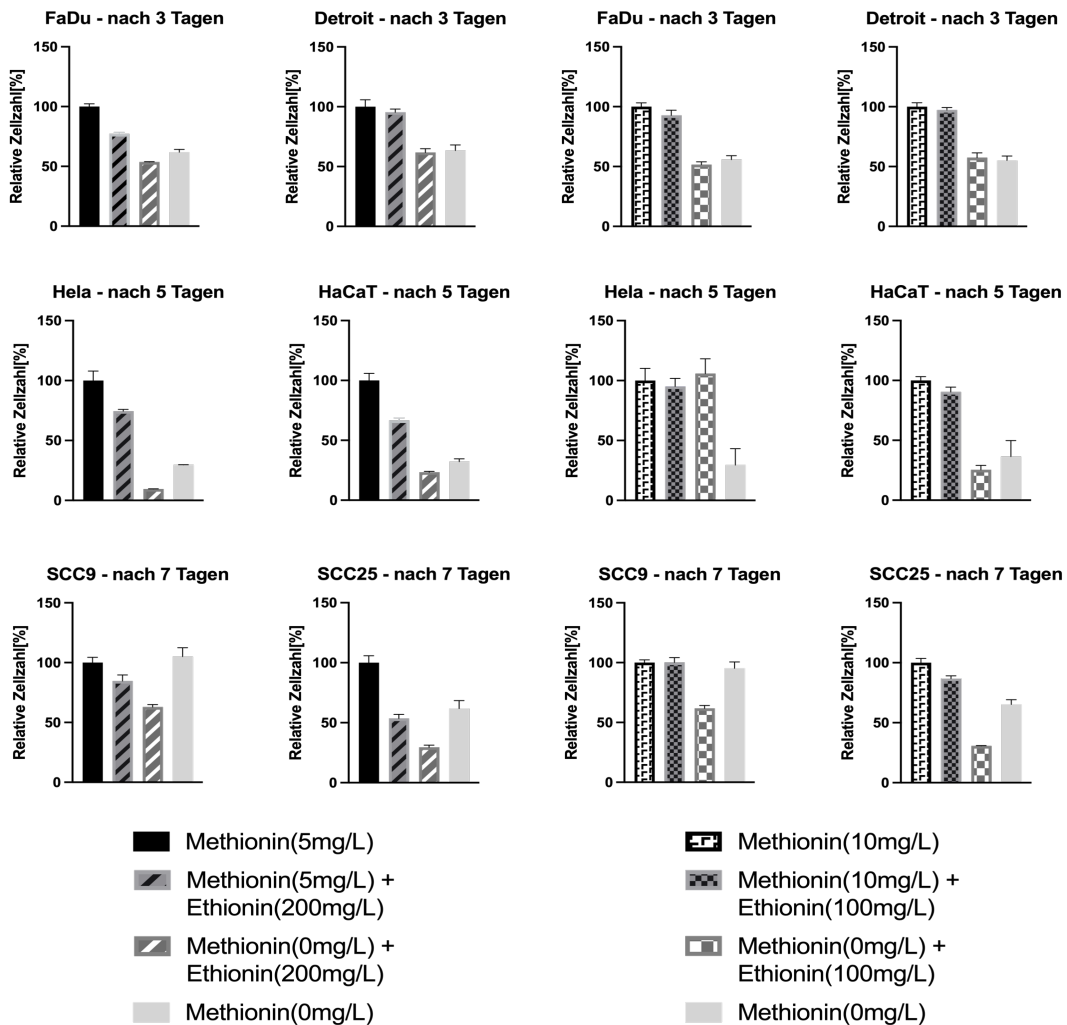


Abbildung 15: Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Einfluss des Methionin-Analogons Ethionin (10.000 Zellen/Well). FaDu, Detroit 3 Tage; HeLa und HaCaT 5 Tage; SCC9 und SCC25 7 Tage. Es wurden 10.000 Zellen/Well in Dreifachansätzen in einer 96er-Well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit folgenden Medienkonzentrationen inkubiert: Methionin (5mg/l); Methionin (5mg/l)+Ethionin(200mg/l); Methionin(0mg/l) + Ethionin(200mg/l); Methionin(0mg/l); Methionin (10mg/l); Methionin (10mg/l)+Ethionin(100mg/l); Methionin(0mg/l) + Ethionin(100mg/l); Methionin(0mg/l). Die Auswertung erfolgte mittels einer Kristallviolett-Lebendfärbung und im Anschluss die photometrische Auswertung im Elisa Reader. Die Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten reproduziert.

FaDu und Detroit wurden nach 3 Tagen, Hela und HaCaT nach 5 Tagen, sowie SCC9 und SCC25 nach 7 Tagen ausgewertet. Einerseits wurden die Zellen mit der 10-/40-fachen Menge an Ethionin inkubiert. Andererseits wurden Zellen zur Kontrolle mit der 10-/40-fachen Menge an Ethionin kultiviert. Außerdem gab es eine Gruppe, die unter kompletter Methionin-Restriktion gehalten wurde.

Als Kontrolle wurde eine Gruppe mit 10 mg/l bzw. 5 mg/l Methionin verwendet, da davon ausgegangen werden kann, dass diese Menge an Methionin für ein normales Zellwachstum völlig ausreichend ist. Zum anderen mussten keine größeren Mengen an Ethionin verwendet werden. Die Substitution von Methionin mit einer Ethionin-Konzentration von 100 mg/L führt bei den Zelllinien FaDu, Detroit, HaCaT, SCC9 und SCC25 zu einer Reduktion der Zellzahl. Die Zelllinie Hela wird durch diese Ethionin-Konzentration nicht beeinflusst.

Eine Ethionin-Konzentration von 200 mg/L führt in allen Zelllinien zu einer Hemmung der Zellproliferation, wenn Methionin fehlt. Die Kompetition von Methionin durch die 10-fache Ethionin-Konzentration führt nur zu einer geringen Reduktion der Zellproliferation. Die Erhöhung der Ethionin-Konzentration auf die 40-fache Menge führt bei FaDu zu einer Reduktion auf 77%, Hela 75%, HaCaT 67%, SCC9 85% und SCC25 54%. Die Zellproliferation von Detroit wird weniger stark beeinflusst. Detroit wird nur auf 95% gesenkt. Allerdings ist die Auswirkung von Ethionin auf die Zellproliferation im Vergleich zur alleinigen Methionin-Restriktion nur für die Zelllinien SCC9 und SCC25 zu erkennen.

4 Diskussion

Die Aminosäure Methionin spielt eine zentrale Rolle in zahlreichen biologischen Prozessen.⁵⁹ Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Zelllinien FaDu, Detroit, SCC9, SCC25 und die Kontrollzelllinien HeLa und HaCaT die Methionin-Restriktion untersucht. Ziel war es, die Grundlagen für die weitere Forschung zur Methionin-Restriktion als eine mögliche Strategie in der Therapie des HNSCC zu etablieren. Es wurden folgende Aspekte betrachtet:

- 1) Zunächst wurden die Auswirkungen der Methionin-Restriktion auf die Zellproliferation untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch Methionin-Restriktion, abhängig von der Zelllinie, die Zellproliferation zu unterschiedlichen Zeitpunkten gehemmt werden kann. Es wurden für die jeweilige Zelllinie Standardbedingungen definiert.
- 2) In einem weiteren Schritt wurde die Auswirkung der Methionin-Restriktion auf die Autophagie der Zellen betrachtet.
- 3) Es folgten Untersuchungen zu dem Einfluss der Methionin-Restriktion auf den Insulin-like-Growth-Factor-1 (IGF-1) und das Insulin-like-Growth-Factor-Binding-Protein-1 (IGFBP1).
- 4) Zytokine, wie Interleukin-8, vermitteln Zellproliferation, Wachstum und ein entzündliches Milieu für die Zelle. Diese Faktoren gelten als Tumor-fördernd. In dieser Arbeit wurde die Sekretion von Interleukin-8 unter Methionin-Restriktion untersucht.
- 5) In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Wirksamkeit des Zytostatikum Cisplatin in Verbindung mit der Methionin-Restriktion untersucht.
- 6) Weiterhin ist die Analyse des Methionin-Analogon Ethionin erfolgt.

4.1 Auswirkung auf die Zellproliferation

Gemäß der Literatur ist ein wesentliches Charakteristikum einer Methionin-Restriktion eine geringere Proliferation der Zellen.^{84,85} Maßgeblich dafür verantwortlich ist das Protein mTOR. Als Bestandteil des Komplexes mTORC1 ist es für die Regulation des Zellwachstums und der Proliferation verantwortlich. Das Protein SAMTOR gilt als Methionin-Sensor und kann, wie einleitend beschrieben, mTORC1 regulieren. Kommt es aufgrund der Methionin-Restriktion zu einem Mangel an SAM, so kann SAMTOR den Komplex mTORC1 hemmen. Es kommt folglich zu einer Inhibition der Zellproliferation.^{59,60}

Durch erste Versuche für die Zelllinien HeLa und SCC9 mit Hilfe einer log₂-Verdünnungsreihe für die Aminosäure Methionin wurde deutlich, dass deren Restriktion über einen kurzen Zeitraum nur zu einer geringfügigen bzw. keiner Veränderung der Zellproliferation führt. Die Zellen wurden bei diesem Versuch nach 24, 48 und 72 Stunden untersucht. Die Auswirkungen der Methionin-Restriktion scheinen allerdings erst nach einiger Zeit in Erscheinung zu treten: Werden die Zellen über einen längeren Zeitraum analysiert, so wird deutlich, dass die Zellproliferation für verschiedene Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten gehemmt wird. Die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT und die Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa werden in ihrer Zellproliferation nach 5 Tagen deutlich gehemmt, die Plattenepithelzelllinien FaDu und Detroit nach 3 Tagen, SCC9 und SCC25 nach 7 Tagen.

Für die unterschiedlichen Ansprechraten, zu unterschiedlichen Zeitpunkt, der einzelnen Zelllinien gibt es verschiedene Erklärungen. Zum einen könnten die Zellen einen Pool an Methionin zur Verfügung haben. Zum anderen könnten zelluläre Mechanismen wie zum Beispiel Autophagie induziert werden, um den Methionin-Mangel zu kompensieren.²⁷ Es ist erstaunlich, dass die Keratinozyten-Zellen schon nach fünf Tagen unter Methionin-Restriktion gehemmt werden und die Tumorzellen SCC9 und SCC25 erst zu einem späteren Zeitpunkt. Nach Halpern et al.⁸⁶ können normale Körperzellen Methionin aus Homocystein regenerieren, während viele Tumorzellen diesen Kompensationsmechanismus verloren haben. Es zeigte sich allerdings schon in den 70er Jahren, dass die Restriktion der Aminosäure Methionin zu einer deutlichen Reduktion gewisser maligner Zellen führt, aber dies nicht konsistent für alle Tumorzelllinien gilt. Die Zelllinien P815/ara-C, L1210, Lymphoma 5178Y und Walker 256 gelten als

Methionin-abhängig.⁸⁷ Normale Körperzellen, HeLa-Zellen und Brustadenocarcinomzellen (AIAb) zeigten unter Zusatz von Homocystein ein normales Wachstum trotz Methionin-Restriktion.^{87,86} Sie können also aus Homocystein Methionin regenerieren.

Nicht nur das Zeitfenster spielt eine wichtige Rolle für die Methionin-Restriktion, sondern auch die Methionin-Konzentration sowie etwaige Medium-Zusätze. Fetales Kälber Serum (FCS) ist ein Medium-Zusatz und könnte eine alternative Methionin-Quelle darstellen, denn Aminosäuren werden über das Blut transportiert. Aminosäuren, die in dem FCS vorhanden sind, könnten die Ergebnisse beeinflussen. Aus diesem Grund wurden Versuche mit unterschiedlichen FCS-Konzentrationen durchgeführt. Hierbei ergab sich, dass FCS für die Zelllinien FaDu, Detroit, HaCaT, SCC9 und SCC25 in der 10%igen Standardkonzentration den Medien weiterhin zugesetzt werden kann. Für HeLa wurde allerdings die FCS-Konzentration auf 1% reduziert. HeLa-Zellen scheinen vom FCS-Zusatz zu profitieren. Wie oben erwähnt, sind HeLa-Zellen in der Lage aus Homocystein Methionin zu regenerieren. Gegebenenfalls nutzen HeLa-Zellen FCS als Methionin- und/oder Homocystein-Quelle. Interessant wäre eine Bestimmung der einzelnen FCS-Bestandteile z.B. mittels Massenspektrometrie. Diese ist für weitere Arbeiten geplant. In der Zusammenfassung der Versuche ergaben sich für diese Arbeit Standard-Bedingungen (siehe Tabelle 10) unter denen die weiteren Experimente entsprechend durchgeführt wurden. Der oben angesprochene Methionin-Pool könnte vor allem bei Tumor-Zellen besonders groß sein, da Tumorzellen vermehrt Methionin aufnehmen. Es konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass Tumorzellen vermehrt ¹¹C-Methionin anreichern und dies für die nuklearmedizinische Bildgebung genutzt werden kann.⁵⁹ Es wurde dargestellt, dass beim Multiplen Myelom der Tracer ¹¹C-Methionin zur Verlaufskontrolle der Therapie gerade in der Frühphase sogar sensitiver ist als Fluordesoxyglucose.⁸⁸ Auch im Rahmen der Diagnostik von Hirntumoren hat sich Methionin als Tracer besonders hervorgetan.⁸⁹ In unserem Versuchsaufbau werden Tumorzellen zunächst mit frischem Vollmedium ausgesät und über Nacht inkubiert. Bei einer sehr hohen Methionin-Aufnahme könnten sich die Tumorzellen während dieser initialen Versuchsphase einen sehr großen Methionin-Pool aufbauen. Erst wenn dieser aufgebraucht ist, wird sich auch die Methionin-Restriktion im Medium auswirken. Außerdem stellt sich die Frage, ob die Zellen nicht auch ihre eigenen zellulären

Ressourcen nutzen. Im Rahmen der Autophagie können zum Beispiel Proteine, Lipide oder Zellorganellen abgebaut werden und deren Grundbestandteile, u.a. Aminosäuren wie Methionin, regeneriert werden.

4.2 Auswirkung auf die Autophagie

Zellen können allgemein fehlende Nährstoffe und Ressourcen in der Regel über einen längeren Zeitraum durch Substitution kompensieren. Bei einer Methionin-Restriktion stellt sich die Frage, welche Mechanismen die Zellen zur Kompensation der Methionin-Restriktion nutzen. Eine Möglichkeit stellt die Autophagie dar. Nach Sanderson et. al.⁵⁹ hat Methionin einen relevanten Einfluss auf die Autophagie. Methionin hemmt via SAM und weiteren Zwischenschritten (siehe Kapitel 1.5) die Autophagie und führt zu einer Wachstumssteigerung. Die Restriktion der Aminosäure Methionin kann so genutzt werden, um die Autophagie bzw. das Zellwachstum zu regulieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen mittels Western-Blot-Analyse auf die Regulation der Autophagie analysiert. Hierzu wurde der Marker LC3B, ein oft genutztes Protein zur Untersuchung der Autophagie, verwendet.⁸² LC3B-I wird während der Autophagie in LC3B-II durch Lipidation mittels eines Ubiquitin-ähnlichen Systems aus Apg7 und Apg3 umgewandelt und ermöglicht so die Bindung von LC3B an Autophagosomen.⁸³ Gemäß der Theorie sollten die Zellen, die unter Methionin-Restriktion gehalten werden, vermehrt Autophagie auslösen und sich somit die LC3B-Formen quantitativ ändern. Die Versuchsergebnisse des Western-Blot erlauben allerdings keine klaren Rückschlüsse auf eine Induktion der Autophagie durch Methionin-Restriktion. Die Banden für LC3B sind sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die Zellen unter Methionin-Restriktion in Relation zur Tubulin-Bande relativ schwach ausgeprägt. Der Western-Blot bzw. der verwendete Antikörper scheint zum Nachweis der Autophagie durch Methionin-Restriktion für diese Zelllinien und unter diesen Bedingungen nicht sensitiv genug zu sein. Die Methionin-Restriktion könnte zu einer langsamen, aber kontinuierlichen Induktion der Autophagie führen. Es könnte sein, dass der eher schleichende Prozess nicht zu extremen Anstiegen von LC3B führt und somit durch die Methode Western-Blot nicht entsprechend analysiert und abgegrenzt werden kann. Außerdem müssen sich die LC3B-Mengen nicht zwingend verändern. Läuft die

Autophagie z.B. einfach schneller bei einer jeweils gleichen Anzahl von Autophagosomen würde sich die Menge an LC3B im Western-Blot nicht maßgeblich verändern.

Als eine alternative Möglichkeit zur Analyse der Autophagie wurden die Zellen mittels PCR für LC3B untersucht. Die Zellreihe Detroit verhält sich in allen drei Versuchen gemäß der Theorie, dass LC3B unter Methionin-Restriktion im Vergleich zum Vollmedium - wie in Abbildung 11 zu sehen ist - hoch reguliert wird. Dies stellt ein Indiz dar, dass diese Zellen Autophagie verstärkt betreiben könnten. FaDu, HeLa, HaCaT, SCC9 und SCC25 weisen ebenfalls in zwei von drei Versuchen die Tendenz auf, unter Methionin-Restriktion vermehrt LC3B zu exprimieren. LC3B gehört zur Protein-Familie Atg8, die für die Regulierung der Autophagie verantwortlich ist.⁹⁰ Die Atg8 Proteine lassen sich in zwei Untergruppen einteilen. Die Mikrotubuli-assoziierten Proteine 1A/1B light chain 3A (LC3A), LC3B und LC3C. Zur anderen Gruppe gehören die γ -Aminobuttersäure-Rezeptor-assoziierten Proteine (GABARAP), GABARAPL1 und GABARAPL2.⁹⁰ Die GABARAP-Familie wird der Regulation später Prozesse in der Autophagie zugerechnet. Die LC3-Familie ist eher an der Frühphase der Autophagie beteiligt, in dem es die Expansion der Autophagosome koordiniert.^{91,90}

In dieser Arbeit wird nur der Marker LC3B betrachtet. Die Dauer des Experiments hält allerdings über einen Zeitraum von drei bis sieben Tagen an. Es ist fraglich, in welcher Phase der Autophagie die Zellen sich befinden. Gegebenenfalls lässt sich in den Zelllinien der Marker für die Frühphase der Autophagie (LC3B) nicht mehr nachweisen, da die Zellen sich schon in einem fortgeschrittenen Stadium befinden. Außerdem lässt sich nicht genau festlegen, ob innerhalb einer Zelllinie die einzelnen Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Autophagie gleichmäßig einleiten. Die Ergebnisse zum Marker LC3B lassen eine Tendenz zur verstärkten Autophagie bei den Zelllinien FaDu, Detroit, HeLa, HaCaT, SCC9 und SCC25 erkennen. Um diese Tendenz zu bestätigen, sind weiterführende Experimente notwendig mit weiteren Markern, die zu einem späteren Zeitpunkt wirksam werden. Hierzu gehören zum Beispiel die oben erwähnten Proteine GABARAPL1 und GABARAPL2.⁹⁰

4.3 Auswirkung auf IGF-1 und IGFBP1

IGF-1 bindet sich - wie einleitend erwähnt - an den IGF-1 Rezeptor (IGF-1R) und führt über verschiedene Signalkaskaden zu Proliferation und Wachstum der Zellen.^{66,67} Zahlreiche Studien zeigen bei erhöhtem IGF ein zweifach größeres Risiko für gastrointestinale Tumore und für weitere Tumore, wie Prostatakarzinome, Brustkrebs und Ovarialkarzinome.^{92,93,94,66} Nach Baserga et al.⁶⁷ führt ein Eingriff in den Insulinstoffwechsel durch Herunterregulierung von IGF-1R zur Apoptose von Tumorzellen und stellt somit einen reizvollen Angriffspunkt in der Tumorthherapie dar. Verschiedene Studien konstatieren, dass die Methionin-Restriktion zu niedrigeren IGF-1-, Insulin- und Glucose-Spiegeln führt.^{68,55} Doch wie verhalten sich die Zellen in dieser Arbeit im Hinblick auf IGF-1 und IGFBP1 unter Methionin-Restriktion?

In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass IGF-1 unter Methionin-Restriktion für die Zelllinien FaDu und Detroit weniger stark exprimiert wird. Für FaDu wird der IGFBP1 herunterreguliert. In der Zelllinie Detroit führt allerdings die Methionin-Restriktion zu einer Induktion von IGFBP1. Ähnliche Tendenzen zeigen HeLa und SCC9. Bei der Zelllinie SCC25 führt die Methionin-Restriktion in zwei von drei Versuchen zu einer Überexpression von IGF1 und gleichzeitig zu einer Induktion von IGFBP1. Die Kontrollzelllinie HaCaT zeigt tendenziell eine verstärkte Expression von IGF1 und IGFBP1. Es lässt sich konkludieren, dass die Auswirkungen der Methionin-Restriktion nicht für alle HNSCC-Zelllinien konsistent sind. Außerdem sollte bei der Bewertung der Versuche berücksichtigt werden, dass nur die frühe Phase der Methionin-Restriktion analysiert wird. Auch die Auswirkungen auf IGF-1 und IGFBP1 sollten in Langzeitexperimenten betrachtet werden.

4.4 Auswirkung auf die Interleukin-Synthese

Interleukin-8 gehört zur Familie der Zytokine, die im Rahmen des NFκB-Signalwegs an Proliferation und Angiogenese beteiligt sind und für ein entzündliches Milieu um die Tumorzellen sorgen.⁷⁵ IL-8 wurde bereits in Studien zum HNSCC untersucht und gilt als gut etablierter Marker zur Analyse von Entzündungen sowie des NFκB-Signalwegs.⁷¹ Doch welchen Einfluss hat die Methionin-Restriktion auf die IL-8-Sekretion der HNSCC-Zellen? Die Methionin-Restriktion führt nicht zu einer Verringerung der

Interleukin-8 Sekretion. Im Gegenteil zeigen alle Zellreihen eine vermehrte IL-8-Sekretion unter Methionin-Restriktion. Dies widerspricht zwar der Idee, dass via Methionin-Restriktion entzündliche Mediatoren über den STAT3-NFκB-Signalweg in den HNSCC-Zellen reduziert werden können. Allerdings stehen die Ergebnisse im Einklang zu der Tatsache, dass gewisse NFκB-Inhibitoren (z.B. ML4924) die IL-8-Sekretion bei den untersuchten Zellen ebenfalls ansteigen lassen.⁷¹ NFκB kann über verschiedene Signalwege induziert werden. Somit könnte die Hemmung des einen Signalweges zur verstärkten Induktion eines anderen führen. Die Methionin-Restriktion induziert in den Zellen einen Mangel an Methionin und dieser wiederum den sogenannten „Low-Energy-Metabolismus“. In diesem Zustand könnten Zellen versuchen, Anschluss an das Gefäßsystem zu bekommen, um die Ressourcenknappheit zu kompensieren. Ein Anschluss an das Gefäßsystem wird u.a. durch die Induktion der Angiogenese erreicht. Hierbei spielt Interleukin-8 eine große Rolle und könnte demnach kompensatorisch vermehrt sezerniert werden.^{95,96} Des Weiteren zeigt die vermehrte Ausschüttung von Interleukin-8, dass in den Zellen durch Methionin-Restriktion Entzündungsprozesse ausgelöst werden. Diese bewirken normalerweise immunologische Prozesse, wie die Migration von neutrophilen Granulozyten mit dem Ziel zur Beseitigung der (Tumor)zellen. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass Tumorzellen gerade in diesem pro-inflammatorischen Milieu besonders gut proliferieren. Nach Zhong et al.⁹⁷ ist CXCR1 ein Rezeptor für Interleukin-8. CXCR1 fördert Tumorwachstum, -invasion, -inflammation und Metastasierung. Zhong proklamiert, dass das Ausschalten von CXCR1 zu einer stärkeren Effizienz der Chemotherapie führt. Es wäre also durchaus zu erwägen, dass ein zusätzliches Hemmen des CXCR1-Rezeptors den Effekt der Methionin-Restriktion verstärken könnte. Zum einen wird die Ressourcenknappheit der Zelle verstärkt und die Migration von Granulozyten mit anschließender Beseitigung der Tumorzellen angeregt. Andererseits wird die Zellproliferation durch Hemmung des CXCR1-Rezeptors unterbunden. Es zeigt sich wiederholt, dass die Bekämpfung von Tumoren auf einem polymodalen Weg erfolgen muss. Eine Möglichkeit zum Angriff der IL-8/CXCR1-Achse stellt Reparixin dar.⁹⁸ Reparixin ist ein CXCR1-Inhibitor, der im Rahmen der Brustkrebstherapie untersucht wurde und hierbei effektiv die Tumor-Initiierungspopulation in verschiedenen NOD/SCID Mausmodellen reduzierte.⁹⁸ Es könnte ggf. für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen werden.

4.5 Auswirkung auf die Wirksamkeit von Zytostatika

Wie der Titel dieser Arbeit ausdrückt, wird das Konzept der Methionin-Restriktion als ein moderner Ansatz in der Tumorthherapie verstanden. Folglich wurden die Auswirkungen der Methionin-Restriktion auf die Wirksamkeit eines Zytostatikum - im Konkreten Cisplatin - untersucht.

Die Kombination aus Cisplatin und Methionin-Restriktion hat auf die Zelllinien eher nur geringe Auswirkungen. FaDu, Detroit und HeLa zeigen für einen gewissen Konzentrationsbereich eine gering verstärkte Sensitivität. HaCaT, SCC9 und SCC25 hingegen werden durch die Methionin-Restriktion nicht sensitiver. Dies könnte natürlich auch daran liegen, dass die Wirkung der Methionin-Restriktion sich in diesem kurzen Zeitraum noch nicht entfalten kann. Eventuell sollte zunächst nur eine Methionin-Restriktion durchgeführt werden und erst im Anschluss die Zellen mit Cisplatin behandelt werden. Nach Hoffman et al.⁹⁹, sowie Stern et al.¹⁰⁰ verharren die Tumorzellen unter Methionin-Restriktion in der späten S-/G2-Phase des Zellzyklus. Eine Restriktion und erneute selektive Aktivierung könnte zu einer Synchronisierung der Zellzyklen führen und damit Zellzyklus-spezifische zytotoxische Medikamente wirksamer machen.

Nach Strekalova et al.¹⁰¹ sind alterierte Zellen besonders anfällig für Aminosäure-Restriktionen. Auch die Aminosäure Arginin wurde untersucht: Arginin-Restriktion führt nach Scott et al.¹⁰² zu Defekten von Zellzyklus-Kontrollmechanismen. Somit sterben die Tumorzellen in kurzer Zeit unter Arginin-Restriktion, während die Zellen mit Arginin überleben. Dies gilt als eine nicht toxische supportive Methode für die Bekämpfung von vielen Tumoren. Auch für die Methionin-Restriktion wurde von Strekalova et al.¹⁰¹ eine erhöhte Vulnerabilität der Zellen gegenüber Chemotherapeutika proklamiert. Dies wird auf eine stress-induzierte Zellzyklus-Blockade zurückgeführt. Nach Tan et al.¹⁰³ zeigten Kolontumore eine starke Methionin-Abhängigkeit. Rekombinante Methioninase (rMETase) wurde genutzt, um diese Tumortypen zu treffen. rMETase baut Methionin zu alpha-Ketobutyrat, Methanthiol und Ammoniak ab anstatt zu SAM. Die Kombination von rMETase und Cisplatin hatte deutliche Auswirkungen auf die Chemosensitivität. Dass die Chemosensitivität durch Methionin-Restriktion für gewisse Zelllinien allerdings sogar verringert werden kann, zeigt die Studie von Najim et al.¹⁰⁴ Dies trifft auf ZNS-

Zelllinien zu. Für die untersuchten HNSCC-Zelllinien wird zwar die Chemosensitivität durch die Methionin-Restriktion nicht deutlich erhöht, allerdings wird sie auch nicht herabgesetzt wie bei gewissen ZNS-Zelllinien. Das bedeutet, dass die Methionin-Restriktion parallel zu einer Therapie mit Cisplatin eingesetzt werden kann, ohne die Wirkung des Cisplatins abzuschwächen.

4.6 Auswirkung der Methionin-Analoga

„Caloric Restriction Mimetics“ (CRM) und Methionin-Analoga (siehe Abschnitt 1.6) verfolgen das Konzept, mittels Substanzaufnahme die gleichen Effekte zu induzieren wie z.B. durch eine Methionin-Restriktion. CRMs wirken an verschiedenen Stellen des zellulären Stoffwechsels. Rapamycin zum Beispiel wirkt inhibierend auf den mTOR-Komplex. Mit Methionin-Analoga hingegen wird versucht, durch Konkurrenz der Aminosäure Effekte zu erzielen.

Eine theoretische Möglichkeit stellt Formyl-Methionin (F-Met) dar. F-Met leitet die prokaryotische Proteinbiosynthese ein. Das bedeutet, dass die ribosomale Proteinbiosynthese in Bakterien, eukaryotischen Mitochondrien und Chloroplasten durch F-Met gestartet wird. Im Zytosol eukaryotischer Zellen wird allerdings Methionin als Startaminosäure verwendet.⁷⁸ Theoretisch könnte durch Konkurrenz von Methionin mit Formyl-Methionin die eukaryotische Proteinbiosynthese im Zytosol gedrosselt werden. Außerdem wurde herausgefunden, dass (Nt-)formylierte zytosolische Proteine selektiv im sogenannten „F-Met/N-end rule“-Pfad im Proteasom abgebaut werden.⁷⁸ Somit würde das zugeführte F-Met proteolytisch von der Zelle eliminiert werden und sich dort nicht anreichern oder toxische Effekte erzielen. Allerdings zeigten die Versuche keinen Einfluss auf die Zellproliferation. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zunächst könnte es sein, dass die untersuchten Zellen F-Met nicht aufnehmen. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass F-Met intrazellulär abgebaut wird oder nicht an die t-RNA angehängt wird. Inwieweit die Formyl-Gruppe einen Einfluss auf die Proteinbiosynthese und Proteine hat, bleibt ebenfalls ungeklärt.

Als nächstes wurde Ethionin analysiert. Das Met-Analogon Ethionin wurde schon in den 90er Jahren im Rahmen der Therapie des Prostata-Karzinoms untersucht. Bei den

Prostatakarzinomzellen PC-3 wurde der anti-karzinogene Effekt der Methionin-Restriktion durch Ethionin verstärkt.⁸⁰ Doch wie wirkt sich Ethionin auf das HNSCC aus? Ethionin führt zu einer Reduktion der Zellzahl im Vergleich zu Kontrollgruppe. Dieser Effekt ist bei einer Konzentration von 200mg/L Ethionin sehr deutlich. Bei einer Konzentration von 100mg/L sind die Auswirkungen etwas geringer. Die Kombination aus 100mg/L Ethionin und 10mg/L Methionin führt nur zu einer leichten Hemmung der Zellproliferation. Wird die Ethionin-Konzentration auf das 40-fache von Methionin erhöht (Ethionin 200mg/L und Methionin 5mg/L), kommt es nur für die Zelllinien SCC9 und SCC25 zu einer deutlicheren Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse aus den Ethionin-Versuchen zum HNSCC stehen im Einklang mit den Ergebnissen zum Prostata-Karzinom. Wie beim Prostatakarzinom lässt sich das Wachstum bestimmter Zellen durch Ethionin inhibieren. Nach Poirson-Bichat et al.⁸⁰ wurde die Zellproliferation unter Methionin-Restriktion auf 29% gesenkt. Durch Zugabe von Homocystein betrug die Zellzahl 56% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um mittels Ethionin die Zellproliferation auf 50% zu reduzieren, war eine Ethionin-Konzentration von 0,5mg/L notwendig. Wurde zusätzlich zum Ethionin Methionin hinzugefügt, so verringerte sich der antiproliferative Effekt von Ethionin. Durch Zugabe von Homocystein wurde der Effekt von Ethionin allerdings verstärkt.⁸⁰

Bei den Versuchen in dieser Arbeit führte Ethionin unter Methionin-Restriktion ebenfalls zu den antiproliferativen Effekten. Sobald Methionin hinzugegeben wurde, wurden die positiven Effekte geringer. Das Methionin-Analogon scheint vor allem in Kombination mit einer Methionin-Restriktion seine Wirkung zu entfalten. Das heißt die Methionin-Restriktion kann bzw. sollte durch ein Methionin-Analogon (z.B. Ethionin) unterstützt werden. Trotz der positiven Effekte der Ethionin-Zugabe, darf die Toxizität des Ethionin nicht unberücksichtigt bleiben. Ethionin birgt die Gefahr, an einer Fettleber oder akuten Pankreatitis zu erkranken. Außerdem wird Ethionin als ein Risikofaktor für Lebertumore angesehen.⁷⁹ Als Alternative sollten deshalb für zukünftige Studien die oben erwähnten CRMs näher betrachtet werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Methionin-Restriktion für die HNSCC-Zelllinien FaDu, Detroit, SCC9, SCC25 sowie die Kontrollzelllinien HeLa und HaCaT durchgeführt. Ziel war es, grundlegende Erkenntnisse im Hinblick auf die Methionin-Restriktion für weitere Forschungsprojekte zu erlangen. Die Methionin-Restriktion wird in der Forschung als eine mögliche moderne Strategie in der Tumorthherapie diskutiert. In dieser Arbeit wurden folgende Aspekte betrachtet:

Die Auswirkungen der Methionin-Restriktion auf die Zellproliferation wurden untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch Methionin-Restriktion über einen gewissen Zeitraum die Zellproliferation gehemmt werden kann. Es wurden für die jeweilige Zelllinie Standardbedingungen definiert. In einem weiteren Schritt wurde die Auswirkung der Methionin-Restriktion auf die Autophagie der Zellen betrachtet. Im Hinblick auf die Autophagie konnten keine klaren Tendenzen für die Zellen herausgearbeitet werden, sodass hierzu weiterführende Arbeiten notwendig sind. In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss der Methionin-Restriktion auf den Insulin-like-Growth-Factor-1 (IGF-1) und Insulin-like-Growth-Factor-Binding-Protein-1 (IGFBP1) untersucht. IGF-1 ist maßgeblich an der Steuerung des Zellwachstums beteiligt. Diesbezüglich werden für die einzelnen Zelllinien unterschiedliche Auswirkungen erkennbar. Zytokine wie Interleukin-8 vermitteln Zellproliferation, Wachstum und ein entzündliches Milieu für die Zelle. Diese Faktoren gelten als Tumorfördernd. Unter Methionin-Restriktion wurde tendenziell mehr Interleukin-8 gebildet. In einem weiteren Ansatz wurde die Wirksamkeit des Zytostatikums Cisplatin untersucht. Die Wirksamkeit von Cisplatin wird durch die Methionin-Restriktion nicht signifikant gefördert. Allerdings wird der zytostatische Effekt durch die Methionin-Restriktion auch nicht abgeschwächt. Weiterhin ist die Analyse des Methionin-Analogons Ethionin erfolgt. Teilweise hat Ethionin einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation. Die Ergebnisse müssen jedoch genau und vor allem konzentrationspezifisch für die unterschiedlichen Zelllinien betrachtet werden.

Die Methionin-Restriktion gilt prinzipiell als ein vielversprechender Ansatz im Rahmen der Tumorthherapie des HNSCC. Es sind allerdings zahlreiche weitere Aspekte zu

erörtern. Insbesondere die Vorgänge im Rahmen der Autophagie unter Methionin-Restriktion sowie Möglichkeiten zur Konkurrenz von Methionin sollten detaillierter betrachtet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Wild, C. P., Weiderpass, E., Stewart, B. W., World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://publications.iarc.fr/586>.
Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO
2. Johnston, R. B., Arsenic and the 2030 Agenda for sustainable development. *Arsen Res Glob Sustain-Proc 6th Int Congr Arsen Environ AS. 2016*; 12-4.
3. Thallinger, C., Füreder, T., Preusser, M., et al., Review of cancer treatment with immune checkpoint inhibitors: Current concepts, expectations, limitations and pitfalls. *Wien Klin Wochenschr.* 2018;130(3-4):85-91.
4. Hausamen, J.-E., Machtens, E., Reuther, J., et al., Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. *Springer Berlin Heidelberg*; 2012.
5. Schwenzer, N., Ehrenfeld, M. (Hrsg.), Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie. *Georg Thieme Verlag*; 2010.
6. Brana, I., Siu, L.L., Locally advanced head and neck squamous cell cancer: Treatment choice based on risk factors and optimizing drug prescription. *Ann Oncol.* 2012;23(SUPPL. 10):178-185.
7. Schwenzer, N., Ehrenfeld, M., (Hrsg.), Chirurgische Grundlagen. *Georg Thieme Verlag*; 2010.
8. Chow, L. Q. M., Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2020; 382(1):60-72.
9. Talamini, R., Bosetti, C., Vecchia, C. La., et al., Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: A case-control study. *Cancer Causes Control.* 2002;13(10):957-964.
10. Bagnardi, V., et al., Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Res Health.* 2001;25(4):263-270.
11. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0, 2021, AWMF Registernummer: 007/100OL <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mundhoehlenkarzinom/> (abgerufen am: 04.06.2022)
12. Critchley, J. A., Unal, B., Health effects associated with smokeless tobacco: A systematic review. *Thorax.* 2003;58(5):435-443.
13. Chaturvedi, A. K, Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4294-4301.
14. Gillison, M., Chaturvedi, A. K., Anderson, W., et al., Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(29):3235-3242.
15. Fitzmaurice, C., Akinyemiju, T. F., Al Lami, F. H., et al., Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2016 a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol.*;

- 2018, 4(11):1553-1568
16. Lydiatt, W. M., Patel, S. G., O'Sullivan, B., et al., Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):122-137.
 17. Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., et al., The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017; 67(2):93-99.
 18. Bosetti, C., Talamini, R., Levi, F., et al., Fried foods: A risk factor for laryngeal cancer? *Br J Cancer.* 2002;87(11):1230-1233.
 19. Bosetti, C., Gallus, S., Trichopoulou, A., et al., Influence of the Mediterranean Diet on the Risk of Cancers of the Upper Aerodigestive Tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12(10):1091-1094.
 20. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Kurzversion 3.0, 2021, AWMF Registernummer: 007/1000L <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mundhoehlenkarzinom/> (abgerufen am: 04.06.2022)
 21. Blasco, M. A., Svider, P. F., Raza, S. N., et al., Systemic therapy for head and neck squamous cell carcinoma: Historical perspectives and recent breakthroughs. *Laryngoscope.* 2017;127(11):2565-2569.
 22. Hartmann, S., Seher, A., Brands, R. C., et al., Influence of epidermal growth factor receptor expression on the cetuximab and panitumumab response rates of head and neck carcinoma cells. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2014;42(7):1322-1328.
 23. Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., et al., Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med.*; 2008, 359(11):1116-1127.
 24. Bonner, J.A., Harari, P.M., Giralt, J., et al., Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med.* 2006;354(6):567-578.
 25. Seiwert, T. Y., Burtness, B., Mehra, R., et al., Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):956-965.
 26. Kamangar, F., Dores, G. M., Anderson, W. F., Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol.* 2006;24(14):2137-2150.
 27. Hanahan, D., Weinberg, R. A., Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
 28. Vander Heiden, M., Cantley, L., Thompson, C., The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029-1033.
 29. Potter, M., Newport, E., Morten, K. J., The Warburg effect: 80 years on. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(5):1499-1505.
 30. Warburg, O., Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science.* 1956; 123(3191):309-314.

31. Otto, A. M., Warburg effect(s)—a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer Metab.* 2016;4(1):1-8.
32. Hsu, P. P., Sabatini, D. M., Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008;134(5):703-707.
33. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., et al., The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* 2008;7(1):11-20.
34. Locasale, J. W., Cantley, L. C., Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab.* 2011;14(4):443-451.
35. Kennedy, K. M., Dewhirst, M. W., Tumor metabolism of lactate: The influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Futur Oncol.* 2010;6(1):127-148.
36. Semenza, G. L., Tumor metabolism: Cancer cells give and take lactate. *J Clin Invest.* 2008;118(12):3835-3837.
37. Kilburn, D. G., Lilly, M. D., Webb, F. C., The energetics of mammalian cell growth. *J Cell Sci.* 1969;4(3):645-654.
38. Ball, Z.B., Barnes, R.H., Visscher, M.B., THE EFFECTS OF DIETARY CALORIC RESTRICTION ON MATURITY AND SENESCENCE, WITH PARTICULAR REFERENCE TO FERTILITY AND LONGEVITY. *Am J Physiol Content.* 1947;150(3):511-519.
39. Fontana, L., Partridge, L., Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans. *Cell.* 2015;161(1):106-118.
40. Colman, R. J., Beasley, T. M., Kemnitz, J. W., et al., Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun.* 2014;5:1-5.
41. Fontana, L., Partridge, L., Longo, V. D., Dietary Restriction, Growth Factors and Aging: from yeast to humans. *Science.* 2010;328(5976):321-326.
42. Papadopoli, D., Boulay, K., Kazak, L., et al., Mtor as a central regulator of lifespan and aging. *F1000Research.* 2019;8:1-21.
43. Mirzaei, H., Suarez, J. A., Longo, V. D., Protein and amino acid restriction, aging and disease: from yeast to humans. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(11):558-566.
44. Pamplona, R., Barja, G., Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: The protein and methionine connection. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2006;1757(5-6):496-508.
45. Nakagawa, S., Lagisz, M., Hector, K. L., et al., Comparative and meta-analytic insights into life extension via dietary restriction. *Aging Cell.* 2012;11(3):401-409.
46. Ables, G. P., Brown-Borg, H. M., Buffenstein, R., et al., The first international mini-symposium on methionine restriction and lifespan. *Front Genet.* 2014;5:1-5.
47. Merrick, J., About the book series "health and human development." *Brennan Heal Sci Heal with Ther Touch.* 2018;19(3):215-220.
48. Grandison, R. C., Piper, M. D. W., Partridge, L., Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature.* 2009;462(7276):1061-1064.
49. Levine, M. E., Suarez, J. A., Brandhorst, S., et al., 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.
50. Rassow, J. Aminosäuren. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, eds. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag; 2016.
 51. Rassow J. Die wichtigsten biochemischen Funktionsträger: Proteine. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, eds. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag; 2016.
 52. Li, Z., Zhang, H., Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(2):377-392.
 53. Lieu, E. L., Nguyen, T., Rhyne, S., Kim, J., Amino acids in cancer. *Exp Mol Med.* 2020;52(1):15-30.
 54. Hosios, A. M., Hecht, V. C., Danai, L. V., et al., Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell.* 2016;36(5):540-549.
 55. Ables, G. P., Hens, J. R., Nichenametla, S. N., Methionine restriction beyond life-span extension. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1363(1):68-79.
 56. Mcisaac, R. S., Lewis, K. N., Gibney, P. A., et al., From yeast to human: Exploring the comparative biology of methionine restriction in extending eukaryotic life span. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1363(1):155-170.
 57. Bhattacharyya, S., Varshney, U., Evolution of initiator tRNAs and selection of methionine as the initiating amino acid. *RNA Biol.* 2016;13(9):810-819.
 58. Schmitz, W., Koderer, C., El-Mesery M., et al., Metabolic fingerprinting of murine I929 fibroblasts as a cell-based tumour suppressor model system for methionine restriction. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):1-17.
 59. Sanderson, S. M., Gao, X., Dai, Z., et al., Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(11):625-637.
 60. Gu, X., Orozco, J. M., Saxton, R. A., et al., SAMTOR is an S -adenosylmethionine sensor for the mTORC1 pathway. *Science.* 2017;358(6364):813-818.
 61. Pegg, A. E., Functions of polyamines in mammals. *J Biol Chem.* 2016;291(29):14904-14912.
 62. Mandal, S., Mandal, A., Johansson, H. E., et al., Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(6):2169-2174.
 63. Mazor, K. M., Dong, L., Mao, Y., et al., Effects of single amino acid deficiency on mRNA translation are markedly different for methionine versus leucine. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-13.
 64. Sutter, B. M., Wu, X., Laxman, S., et al., Methionine Inhibits Autophagy and Promotes Growth by Inducing the SAM-Responsive Methylation of PP2A. *Cell.* 2013;154(2):403-415.
 65. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie.* 9th ed. Berlin; Heidelberg: Springer; 2014.
 66. Chaves, J., Saif, M. W., IGF system in cancer. *Anticancer Drugs.* 2011;22(3):206-212.
 67. Baserga, R., Peruzzi, F., Reiss, K., The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer.* 2003;107(6):873-877.
 68. Miller, R. A., Buehner, G., Chang, Y., et al., Methionine-deficient diet extends

- mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell*. 2005;4(3):119-125.
69. Sharma, S., Dixon, T., Jung, S., et al. Dietary Methionine Restriction Reduces Inflammation Independent of FGF21 Action. *Obesity*. 2019;27(8):1305-1313.
 70. Orgeron, M. L., Stone, K. P., Wanders, D., et al., The Impact of Dietary Methionine Restriction on Biomarkers of Metabolic Health. In: *Bone*. 2014; 121: 351-376.
 71. Scheurer, M. J. J., Brands, R. C., El-Mesery, M., et al. The selection of NFκB inhibitors to block inflammation and induce sensitisation to fasl-induced apoptosis in hnscc cell lines is critical for their use as a prospective cancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6).
 72. Balkwill, F., Mantovani, A., Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-545.
 73. Ghosh, S., Wanders, D., Stone, K. P., et al., A systems biology analysis of the unique and overlapping transcriptional responses to caloric restriction and dietary methionine restriction in rats. *FASEB J*. 2014;28(6):2577-2590.
 74. Yu, H., Pardoll, D., Jove, R., STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(11):798-809.
 75. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., et al., NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2. 2017;2.
 76. Lu, T., Stark, G. R., Cytokine overexpression and constitutive NFκB in cancer. *Cell Cycle*. 2004;3(9):1114-1117.
 77. Madeo, F., Carmona-Gutierrez, D., Hofer, S. J., et al., Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell Metab*. 2019;29(3):592-610.
 78. Kim, J. M., Seok, O. H., Ju, S., et al., Formyl-methionine as an N-degron of a eukaryotic N-end rule pathway. *Science*. 2018; 362: (6418).
 79. Alix, J. H., Molecular aspects of the in vivo and in vitro effects of ethionine, an analog of methionine. *Microbiol Rev*. 1982;46(3):281-295.
 80. Poirson-Bichat, F., Gonfalone, G., Bras-Gonçalves, R. A., et al., Growth of methionine-dependent human prostate cancer (PC-3) is inhibited by ethionine combined with methionine starvation. *Br J Cancer*. 1997;75(11):1605-1612.
 81. Livak, K. J., Schmittgen, T. D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
 82. Mizushima, N., Yoshimori, T., How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007;3(6):542-545.
 83. Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(12):2503-2518.
 84. Poirson-Bichat, F., Lopez, R., Bras Gonçaves, R. A., et al., Methionine deprivation and methionine analogs inhibit cell proliferation and growth of human xenografted gliomas. *Life Sci*. 1997;60(12):919-931.
 85. Wanders, D., Hobson, K., Ji, X., Methionine restriction and cancer biology. *Nutrients*. 2020;12(3).
 86. Halpern, B. C., Clark, B. R., Hardy, D. N., et al., The effect of replacement of

- methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(4):1133-1136.
87. Kreis, W., Goodenow, M., Methionine Requirement and Replacement by Homocysteine in Tissue Cultures of Selected Rodent and Human Malignant and Normal Cells. *Cancer Res*. 1978;38(8):2259-2262.
 88. Lückerrath, K., Lapa, C., Albert, C., et al., 11C-Methionine-PET: A novel and sensitive tool for monitoring of early response to treatment in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2015;6(10):8418-8429.
 89. Glaudemans, A. W. J. M., Enting, R. H., Heesters, M. A. A. M., et al., Value of 11C-methionine PET in imaging brain tumours and metastases. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;40(4):615-635.
 90. Jung, J., Behrends, C., Protocol for Establishing a Multiplex Image-based Autophagy RNAi Screen in Cell Cultures. *Bio-Protocol*. 2017;7(17).
 91. Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., et al., LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J*. 2010;29(11):1792-1802.
 92. Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., et al., Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: Pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *Lancet Oncol*. 2010;11(6):530-542.
 93. Jenkins, P. J., Frajese, V., Jones, A. M., et al., Insulin-like growth factor I and the development of colorectal neoplasia in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(9):3218-3221.
 94. Orme, S. M., McNally, R. J. Q., Cartwright, R. A., et al., Mortality and cancer incidence in acromegaly: A retrospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(8):2730-2734.
 95. Rofstad, E. K., Halsor, E. F., Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. *Cancer Res*. 2000;60(17):4932-4938.
 96. Végran, F., Boidot, R., Michiels, C., et al., Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF- κ B/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2011;71(7):2550-2560.
 97. Zhong, Q., Fang, J., Huang, Z., et al., A response prediction model for taxane, cisplatin, and 5-fluorouracil chemotherapy in hypopharyngeal carcinoma. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-8.
 98. Brandolini, L., Cristiano, L., Fidoamore, A., et al., Targeting CXCR1 on breast cancer stem cells: Signaling pathways and clinical application modelling. *Oncotarget*. 2015;6(41):43375-43394.
 99. Hoffman, R. M., Herrera, H., Groce, A., et al., Expression of the Biochemical Defect of Methionine Dependence in Fresh Patient Tumors in Primary Histoculture. *Cancer Res*. 1993;53(11):2479-2483.
 100. Stern, P. H., Hoffman, R. M., Enhanced in vitro selective toxicity of chemotherapeutic agents for human cancer cells based on a metabolic defect. *J Natl Cancer Inst*. 1986;76(4):629-639.
 101. Strelakova, E., Malin, D., Good, D. M., et al., Methionine deprivation induces a targetable vulnerability in triple-negative breast cancer cells by enhancing TRAIL Receptor-2 Expression. *Clin Cancer Res*. 2015;21(12):2780-2791.

102. Scott, L., Lamb, J., Smith, S., et al., Single amino acid (arginine) deprivation: Rapid and selective death of cultured transformed and malignant cells. *Br J Cancer*. 2000;83(6):800-810.
103. Tan, Y., Sun, X., Xu, M., et al., Efficacy of recombinant methioninase in combination with cisplatin on human colon tumors in nude mice. *Clin Cancer Res*. 1999;5(8):2157-2163.
104. Najim, N., Podmore, I. D., MCGown, A., et al., Methionine restriction reduces the chemosensitivity of central nervous system tumour cell lines. *Anticancer Res*. 2009;29(8):3103-3108.
105. Tanner, J.M., Rutter, J., You Are What You Eat. . . or Are You? *Dev Cell*. 2016; 36(5):483-485.

Appendix:

I Abkürzungsverzeichnis:

ADP	Adenosindiphosphat
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ATP	Adosintriphosphat
CRM	Calorie Restriction Mimetics
AS	Aminosäure
CML	Chronische myeloische Leukämie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FCS	„Fetal Calf Serum“ (Fetales Kälber Serum)
F-Met	Formyl-Methionin
GLUT1	Glukosetransporter 1
HNSCC	„Head and Neck Squamous Cell Cancer“
HPV	Humane Papilloma Viren
IGF	„Insulin Growth Factor“
IL-8	Interleukin-8
MKG	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
MR	Methionin-Restriktion
MTA	Methylthioadenosi
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NNS	„Non-Nitrogen-Starvation“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PDK	Pyruvatdehydrogenasekinase
PET	Positronen-Emission-Tomographie
RNA	Ribonukleinsäuren
SAM	S-Adenosylmethionin
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
5-FU	5-Flour-Uracil
ZNS	Zentrales Nervensystem

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Komplexe mTORC1 und mTORC2 in Zusammenhang mit den zellulären Signalen sowie den regulatorischen Prozessen (nach Sabatini 2017)	9
Abbildung 2: Aufnahme, Verteilung und Verwendung von Makromolekülen in proliferierenden Zellen (nach Tanner und Rutter, Developmental Cell, 2016).....	12
Abbildung 3: Methionin und relevante Auswirkungen auf zahlreiche zelluläre Prozesse.....	14
Abbildung 4: Zytotox-Analyse einer log ₂ -Verdünnungsreihe mit Methionin-haltigem Medium nach 72h.....	31
Abbildung 5a: Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium für die Zelllinien HaCaT, FaDu und Detroit.....	33
Abbildung 5b: Darstellung der relativen Zellzahl unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium für die Zelllinien HeLa, SCC9 und SCC25	34
Abbildung 6: Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium mit verschiedenen FCS-Konzentrationen (0%, 1%, 10%) für die Zelllinien FaDu und Detroit für 3 bis 7 Tage.....	36
Abbildung 7: Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium mit verschiedenen FCS-Konzentrationen (0%, 1%, 10%) für die Zelllinien HeLa und HaCaT für 3 bis 7 Tage.....	37
Abbildung 8: Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium mit verschiedenen FCS-Konzentrationen (0%, 1%, 10%) für die Zelllinien SCC9 und SCC25 für 3 bis 7 Tage.....	38
Abbildung 9: Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Methionin-Restriktion im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium mit verschiedenen FCS-Konzentrationen (0%, 1%, 10%).....	40
Abbildung 10: Betrachtung der Banden für LC3B und Tubulin im Western Blot.....	42
Abbildung 11: PCR-Analyse der Zelllinien FaDu, Detroit, HeLa, HaCaT, SCC9 und SCC25.....	44

- Abbildung 12:** Darstellung der Interleukin-8-Konzentration in Vollmedium und Medium mit 1mg/l in Relation zur relativen Zellzahl (RCN) nach 3 und 7 Tagen.....**46**
- Abbildung 13:** log₂-Verdünnungsreihe mit Cisplatin (Ausgangskonzentration von 100µM) für alle Zellreihe (10.000 Zellen/Well) nach 3 Tagen.....**47**
- Abbildung 14:** log₂-Verdünnungsreihe mit Cisplatin (Ausgangskonzentration von 100µM) für alle Zellreihen (10.000 Zellen/Well) nach Standardbedingungen (FaDu, Detroit 3 Tage; HeLa, HaCaT 5 Tage; SCC9, SCC25 7 Tage).....**49**
- Abbildung 15:** Darstellung der relativen Zellzahl [%] unter Einfluss des Methionin-Analogons Ethionin (10.000 Zellen/Well). FaDu, Detroit 3 Tage; HeLa und HaCaT 5 Tage; SCC9 und SCC25 7 Tage.....**50**

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten humanen Zelllinien.....	20
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Kulturmedien.....	20
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Reagenzien und Chemikalien.....	21
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper.....	21
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten kommerziellen Kits	22
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer	22
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer.....	22
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 9: PCR-Zyklus.....	28
Tabelle 10: Auflistung der Standard-Konzentrationen für die folgenden Versuche	41

IV Danksagung

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Prof. Dr. Dr. Kübler für die Überlassung der Promotion und für seine hilfsbereite Beratung bei der Erstellung und Anfertigung der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Axel Seher für die großartige Unterstützung im Rahmen der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Großer Dank gilt meiner Frau Cordelia, meinen Eltern und meinem Bruder Stefan, die mich nicht nur bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützten, sondern während der kompletten Ausbildung mir viel Verständnis entgegenbrachten und stets zum nötigen Zeitpunkt die richtigen motivierenden Worte fanden.

Meinen Schwiegereltern Camilla und Christian möchte ich ebenfalls für das akribische Korrekturlesen der Arbeit vielmals danken.